

**СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
РАСТЕНИЙ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

**БЕЛКИ
НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО
СТРЕССА РАСТЕНИЙ**

А.В. Колесниченко, В.К. Войников

Иркутск, 2003

УДК 581.1

ББК 28.57

К 60

Печатается по решению Ученого совета Сибирского Института
Физиологии и Биохимии Растений СО РАН

Ответственный редактор
д.б.н., профессор В.К. Войников

Рецензенты:
д.б.н., профессор О.П. Родченко,
д.б.н. Т.П. Побежимова

А.В. Колесниченко, В.К. Войников

К60 Белки низкотемпературного стресса растений / (Отв. ред. В.К. Войников); СО РАН. Сибирский Институт Физиологии и Биохимии Растений (СИФИБР). – Иркутск: Арт-Пресс, 2003. - 196 с.

ISBN 5-98000-005-4

Монография посвящена обзору исследований по одной из важнейших проблем современной физиологии растений – выяснению физиологических и биохимических механизмов адаптации растений к низким температурам. В последние годы установлено, что в ответ на низкотемпературный стресс в растениях происходит синтез специфических, стрессовых, белков. Среди них антифризные белки, регулирующие и предохраняющие клетки растений от повреждения кристаллами льда, молекулярные шейпероны и дегидрины, предохраняющие макромолекулы от повреждения при низкотемпературном стрессе, и стрессовые белки, разобщающие окисление и фосфорилирование в митохондриях во время холодового шока и позволяющие поддерживать в клетках при гипотермии в течение некоторого времени положительную температуру, что дает возможность растению подготовиться к последующему действию отрицательной температуры. Книга предназначена для физиологов и биохимиков растений и студентов высших учебных заведений. Монография подготовлена при поддержке грантов РФФИ 00-04-48093; 01-04-48953 и 02-04-06096.

ISBN 5-98000-005-4

ББК 28.57

СОДЕРЖАНИЕ	
1	ДЕЙСТВИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РАСТЕНИЯ 8
2	ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ 22
2.1	Изменения в содержании нуклеиновых кислот при гипотермии .. 23
2.2	Изменения экспрессии генов при гипотермии 24
2.3	Семейство генов Wcs 120..... 26
2.4	Специфические для низкой температуры гены, гены богатых глицином белков..... 27
2.5	Гены дегидринов и гены, индуцируемые экзогенной абсцизовой кислотой..... 31
2.6	Гены белков, связанных с процессом льдообразования..... 34
2.7	Гены, кодирующие белки, связанные с передачей кальциевых сигналов 34
2.8	Гены белков холодового шока..... 36
2.9	Гены протеинкиназ..... 38
2.10	Гены картофеля, индуцируемые хранением на холоду..... 38
2.11	Гены Y-box белков и белков, регулирующих процессы транскрипции и трансляции..... 40
2.12	Гены, связанные с низкотемпературной акклиматизацией..... 41
3	ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ 50
3.1	Влияние гипотермии на содержание водорастворимых белков в тканях высших растений..... 50
3.2	Влияние гипотермии на содержание водорастворимых белков в тканях бактерий и водорослей..... 57
3.3	Влияние гипотермии на активность и содержание ферментов в тканях высших растений..... 66
3.4	Влияние гипотермии на активность и содержание ферментов бактерий 74
3.5	Влияние гипотермии на содержание мембранных белков..... 76
3.6	Влияние гипотермии на фосфорилирование белков 79
4	СИНТЕЗ БЕЛКОВ ПРИ ГИПОТЕРМИИ 81
4.1	Изучение синтеза белков при помощи радиоактивной метки 81
4.2	Изучение синтеза белков при помощи ингибиторов белкового синтеза 82

4.3	Изучение белкового синтеза в последствии гипотермии	85
4.4	Изучение синтеза белка de novo	86
5	ВЕРОЯТНЫЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ, СИНТЕЗИРУЮЩИХСЯ ПРИ ГИПОТЕРМИИ	90
5.1	Дегидрины и АВА -регулируемые белки.....	91
5.2	Белки, препятствующие льдообразованию (антифризные белки).	95
5.3	Регулируемые холодом белки (COR- белки)	99
5.4	Молекулярные шапероны	101
5.5	Многофункциональные белки, принимающие участие в процессах транскрипции и трансляции.....	103
5.6	Белки, разобщающие окисление и фосфорилирование в митохондриях и вызывающие термогенез во время гипотермии.....	104
6	ВЗАИМОСВЯЗЬ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА С ДРУГИМИ ТИПАМИ СТРЕССА - ОБЕЗВОЖИВАНИЕМ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ	127
7	НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЙ СТРЕСС И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ	131
8	ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В МИТОХОНДРИЯХ.....	134
9	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	143
10	ЛИТЕРАТУРА.....	148

ВВЕДЕНИЕ

«Если бы кто-нибудь задал себе труд статистически проверить, какое слово всего чаще за последнюю четверть века встречалось в устах биологов, то, я не сомневаюсь, оказалось бы, что это слово – приспособление, *Adaptation*, *Anpassung*». Эти слова были написаны К.А. Тимирязевым в 1904 году (цит. по Манойленко, 1974). За прошедшие годы было установлено, что адаптация растений к неблагоприятным низкотемпературным условиям обеспечивается многочисленными физиологическими и биохимическими механизмами. Многие из них к настоящему времени достаточно хорошо изучены. К ним относятся изменения в метаболизме липидов и фосфолипидов и накопление сахаров, которые позволяют избежать смертельного для растительной клетки образования внутриклеточного льда, облегчают отток воды из клетки и предотвращают повреждение клеточных мембран.

Наконец, среди механизмов адаптации растений к неблагоприятной температуре особое место занимает так называемый «ответ на температурный стресс», обеспечивающий синтез ряда стрессовых белков в ответ на изменение температуры (Lindquist, 1986). К настоящему времени уже достаточно хорошо изучены изменения экспрессии генов в ответ на повышение температуры, приводящие к индукции синтеза белков теплового шока. Установлено, что в ответ на резкое повышение температуры среды происходит глобальная перестройка метаболизма клетки, включающая в себя замедление или прекращение синтеза обычных клеточных белков и индукцию синтеза белков, получивших название белки теплового шока (БТШ) или стрессовые белки. Синтез многих видов БТШ происходит и в ответ на другие стрессы, такие как аноксия, обработка этанолом, солями тяжелых металлов и др. (Nover et al., 1984). Индукция синтеза БТШ коррелирует с развитием устойчивости к более жесткому стрессу. БТШ синтезируются как в прокариотической, так и эукариотической клетке и являются одними из самых консервативных из известных белков (Lindquist, 1986). Исследование механизмов, контролирующих экспрессию генов БТШ, дало важную модель изучения регуляции экспрессии генов (Rougvie, Lis, 1988). В то же время синтез стрессовых белков под действием гипотермии по сравнению с другими стрессами все еще гораздо менее изучен. Только в последнее десятилетие

получены данные, свидетельствующие о том, что воздействие низкотемпературного стресса вызывает в растениях синтез специфических, стрессовых, белков, по аналогии с белками теплового шока названных белками холодового шока (Guu, 1990). В настоящее время установлено, что синтез этих белков играет важную роль в приобретении растением устойчивости к действию неблагоприятного температурного фактора. В то же время о структуре и функциях этих стрессовых белков известно значительно меньше, чем о структуре и функциях белков теплового шока. К настоящему времени, кроме ряда ферментов, чувствительных к действию низкотемпературного стресса и изменяющих свои активности и характеристики во время него, выделено несколько групп белков низкотемпературного стресса со специфическими функциями. Во-первых, это молекулярные шапероны и дегидрины, защищающие во время низкотемпературного стресса макромолекулы и мембраны растительной клетки от повреждений, связанных с происходящим обезвоживанием и термоденатурацией макромолекул (Close, 1996). Во вторых, в последние годы у ряда высокоморозостойких растений открыта и изучена группа антифризных белков, выделяемых растительной клеткой в апопласт и межклеточное пространство (Griffith et al., 1993). Антифризные белки, синтезирующиеся во время низкотемпературного стресса, позволяют растению предотвращать образование крупных кристаллов льда при замерзании внеклеточной воды в растении и повреждение ими мембран клеток (Griffith et al., 1992). Наконец, недавно установлено, что у растений имеется механизм защиты от низкотемпературного стресса, связанный с разобщением окисления и фосфорилирования в митохондриях и, как следствие этого, термогенезом, который, как считалось до недавнего времени, существует только у теплокровных животных (Скулачев, 1989). В последние годы в митохондриях растений открыт ряд белков, гомологичных разобщающим белкам животных (Vercesi et al., 1995; Laloi et al., 1997; Jezek et al., 1998).

Изучение физиолого-биохимических механизмов зимостойкости, морозо- и холодоустойчивости культурных растений имеет чрезвычайно большое значение также и в связи с необходимостью преодолеть низкотемпературные ограничения для возделывания ряда ценных в хозяйственном отношении видов и сортов растений. Важность

исследований в этой области определяется не только гибелью сельскохозяйственных культур (или значительным снижением их урожая в отдельные годы), но и тем, что в земледелии в настоящее время используется всего около 7% всей земельной площади, а 93% не осваивается для выращивания культурных растений. Одним из главных препятствий в использовании этой земли являются неблагоприятные климатические условия, в том числе низкие температуры (Колоша, 1979).

Изучение механизмов зимостойкости имеет большое значение потому, что даже небольшие генетические и физиологические изменения устойчивости имеют огромное положительное значение. Увеличение морозостойкости озимой пшеницы всего лишь на 2⁰С может распространить ее производство на обширные площади, используемые сейчас под яровую пшеницу, урожайность которой на 25 - 40% ниже. В то же время имеющимися в данный момент методами очень трудно повысить зимостойкость пшеницы по сравнению с той, которая была достигнута до возникновения научной селекции. Для дальнейшего повышения холодостойкости озимых пшениц необходимо целенаправленно изменять экспрессию соответствующих генов или увеличивать количество копий этих генов в геноме, что, в свою очередь, невозможно без знания биохимических механизмов развития холодоустойчивости растений.

Хотя изучение стрессовых белков растений было начато сравнительно недавно – около двадцати лет назад – к настоящему времени в их изучении достигнут значительный прогресс. Достаточно хорошо изучены белки теплового шока растений, определены их классы и выполняемые этими белками в клетке функции. В то же время, несмотря на то, что за прошедшие двадцать лет и достигнут значительный прогресс в изучении белков низкотемпературного стресса растений, эти белки изучены в меньшей степени. Однако и в их изучении достигнут определенный прогресс, освещению которого и посвящена эта книга.

Таким образом, несмотря на более чем столетний период изучения адаптации растений к неблагоприятным температурам, изучение этого вопроса до сих пор привлекает внимание большого числа исследователей и в настоящее время можно с полным основанием повторить процитированные выше слова Климента Аркадьевича Тимирязева.

1 ДЕЙСТВИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РАСТЕНИЯ

За более чем столетний период изучения действия на клетки растений низких положительных и отрицательных температур знания о вызываемых ими изменениях в метаболизме растительных клеток, а также о свойствах клеток растений, определяющих их морозостойкость, значительно углубились и расширились.

В настоящее время считается, что основными причинами, вызывающими гибель растений от холода, являются или непосредственное действие низких температур на клетки, не связанное с образованием льда в тканях, или же образование льда в тканях снаружи клеток (в межклетниках) либо внутри них (Самыгин, 1969). С одной стороны, было установлено, что внутриклеточное замерзание воды всегда приводит к их немедленной гибели, во всяком случае, в лабораторных условиях, имитирующих природные. С другой стороны, все растения, зимующие в условиях умеренного климата, переносят внеклеточное замерзание значительных количеств воды.

Мгновенное и необратимое повреждение клеток при образовании внутриклеточного льда указывает на физическую природу процесса: вероятнее всего происходит разрушение мембран клетки растущими в протоплазме кристаллами льда (Левитт, 1983). В тоже время, рассматривая причины вымерзания растений, Г.А. Самыгин (1974) отмечает, что в природных условиях очень редко имеет место внутриклеточное образование льда, поскольку оно возможно только при очень быстром снижении температуры, достигающим $10-12^{\circ}\text{C}$ в час. В естественных же условиях температура воздуха снижается со скоростью $1-2^{\circ}\text{C}$ в час или даже еще медленнее. В этом случае происходит внеклеточное образование льда.

Повреждения при образовании льда вне клеток вызываются двумя основными причинами: обезвоживанием протопластов и механическими повреждениями обезвоженной протоплазмы. У закаленных растений преимущественной причиной гибели являются механические повреждения, у незакаленных - обезвоживание протоплазмы (Дроздов и др., 1977).

Обезвоживание растительной клетки имеет ряд опасных для нее последствий, которые могут привести ее к гибели. Это, во-первых, повышение концентрации растворенных веществ, и, прежде всего, солей; во-вторых, изменение рН внутриклеточных растворов; в третьих, образование ковалентных связей между макромолекулами; в четвертых, конформационные изменения структуры макромолекул из-за снижения содержания стабилизирующих их молекул воды; в-пятых, нарушение структуры мембран, и наконец, в шестых, это повреждение структуры протоплазмы при обратном поглощении воды (Левитт, 1983).

Особенно чувствительными структурами клетки, легко повреждающимися под действием гипотермии, являются клеточные мембраны. Функциональная устойчивость липидосодержащих протоплазматических структур, таких как плазмалемма и мембраны хлоропластов и митохондрий, легко нарушается под действием экстремальных температур (Белерадек, 1964). В частности, рядом авторов (Heber, 1967; Santarius, Heber, 1967) было показано, что замораживание вызывает необратимое подавление окислительного фосфорилирования в митохондриях. По их мнению, основной причиной повреждения клетки морозом является нарушение структуры мембран и потеря ими осмотических свойств. По мнению других авторов (Пушкарь, Белоус, 1975), важнейший фактор повреждения мембран при замораживании - их обезвоживание. Удаление воды из мембран при замораживании нарушает равновесие между системами белок - липид и белок - вода, в результате чего возникают структурные перестройки молекулярных слоев и изменяются свойства мембран. Обособление белков от липидов в мембране приводит к полному ее разрушению и в дальнейшем мембранные липиды могут стать субстратом для окисления. Наличие лишь незначительного числа нарушений мембранной структуры вызывает утечку протонов и разобщение окисления и фосфорилирования. Возможно повреждение мембран и без образования льда, когда низкая температура вызывает затверждение липидной части мембраны и нарушение ее структуры и функций.

Впоследствии многочисленные исследования показали сильную зависимость состава мембран растительной клетки от температуры роста растения. В частности, показано, что низкие температуры индуцируют в

растениях разных видов накопление фосфолипидов и повышение ненасыщенности липидов (Нюпиева и др., 1980; Новицкая, Зверкова, 1982; Буколова и др., 1992; Siminovitch et al., 1968; Smolenska, Kuiper, 1977; Horvath et al., 1980). При этом были отмечены различия в содержании фосфолипидов у высоко- и низкородостойких сортов растений. В частности, такие различия были отмечены у высоко- и низкородостойких сортов люцерны (Kuiper, 1970; 1974), а также различающихся по родостойчивости сортов озимой пшеницы (Horvath et al., 1980), при этом наибольшие отличия в фосфолипидном составе листьев высоко- и низкородостойких сортов озимой пшеницы были отмечены после прохождения растением процесса низкотемпературной адаптации. Наиболее важным фактором в этом случае было возрастание доли фосфатидилхолина в составе мембран (Horvath et al., 1980). Сходные результаты были получены и при изучении проростков озимой пшеницы. У проростков, выращенных при 2⁰С, было обнаружено значительно более высокое содержание фосфолипидов, чем у проростков, выращенных при оптимальных температурах (de la Roche et al., 1975). У растений озимой пшеницы наблюдались также генотипические особенности содержания фосфолипидов в узлах кущения. Содержание как суммарных фосфолипидов, так и их отдельных фракций, таких как фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, было выше у морозостойкого сорта (Оканенко, Проценко, 1977). Аналогичные результаты были получены и при изучении липидного состава корней озимой ржи во время роста при пониженных температурах (Clarkson et al., 1980).

Для того, чтобы растения выживали после действия гипотермии, необходимо или предотвращение повреждений от действия внеклеточного или внутриклеточного замерзания, или ликвидация таких повреждений. Это свойство растений, определяемое как морозоустойчивость, должно включать в себя как предотвращение воздействия повреждающих факторов, так и устойчивость к их действию (рис. 1) (Левитт, 1983). Предотвращение воздействия повреждающих факторов возможно следующими путями:

- предотвращение воздействия низкой температуры (из-за пойкилотермной природы растений считается, что этот способ защиты

растений от гипотермии встречается редко, лишь в тех случаях, когда низкая температура действует в течение короткого периода);

- предотвращение замерзания путем высушивания (этот способ возможен лишь для покоящихся структур высших растений);

- предотвращение замерзания нормально гидратированных клеток может осуществляться путем накопления растворимых веществ;



Рис. 1 Возможные пути выживания и устойчивости растений при морозах (цит. по Левитт, 1983).

- предотвращение замерзания вследствие переохлаждения обеспечивает выживание определенных тканей у многих древесных культур;

- предотвращение образования льда внутри клеток у растений обеспечивается различными способами и сохраняет жизнеспособность растений лишь в том случае, если они устойчивы к внеклеточному замерзанию;

- уменьшение количества льда при замерзании воды вне клеток идентично предотвращению обезвоживания при замерзании (Левитт, 1983).

В большинстве случаев для выживания растений недостаточно предотвращения повреждений, а необходима еще и устойчивость к замораживанию некоторых тканей и, вследствие этого, их обезвоживанию (Левитт, 1983). Растение может переносить обезвоживание тканей морозом двумя путями: во-первых, путем предотвращения летального обезвоживания при замерзании посредством действия накопленных растворимых веществ и, во-вторых, повышением устойчивости растений к обезвоживанию при замерзании, обуславливающей высокую морозостойкость тех видов, у которых не наблюдается корреляция между степенью морозоустойчивости и накоплением растворимых соединений.

В отличие от древесных растений, травянистые не входят в конце лета в состояние глубокого покоя. Их ткани, несмотря на вынужденную приостановку роста, сохраняют способность к нему на протяжении всей зимы. В то же время, несмотря на то, что неблагоприятные температурные условия вызывают в их клетках ряд последовательных изменений: снижение водного потенциала, нарушение метаболизма и др. У видов, способных к закаливанию, надземные ткани переносят температуру до $-20...-25^{\circ}\text{C}$ после предварительного воздействия закалывающих условий (Касперска-Палач, 1983).

Закаливание озимых растений происходит в три фазы, которые связаны с различными температурными условиями:

- **первая фаза** закаливания индуцируется снижением температуры до $2 - 5^{\circ}\text{C}$, в результате чего исходная морозостойкость повышается на $4-5^{\circ}\text{C}$;

- **вторая фаза** связана с небольшими морозами (от 0°C до $-2 - -3^{\circ}\text{C}$) и в естественных условиях проходит только в том случае, если температура воздуха снижается ниже 0°C (если температурные условия, предшествующие закаливанию, были благоприятны для роста, то на этой стадии может достигаться максимальная устойчивость тургесцентных тканей);

- **третья фаза** закаливания может совпадать со второй и зависит от продолжительных морозов, вызывающих обезвоживание клеток.

При изучении процессов закаливания различными исследователями было установлено, что во время первой фазы закаливания в растениях происходят изменения метаболических процессов, таких как гидролиз крахмала и накопление редуцирующих сахаров (Касперска-Палач, 1983) и водорастворимых белков (Родченко, 1985; Kasperska-Palacz, Wcislinska, 1972a,б). Другими метаболическими изменениями, которые тоже являются специфическим ответом растительных тканей на понижение температуры среды, являются превращения липидов и фосфолипидов. Установлено, что низкие положительные температуры повышают ненасыщенность жирных кислот (Grenier et al., 1972; Smolenska, Kuiper, 1977). Было также показано, что содержание фосфолипидов (в частности, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина) в тканях растений пшеницы возрастало при низкотемпературном закаливании (de la Roche et al., 1972; Grenier, Willemot, 1974).

Существует ряд доказательств того, что накопление в тканях растений в результате воздействия низких положительных температур некоторых веществ происходит не только вследствие уменьшения их утилизации в ходе ростовых процессов ввиду их приостановки, но и в результате усиления их новообразования (Гриф, 1966; Титов и др., 1992). Увеличение ненасыщенности жирных кислот фосфолипидов в условиях пониженных температур, как было показано, тоже в значительной степени связано с их синтезом (Willemot, 1975). Все эти данные свидетельствуют о том, что на первой фазе закаливания у травянистых растений происходит предпочтительный синтез некоторых метаболитов.

Что касается отрицательных температур, которые необходимы для прохождения второй фазы закаливания, то предполагается, что их роль в процессе закаливания не сводится только к физическому (обезвоживающему) действию. По-видимому, она также связана с некоторыми метаболическими процессами, протекающими при этих температурах (Касперска-Палач, 1983).

Поскольку прекращение роста растений является необходимым условием прохождения первой фазы закаливания, то метаболические изменения, происходящие в это время, могут быть вызваны изменением гормонального и энергетического баланса (рис. 2).

Принимая во внимание тот факт, что внеклеточное замерзание предотвращает образование внутриклеточного льда, но вызывает при этом обезвоживание макромолекулярных структур клетки, предполагается, что процесс закаливания включает в себя следующие механизмы:

- усиление оттока воды из клетки через мембраны;
- защита клеточных компонентов от действия обезвоживания.

Обеспечение оттока воды через мембраны может обеспечиваться путем повышения ненасыщенности липидов (de la Roche et. al., 1972; Smolenska, Kuiper, 1977). Изменения содержания фосфолипидов также влияют на свойства мембран и повышают их проницаемость для воды, а быстрое снижение содержания фосфолипидов при замораживании вызывает усиленный отток воды в межклетники и защищает клетку от внутриклеточного льдообразования (Касперска-Палач, 1983).

При действии мороза повреждения, вызываемые обезвоживанием у закаленных растений, могут быть предотвращены следующими путями:

- структурными и конформационными изменениями компонентов клетки, которые они претерпевают в процессе закаливания (при этом происходит как переход макромолекул в устойчивые, выдерживающие сильное обезвоживание, формы, так и индуцируемый гипотермией синтез специфических макромолекул, устойчивых к обезвоживанию);
- защитой компонентов клетки от обезвоживания взаимодействием с низкомолекулярными веществами.

Хотя и установлено, что под действием гипотермии у травянистых растений происходят изменения активности некоторых ферментов (Файзулин, Лукманова, 1987; Жибоедов и др., 1994; Makinen, Stegemann, 1981; Crespi et al., 1991), имеется относительно немного экспериментальных доказательств трансформации белковых макромолекул, которые бы вели к повышению их устойчивости к низкой температуре. В то же время показано большое значение происходящего во время закаливания растений торможения роста для использования белков, синтезированных в процессе закаливания, на структурную и функциональную реорганизацию клеток (Родченко, 1988а,б).

Исследование процессов холодовой адаптации древесных растений на молекулярном уровне ограничивается наложением на процессы развития холодоустойчивости событий, связанных со входом растения в состояние

покоя. R.A. Salzman с соавторами (Salzman et al., 1996), используя в качестве объекта исследования виноград (*Vitis labrucana* L., cv. Concord), создали систему, в которой развитие состояния покоя могло быть индуцировано отдельно от холодовой акклиматизации. С использованием этой системы было охарактеризовано дифференциальное накопление ряда белков в почках винограда во время реализации программы нормального входа в состояние покоя совместно с холодовой акклиматизацией и в почках, которые входили только в состояние покоя. Было установлено, что белок с молекулярной массой 47 кДа накапливался в почках винограда во время входа в состояние покоя без холодовой акклиматизации до уровня содержания белка, обнаруженного в находящихся в состоянии покоя и закаленных почках, но не накапливался в закаленных почках, не вошедших в состояние покоя. В то же время 27 кДа LEA-подобный белок накапливался только в закаленных почках. Следовательно, 47 кДа гликопротеин является связанным с состоянием покоя, но не связанным с развитием холодовой акклиматизации, в то время как 27 кДа LEA-подобный белок, по-видимому, более специфичен для холодового закаливания (Salzman et al., 1996).

Большое значение в регуляции холодо- и морозоустойчивости растений играет абсцизовая кислота. Установлено, что при закаливании растений содержание эндогенной абсцизовой кислоты значительно возрастает, в частности, при закаливании способного к холодовой адаптации вида картофеля *Solanum commersonii* содержание эндогенной абсцизовой кислоты возрастало в 2,5 раза (Chen et al., 1983). У мутанта *Arabidopsis thaliana*, имеющего низкий уровень содержания эндогенной абсцизовой кислоты, по сравнению с диким типом отсутствовала или была резко снижена способность к холодовой адаптации (Heino et al., 1990; Gilmor, Thomashow, 1991). В то же время обработка этого мутанта экзогенной абсцизовой кислотой приводила к появлению эффекта адаптации растений к холоду (Heino et al., 1990). При этом была показана взаимосвязь между экспрессией регулируемых холодом (COR - cold regulated) и регулируемых абсцизовой кислотой генов (Koornneef et al., 1989).

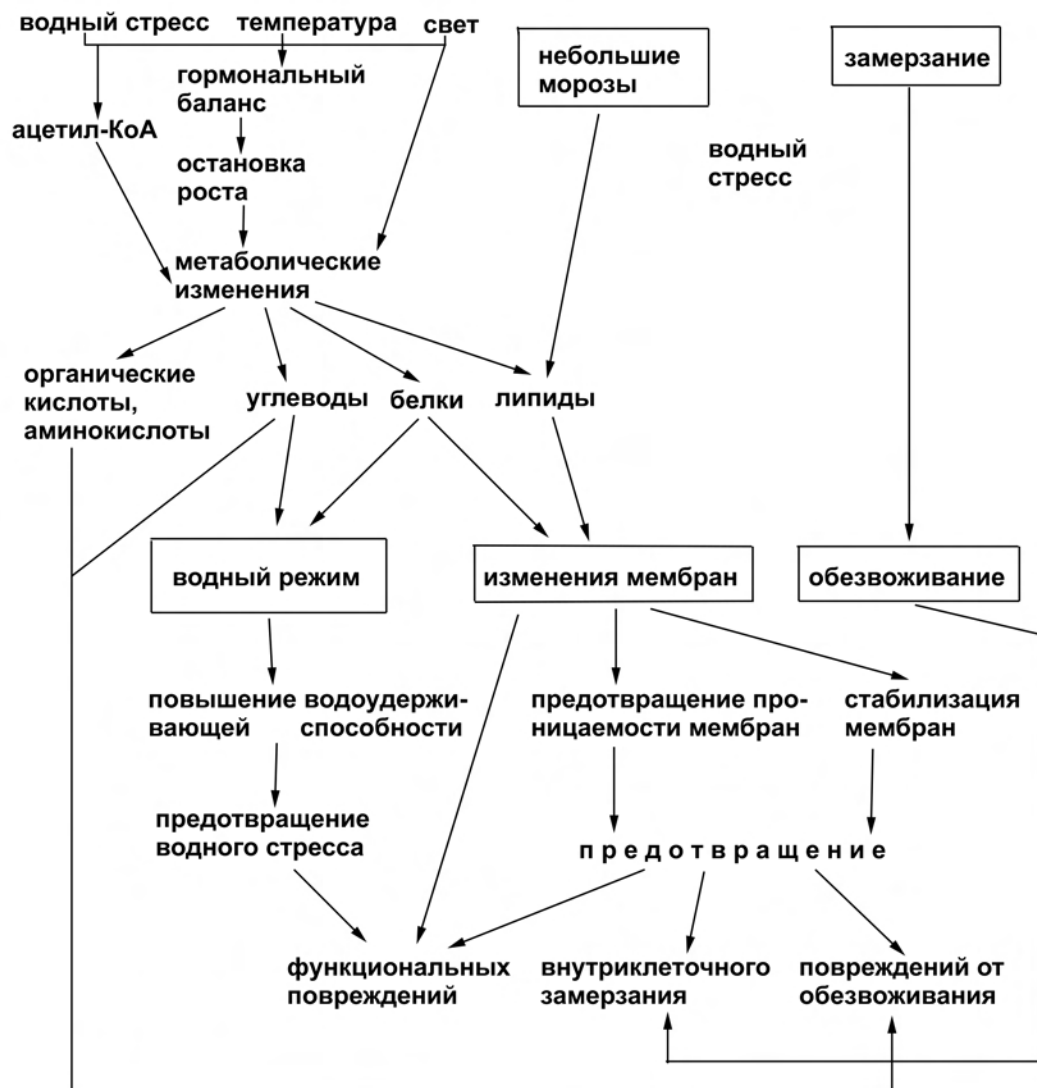


Рис. 2 Схема процессов закаливания по Касперска-Палач, 1983.

Аналогичные результаты были получены и при изучении других видов растений. Было проведено определение морозоустойчивости побегов, корней и тканей эпикотили гороха (*Pisum sativum*) сорта Alaska двух генотипов: дефицитного по содержанию абсцизовой кислоты мутанта “wil” и его дикого типа при различных типах стресса (холодовая акклиматизация при +2°C, дегидратация/регидратация, помещение в 10⁻⁴ М раствор абсцизовой кислоты и раззакаливании растений при 25°C). В ходе исследований спектры белков изучались при помощи двумерного SDS-

PAGE электрофореза. При этом было установлено, что холодовая обработка индуцировала образование семи белков в побегах, трех - в эпикотиле и двух - в корнях гороха. В тканях побегов пять из семи новых белков накапливались также в ответ на обработку абсцизовой кислотой. Полипептид с молекулярной массой 24 кДа продуцировался и в мутантных, и в «диких» проростках и тканях эпикотиля только после холодовой обработки (Welbaum et al., 1997)

Таким образом, существенным этапом перехода от стрессовых к адаптационным реакциям является изменение экспрессии генов, выражающееся в ингибировании активных генов, в норме контролирующих рост, развитие и фотосинтез. При этом активируется система генов контроля за устойчивостью: происходит синтез новых белков, специфических адаптогенов и стресс-протекторов. Завершается эта перестройка структурными изменениями в организме растения (рис. 3) (Саляев, Кефели, 1988).

Успешное зимнее выживание вечнозеленых травянистых растений, подобных белому клеверу, зависит от соответствующей синхронизации процессов как закаливания, так и раззакаливания. Изучение регулирования этих процессов было проведено у двух сортов белого клевера (*Trifolium repens* L.) “AberCrest” и “AberHerald” и двух его норвежских экотипов (“Saerheim” - южном и “Bodo” - северном). Для проведения закаливания и раззакаливания растения экспонировались при контролируемых температурных условиях. Низкотемпературное закаливание столонов проводилось путем программируемого снижения температуры со скоростью 3⁰С в час. Во время эксперимента анализировались содержание крахмала, растворимых сахаров и растворимых аминокислот в столонах. Сорта AberCrest и AberHerald, происходящие из Великобритании и выбранные для контроля скорости роста при низкой температуре и степени зимнего закаливания, были значительно менее устойчивы, чем норвежские популяции. После шести недель закаливания (2 недели при 6⁰С и 4 недели при 0.5⁰С) величины LT₅₀ были: -13.8, -13.0, -17.8 и -20.3⁰С для AberCrest, AberHerald, Saerheim и Bodo, соответственно. Степень раззакаливания растений увеличивалась с повышением температуры. В условиях действия низкой температуры (6⁰С) северный экотип из Bodo был более устойчив к раззакаливанию, чем AberHerald. Тем не менее, при 18⁰С абсолютный

уровень раззакаливания ($^{\circ}\text{C}/\text{день}$) у растений экотипа Bodo был в два раза выше, чем у растений AberHerald. Удлинение столонов в растениях AberHerald начиналось во время раззакаливания при более низких температурах, чем в растениях экотипа Bodo. Содержание общих растворимых сахаров, сахарозы и аминокислот пролина и аргинина было значительно выше в закаленных растениях экотипа Bodo, чем в растениях сорта AberHerald. Уровень сахарозы уменьшался в течение раззакаливания. Корреляция между содержанием сахарозы и LT_{50} в течение этого процесса была статистически достоверной (Svenning et al., 1997).

Установлено, что одним из криопротекторов в растениях является глицинбетаин. Это вещество накапливается в хлоропластах определенных солеустойчивых растений при солевом или холодовом стрессах. Ген *codA* для холиноксидазы, преобразовывающей холин в глицинбетаин, был клонирован в почвенной бактерии *Arthrobacter globiformis*. Трансформация *Arabidopsis thaliana* с клонированным геном *codA* под управлением 35S промотора мозаичного вируса цветной капусты позволила растению накапливать глицинбетаин и увеличить устойчивость к солевому и холодовому стрессам. Значительная часть семян трансформированных растений хорошо проросла в 300 мМ NaCl, в то время как семена растений дикого генотипа в данных условиях не проросли. В растворе NaCl (100 мМ) трансформированные растения хорошо росли, в то время как растения дикого типа не были способны расти в данных условиях (Hayashi et al., 1997). Трансформированные растения были способны переносить концентрацию 200 мМ NaCl, которая была летальной для растений дикого типа. После того, как растения были инкубированы в течение двух дней в растворе с повышенной концентрацией NaCl (400 мМ), активность фотосистемы II растений дикого типа была почти полностью подавлена, в то время как в трансформированных растениях она составляла более 50% от исходного уровня. После обработки растений низкой температурой на свету в листьях дикого типа наблюдались симптомы хлороза, в то время как у трансформированных растений они отсутствовали. Эти наблюдения показывают, что генетическая трансформация, позволяющая накапливать глицинбетаин *Arabidopsis*

thaliana, увеличивает способность растения переносить солевой и низкотемпературный стрессы (Hayashi et al., 1997).

Было изучено влияние низкой температуры (-2°C , 6 ч) на биосинтез полиаминов в листьях, стеблях и корнях разновидностей озимой пшеницы с различной морозоустойчивостью. Оказалось, что в этих условиях происходит заметное накопление полиаминов. Кроме того, обнаружен эффект 5А и 7А хромосом пшеницы, содержащих основные гены, ответственные за морозоустойчивость, на синтез полиаминов, происходящий в различных частях проростков в течение длительных периодов холодной обработки (Rasz et al., 1996).

Для того, чтобы определить, будет ли система *in vitro* подходить для изучения зимнего покоя и закаливания у древесных растений, культивируемые *in vitro* растения ирги ольхолистной (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) были подвергнуты различной гормональной обработке, индукции

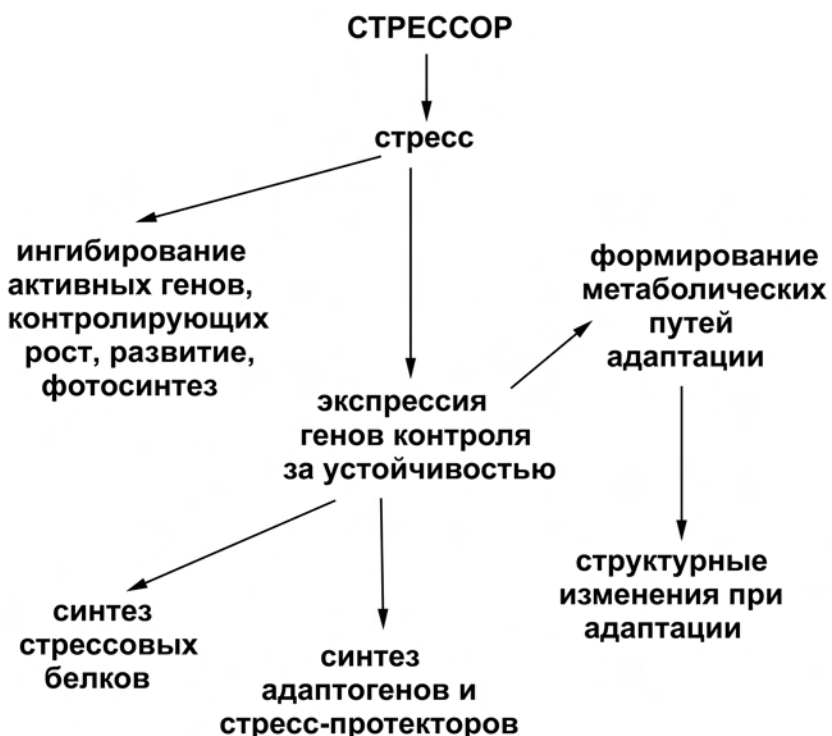


Рис. 3. Схема реакции растения на действие стрессового фактора (цит. по Саляев, Кефели, 1988).

зимнего покоя и акклиматизации к низким температурам. Низкие температуры вызвали значительное повышение уровня холодоустойчивости растений (до -27°C после 6 недель закаливания при 4°C), но она не приблизилась к уровню холодоустойчивости полностью закаленных почек, которые способны переносить температуру жидкого азота. Контрольные растения в данном эксперименте полностью гибли при -5°C . Значительный уровень закаленности был достигнут при действии низких температур и при коротком, и при длинном дне. Предварительная обработка низкой температурой при типичном для древесных растений режиме короткого фотопериода незначительно увеличила степень акклиматизации в этих растениях. Присутствие или отсутствие фитогормонов в среде имеет выраженное влияние на холодовую акклиматизацию растений. Безгормональная среда после 2 недель обработки увеличила холодоустойчивость до -10.5°C . Добавление в среду абсцизовой кислоты увеличило уровень холодовой закаленности (-12°C), в то время как добавление бензиламинопурина к безгормональной среде уменьшило закаленность до -5.3°C . Сочетание обработок бензиламинопурином и абсцизовой кислотой изменяло значения LT_{50} до промежуточных между индивидуальными обработками любым гормоном. Напротив, х-нафталенацетиловая кислота не снижала индуцированную абсцизовой кислотой закаленность. Обработка абсцизовой кислотой, как таковая, не была способна закалить растения до уровня, достигаемого при акклиматизирующем действии низкой температуры. Далее, абсцизовая кислота не могла поддерживать уровень закаленности после холодовой акклиматизации и растения деакклиматизировались до 9°C на среде бензиламинопурин + абсцизовая кислота. Культивирование в ней значительно увеличивало закаленность к холоду в растениях (до -9°C на среде бензиламинопурин + х-нафталенацетиловая кислота в течение 3 дней после культивирования), но впоследствии растения раззакаливались до -5°C (Baldwin et al., 1998).

Были изучены эффекты прекультивирования с сахарами на морозоустойчивость, содержание сахаров и воды и структуру клеток концов побегов спаржи (*Asparagus officinalis* L.). Морозоустойчивость концов побегов повышалось после 48-часового прекультивирования на среде с высокой концентрацией сахара. Оптимальная для повышения

морозостойкости концентрация сахара в середине прекультивирования была 0.5 М, независимо от типа использованного сахара. Результаты анализа содержания сахара и воды позволили считать, что обезвоживание клеток в концах побегов и поглощение сахара из среды происходило в течение прекультивирования. Было установлено, что потребленные во время прекультивирования концами побегов фруктоза, глюкоза и сахароза метаболизировались в другие типы сахаров, в то время как сорбитол нет. Предполагаемые концентрации сахаров в прекультивированных концах побегов, за исключением случая добавления сахарозы, были примерно одинаковыми в середине прекультивирования. После прекультивирования в среде с добавлением 0.5 М глюкозы, в концах побегов выживали только некоторые из меристематических выступов и листовых примордиев. Мертвые клетки, в которых органеллы были полностью уничтожены, по-видимому, были плазмолизированы в гипертонической среде в очень значительной степени. Серьезный плазмолиз может быть последствием возможного повреждения от обезвоживания. В выживших клетках наблюдались много развитых пластид, содержащих зерна крахмала, и большое количество шероховатого эндоплазматического ретикулума, развившегося в цитозоле. Предполагается, что потребление сахаров и обезвоживание, происходящее в клетках в течение прекультивирования, связано с последующим увеличением морозоустойчивости прекультивированных концов побегов (Suzuki et al., 1997).

Известно, что многие гены вовлечены не только в процессы адаптации растений к низким температурам, но и индуцируются в ответ на другие типы стресса. Для идентификации генов, вовлеченных в защиту от стресса, вызванного воздействием тяжелых металлов, из обработанных хлоридом ртути листьев кукурузы (*Zea mays* L., cv. INRA 258) была создана библиотека кДНК и проведен ее анализ путем дифференциального скрининга с использованием кДНК к ДНК обработанных и необработанных хлоридом ртути растений. В результате были выделены и охарактеризованы транскрипционно активированные клоны кДНК, обозначенные СНЕМ (chemically-activated). Данные клоны представляют собой гены, кодирующие большое количество известных белков, таких, как белки, богатые глицином, белки, связанные с патогенезом, шапероны и мембранные белки. Экспрессия генов, кодирующих эти белки, изучена у

растений кукурузы, подвергнутых разным видам абиотического стресса. При этом установлено, что экспрессия богатых глицином белков значительно увеличивается при тепловом стрессе, а также стимулируется высокой концентрацией NaCl, загрязненной дождевой водой, раневым и холодовым стрессами. Белки, связанные с патогенезом, значительно индуцируются ультрафиолетовым облучением и в меньшей степени высокой концентрацией NaCl, загрязненной дождевой водой и раневым стрессом. Белки теплового шока в основном индуцируются теплом и холодом, а также убиквитином. Экспрессия мембранных канальных белков стимулируется тепловым шоком, NaCl, загрязненной дождевой водой и ультрафиолетовым облучением (Didierjean et al., 1996).

Таким образом, на основании имеющихся в литературе данных о действии на растения низкотемпературного стресса, можно сделать вывод, что, наряду с сахарами и гормонами, изменения в экспрессии генов, и, как следствие этого, изменения в содержании белков, должны играть важную роль в процессах, позволяющих клеткам выживать и функционировать при низких температурах, а накопление специфических белков с самого начала действия низкой температуры является одним из механизмов, защищающих растения от повреждения гипотермией. В связи с этим далее можно перейти к рассмотрению имеющихся в литературе данных о влиянии гипотермии на экспрессию генов, содержании белков в тканях растений и о функциях специфических (стрессовых) белков при гипотермии. Так как изменения в содержании белков во время гипотермии являются, большей частью, следствием изменения экспрессии генов, необходимо рассмотреть имеющиеся к настоящему времени данные об экспрессии генов при гипотермии.

2 ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ

Количественные и качественные преобразования белков растений при снижении температуры предполагают индукцию или репрессию их синтеза. Необходимые доказательства правомерности такого заключения были получены при изучении отдельных стадий белкового синтеза. Первая из них - транскрипция.

2.1 Изменения в содержании нуклеиновых кислот при гипотермии

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что, по сравнению с нормальными условиями, содержание ДНК при гипотермии меняется незначительно (Gusta, Weiser, 1972). Исследование возможности синтеза нуклеиновых кислот в ядрах клеток скерды волокнистой и триллиума во время охлаждения до температур, близких к 0°C, показало, что в этих условиях идет активное включение меченых соединений (¹⁴C-аденина, ³H-тимидина) (Гриф, 1966). Включение метки становилось значительно интенсивнее при небольшом повышении температуры (до 1 - 2°C), либо при увеличении экспозиции (до 48 часов) (Гриф, 1966). Цитофотометрический анализ содержания ДНК-фуксина в корневой меристеме семян озимых злаков показал, что охлаждение снижает репликативную и метаболическую активности хроматина (Савин, Никитина, 1983). Способность хроматина поддерживать синтез РНК даже в присутствии эндогенного источника РНК-полимеразы заметно подавляется при охлаждении бобов. Возможно, это связано с тем, что при снижении температуры уменьшается доступность матрицы ДНК для полимеразы (Браун, 1983).

В дальнейших исследованиях было подтверждено положение о том, что содержание ДНК при гипотермии изменяется мало, а все изменения в метаболизме нуклеиновых кислот касаются, в основном, РНК. Показано, что низкотемпературная акклиматизация сопровождается увеличением содержания РНК, расхождения в данных о метаболизме ДНК, по-видимому, зависят от того, вычисляется ли содержание ДНК на единицу сырого или сухого веса. В некоторых случаях отмечаются связанные с гипотермией изменения в содержании транспортных РНК (Sarhan, D'Aoust, 1975), однако эти изменения наблюдались не всеми авторами (Gusta, Weiser, 1972). Кроме того, имеются данные об изменении активности тРНК и аминоксил-тРНК-синтетазы во время закаливания растения (Tao, Khan, 1974; Yang, Brown, 1974), что свидетельствует о регуляции в этих условиях синтеза белка на уровне трансляции (Браун, 1983).

2.2 *Изменения экспрессии генов при гипотермии*

Как известно, в клетках растений, насекомых, млекопитающих как тепловой, так и холодовой шок вызывает изменения в активности генов (Ashburner, Bonner, 1979; Tanguay, 1983; Guy et al, 1985; Tseng, Li, 1990). При этом начинается синтез небольшого числа «белков теплового шока» и прекращается (или сильно замедляется) синтез всех остальных белков. Вероятно, в упомянутых в предыдущем разделе работах (Браун, 1983; Савин, Никитина, 1983) зарегистрирована репрессия при холодовом шоке активности большинства генов, функционирующих в «нормальных» условиях. Если продолжить аналогию между тепловым и холодовым шоками, то следует ожидать, что при понижении температуры в определенных границах начнут функционировать специфические гены (Guy et al., 1985). В этой связи становится понятной противоречивость данных об изменении содержания РНК при гипотермии. Значительная часть авторов указывает, что во время охлаждения и холодового закаливания у растений повышается общее содержание РНК (Jung et al., 1967; Oslung, Li, 1972; Vigue et al., 1974; Chen, Li, 1977), но имеются и противоположные результаты (Scholtissek, 1967; Лебедев, Комарницкий, 1971). Изучение специфических видов РНК после фракционирования показало относительное повышение содержания РНК, действующей на уровне трансляции (имеются в виду, прежде всего, рибосомальные РНК) (Gusta, Weiser, 1972). Низкотемпературное закаливание растения приводит к структурным изменениям в рибосомах (Vixby, Brown, 1975).

Ч. Гай с соавт. (Guy et al., 1985). привели прямое доказательство того, что гипотермия индуцирует изменения в экспрессии генов. Используя трансляцию в бесклеточной системе, они показали, что под действием низких положительных температур (5°C) происходит быстрое и стабильное изменение набора поли(А)⁺мРНК, выражающееся в появлении специфических РНК холодового стресса. Изменение набора поли(А)⁺мРНК происходило уже в первые сутки закаливания, при этом начиналось развитие холодоустойчивости, (она достигала максимума на 14-21 сутки закаливания). С началом развития устойчивости коррелировало появление двух мРНК, которые в бесклеточной системе определяют синтез белков холодового шока с молекулярными массами 82 и 180 кДа. В последующие 8 суток продолжается изменение состава мРНК: содержание четырех

мРНК увеличивается, а трех - значительно уменьшается. Большая часть белков, синтез которых индуцировался гипотермией, не идентична по молекулярным массам и рI белкам теплового шока (Guy et al., 1985). Таким образом, это сообщение является одним из первых свидетельств существования в растениях белков холодового шока (БХШ), отличных от белков теплового шока (БТШ).

Быстрое изменение набора мРНК с началом холодового закаливания было впоследствии подтверждено другими исследователями (Mohapatra et al., 1987; Hahn, Walbot, 1989; Tseng, Li, 1990). Так, было показано (Mohapatra et al., 1987), что двухдневная экспозиция проростков люцерны при 4⁰С приводит к резкому увеличению содержания общего количества РНК и к изменению состава транслируемых мРНК. Трансляция *in vitro* поли(А)⁺мРНК, с последующим электрофорезом меченых полипептидов, показала индукцию синтеза низко- и высокомолекулярных белков холодового шока. При переносе растений в условия с «нормальной» температурой происходило обратное изменение спектра полипептидов и, следовательно, набора мРНК. Показано, что мРНК, индуцируемые охлаждением, накапливаются с различной скоростью. При трансляции *in vitro* обнаружены группы белков с различной индукцией синтеза *de novo* - от 6 до 12 часов, а также белки, содержание которых при холодовом закаливании снижается (Cattiveli, Bartels, 1989).

В последующие годы изучение изменений в синтезе РНК при низкотемпературном стрессе привлекло особое внимание исследователей. К настоящему времени выделено и охарактеризовано значительное число мРНК, экспрессирующихся при низкотемпературном стрессе и в процессе адаптации растения к низким температурам. В частности, установлено, что, например, в люцерне во время холодовой акклиматизации накапливаются две мРНК, MsaCiA и MsaCiB, которые кодируют белки, содержащие богатые глицином мотивы. Слитые полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, выведенные на основании этих мРНК, продуцировались в *E. coli* и были использованы для получения антител. Полученные антитела обладали кросс-реактивной специфичностью с растворимыми полипептидами MsaCiA и MsaCiB, соответственно. Эти полипептиды обнаруживались только в верхушках закаленных растений, хотя во время холодовой акклиматизации мРНК для

MsaCiA накапливалась как в верхушках, так и в стеблях. Анализ белков при помощи вестерн-блоттинга показал, что MsaCiA-подобные белки с молекулярными массами 32, 41 и 68 кДа накапливались в клеточных стенках стеблей, и один, с молекулярной массой 59 кДа, - в клеточных стенках побегов. Показано, что эта дифференциальная экспрессия включает как транскрипционную, так и посттрансляционную регуляцию. Сравнение, проведенное между шестью сортами люцерны с контрастной морозоустойчивостью, подтверждает то, что способность накапливать до значительного уровня белки, подобные MsaCiA и MsaCiB, может быть связана с устойчивостью растения к низким температурам (Ferullo et al., 1997).

В ходе исследований экспрессии генов при низких температурах было выявлено несколько групп генов, экспрессия которых индуцируется холодовым шоком и адаптацией растения к низким температурам. Далее будут рассмотрены основные семейства таких генов.

2.3 Семейство генов *Wcs 120*

Озимые, по сравнению с яровыми злаками, обладают эффективными механизмами акклиматизации, которые позволяют им перезимовывать и выживать при температуре замерзания почвы. Это различие генетически запрограммировано и включает в себя сложную генетическую систему. Чтобы понять характер данной системы и ее регуляцию низкими температурами, были идентифицированы и охарактеризованы гены пшеницы (*Triticum aestivum* L.), устойчивой к замерзанию почвы. В ходе этих исследований установлено, что семейство гена *wcs120* кодирует группу белков с молекулярными массами от 12 до 200 кД. Как показано при помощи биохимических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических анализов, данное семейство генов, специфическое у *Poaceae*, весьма многочисленно и координированно регулируется низкими температурами. Более того, накопление белков WCS прямо коррелирует с уровнем устойчивости растений к замерзанию почвы. Эти анализы обнаружили также регуляторный контроль процесса яровизации при экспрессии генов низкой температуры у озимых злаков (Sarhan et al., 1997).

Индукцируемые низкой температурой у пшеницы гены семейства *wcs120* были картированы с использованием вестерн- и Саузерн-блоттинга

на дителоцентрических сериях сорта Chines Spring. Идентифицированные гены были локализованы в длинных участках гомологичных групп 6-х хромосом всех трех геномов (A, B и D) гексаплоидной пшеницы. Близкие виды, также несущие A, AB или D геномы также исследовались с использованием вестерн- и Саузерн-блоттинга с wcs120- зондами и WCS120- антителами. Все близкородственные виды несли один или более геномов гексаплоидной пшеницы и продуцировали 50 кДа белок, реагирующий с антителами и определяемый при помощи вестерн-блоттинга, и wcs120-гомологи, которые определялись при помощи Саузерн-блоттинга во всех видах. Отсутствие участка 6DL хромосомы в гексаплоидной пшенице сорта Chines Spring вызывало отсутствие синтеза 50 кДа белка, что не только указывало на локализацию wcs120 в данном участке 6DL-хромосомы, но также и подтвердило молчание wcs120-гомологов в 6A хромосоме. Были также исследованы содержание белков, реагирующих с антителами на WCS120, и уровни холодоустойчивости в сериях линий с заменой хромосом сорта Chines Spring на хромосомы сорта Cheyenne. В ходе экспериментов было установлено, что 5A хромосома сорта Cheyenne увеличивала холодоустойчивость пшеницы сорта Chines Spring. Денситометрия вестерн-блоттингов для определения содержания белка показала, что хромосома 5A имеет регуляторный эффект на экспрессию гена семейства wcs120, располагающегося на хромосомах 6-ой группы всех трех геномов гексаплоидной пшеницы (Limin et al., 1997).

2.4 Специфические для низкой температуры гены, гены богатых глицином белков

Специфическая для низкой температуры (2 °C) кДНК пшеницы рTACR7, представляет ген, определенный как *tacr7* из озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L. Cv. Winoka). Термин низкотемпературно-специфический (LTS) используется авторами, поскольку экспрессия гена *tacr7* не вызывается обработкой экзогенной абсцизовой кислотой или другими типами стресса, такими, как солевой стресс, обезвоживание и тепловой стресс. РTACR7 был выделен при помощи олигонуклеотидного зонда, сходного с рHVCR8 (номер в генетическом банке L28091) из ячменя посредством RT-PCR с мРНК из ткани побегов пшеницы. На основании предсказанной аминокислотной последовательности были определены

характеристики этого белка. Установлено, что TACR7 очень гидрофобный белок, с единственной трансмембранной областью и богат лейцином (19%). Изучение уровней содержания копий *tacr7* показало их накопление в проростках пшеницы, верхушечной ткани и каллусной культуре после переноса объектов из контрольных условий (25⁰С) на холод (2⁰С). В ходе экспериментов наблюдалось отсутствие обнаруживаемых нозерн-гибридизацией транскриптов *pTACR7* в проростках или каллусах, обработанных экзогенной абсцизовой кислотой, после солевого стресса, обезвоживания или теплового стресса. Транскрипты *tacr7* накапливались в ткани меристемы во время экспонирования при 2⁰С в большей степени в холодоустойчивой озимой пшенице (SD(mut)16029), чем холодочувствительной (SD(mut)16169) с наибольшим различием между генотипами (около 30%±3%) на третьей неделе закаливания. Таким образом, кодируемый *tacr7* белок по своим характеристикам уникален среди описанных в литературе индуцируемых низкой температурой белков пшеницы (Gana et al., 1997).

При изучении мутации сердцевины пентамера CCGAC двух предполагаемых индуцируемых низкой температурой элементов в 5'-области индуцируемого холодом гена BN115 озимого рапса (*Brassica napus*) при помощи анализа нерезидентной экспрессии равнодействующих мутированных слияний BN115-промотор-GUS было установлено уменьшение низкотемпературного регулирования промотора. Это указывает на то, что последовательность CCGAC в гене BN115 является чрезвычайно важной для его ответа на низкую температуру. Напротив, мутация двух G-боксов CACGTG, находящихся между индуцируемыми низкой температурой элементами в той же области промотора, не изменила индуцируемую холодом экспрессию гена. Замена возможной области энхансера промотора BN115 на энхансер из промотора CaMV 35S выразилась в увеличении уровня низкотемпературной индукции экспрессии GUS (Jiang et al., 1996).

При изучении кДНК ячменя были получены ген-специфические зонды (с 3' конца кДНК), кодирующие два типа глицин-богатых белков: HvGRP2, характеризующийся цитокератин-подобной и цистеин-богатой областями, и HvGRP3, чья основная особенность – наличие РНК-связывающей области. В ходе исследования было установлено, что экспрессия генов HvGRP2 и

HVGRP3, которые присутствуют в одной или двух копиях на каждый гаплоидный геном, была повсеместной, и было показано, что ген HVGRP3 модулируется изменением условий освещения. Холодовое воздействие также увеличивало уровни содержания мРНК HvGRP2 и HVGRP3 (Molina et al., 1997).

При изучении действия окружающей среды на экспрессию индуцируемых холодом генов на уровне изменения содержания мРНК и тестировании взаимосвязи экспрессии генов и холодной акклиматизации растений ячменя (*Hordeum vulgare* L. Cv. Igri) в фазе третьего и четвертого листа было проведено несколько вариантов опыта. В первом варианте растения были выращены в различных температурных условиях между 20/15⁰С и +4/-4⁰С, во втором варианте растения были перенесены с температуры 20/15⁰С на температуру 6/2⁰С и в третьем варианте опыта растения были выращены в условиях засухи или недостатка питательных веществ. В ходе экспериментов измерялись при помощи метода отрастания морозоустойчивость растений и уровни содержания мРНК для трех индуцируемых холодом генов: blt4.9, blt14 и blt101 из меристематических тканей побегов. Результаты экспериментов показывают, что закаленность растений и уровни экспрессии мРНК генов blt4.9, blt14 и blt101 повышались при более низких температурах роста. В ходе экспериментов было также установлено, что на степень изменения содержания мРНК этих генов в ответ на изменение температуры среды значительное влияние оказывали предшествующие температурные условия и возраст растения. При этом уровень закаленности растений сильно коррелировал с уровнями содержания мРНК этих генов в растениях, выращенных в различных температурных условиях. Эта корреляция не распространялась на растения, подвергнутые действию недостатка питательных веществ или засухи (Pearce et al., 1996).

При изучении влияния низкой температуры на экспрессию генов в *Poncirus trifoliata* из закаленных к холоду растений были клонированы шесть кДНК, представляющие уникальные индуцируемые холодом последовательности. В ходе экспериментов было обнаружено, что гены rbcorc115 и rbcorc119 принадлежат к одному семейству генов. Данные сиквенса указывают на то, что rbcorc115 и rbcorc119 содержат открытую рамку считывания, кодирующую полипептид с молекулярной массой 19.8

кДа (COR19) и полипептид с меньшей молекулярной массой 11.4 кДа (COR11), соответственно. Анализ предсказанной аминокислотной последовательности обнаружил три больших повтора в COR19 и только один повтор в COR11. В каждом повторе были выявлены два элемента – Q-кластеризованный тракт и К-богатый мотив. К-богатый мотив был сходен с подобными мотивами у белков класса D-II из хлопка и группы 2 белков LEA. Сериновый кластер, характерный для многих сходных с группой 2 LEA белков, также был найден в этих белках. В то же время было обнаружено, что в них он находился в необычном положении относительно карбокси-конца. В COR19 и COR11 также присутствовал двусторонний мотив основных остатков, сходных с известными ядерными маркерными последовательностями, что позволяет предположить, что члены данного семейства белков могут иметь ядерную маркерную функцию. В ходе экспериментов авторами была исследована экспрессия мРНК COR19 в ответ на холодовую акклиматизацию, засуху, затопление и засоление. Результаты показали, что экспрессия COR19 в ткани листа индуцировалась в ответ на холодовую акклиматизацию, но подавлялась во время засухи и затопления (Cai et al., 1995).

W. Goodwin с соавторами при изучении озимого рапса (*Brassica napus*) изолировали кДНК и выделили ген, кодирующий гибридный богатый пролином белок. Предполагаемый белок по структуре является модульным. При анализе его аминокислотной последовательности установлено, что N-терминальная область данного белка имеет свойства сигнального пептида, который может направлять белок в эндоплазматический ретикулум. Последовательность аминокислот от 27 до 287 имеет три области, которые содержат высокие уровни содержания пролина и нескольких других аминокислот, часто встречающихся в богатых пролином белках клеточной стенки. Эти области характеризуются повторяющимся аминокислотным мотивом. С-терминальная область (аминокислоты от 288 до 376) содержит три предполагаемых мембранно-связывающих участка и имеет высокую степень сходства с аминокислотами некоторых разновидностей гибридных богатых пролином белков. На основе этих данных авторы делают вывод, что данный белок секретируется из клетки, размещается в клеточной стенке и заякоривается в плазматической мембране посредством С-терминальной области. В ходе

экспериментов установлено, что транскрипты, кодирующие данный белок, индуцируются в ткани листа в течение 8 ч обработки холодом и их содержание быстро снижается при возвращении растения к нормальным температурам. В то же время установлено, что транскрипты не индуцируются тепловым шоком, обезвоживанием, экзогенной абсцизовой кислотой или раневым стрессом, тогда как транскрипты контрольного гена *B. napus* индуцируются обезвоживанием и экзогенной абсцизовой кислотой (Goodwin et al., 1996).

При изучении экспрессии генов кукурузы были выделены кДНК (zmEF1 α) и соответствующий геномный клон (zmgEF1 α) члена семейства генов, кодирующих α -субъединицу фактора элонгации трансляции 1 (EF1 α). Предсказанная аминокислотная последовательность из 447 остатков прерывается в гене одним интроном. Саузерн-блот анализ показал, что клонированный ген ef1 α - один из семейства, состоящего, по меньшей мере, из шести генов. Как показал нозерн-блот анализ, содержание мРНК данного белка в листьях кукурузы увеличивается при низкой температуре, в то время как в корнях уровень мРНК ef1 α резко уменьшается. Эти результаты показывают, что экспрессия EF1 α дифференцированно регулируется в листьях и корнях во время холодового стресса (Berberich et al., 1995).

2.5 Гены дегидринов и гены, индуцируемые экзогенной абсцизовой кислотой

Одними из наиболее изученных семейств генов, индуцируемых низкой температурой, являются гены дегидринов и гены, индуцируемые экзогенной абсцизовой кислотой. Гены данных семейств к настоящему времени обнаружены практически во всех изученных видах растений – как травянистых, так и древесных.

При селективном исследовании с использованием первичных антител против богатой лизином области дегидринов библиотеки кДНК, созданной из закаленных тканей коры персика, было обнаружено, что некоторые клоны обладают высокой степенью сходства с дегидринами. Нозерн-блоттинг с использованием клона 5А показал, что 1,8 kb участок экспрессировался сезонно и в листопадных, и в вечнозеленых генотипах, а также индуцировался водным дефицитом. Вечнозеленые и листопадные

генотипы значительно различались как по их способности к холодовой акклиматизации, так и по сезонной экспрессии транскриптов и белков дегидринов. У обоих генотипов максимум экспрессии транскриптов был отмечен зимой и они не обнаруживались в мае - июле. Экспрессия белков была сходна с экспрессией транскриптов, в то же время экспрессия белка в вечнозеленом генотипе значительно увеличивалась после накопления транскриптов. Полученные данные указывают на то, что во время холодовой акклиматизации могут существовать различные уровни регуляции дегидринов (Artlip et al., 1997). В ходе исследований авторами также был изолирован клон G10a, содержащий полный ген дегидрина, обозначенный *ppdhn1*. Этот ген кодировал белок из 472 аминокислот с предсказанным размером 50020 Да. Кодированный белок (РСА 60) содержит девять богатых лизином повторов, характерных для дегидринов и два DEYGNP мотива. Генный блот с использованием зонда к клону 5а показал, что в персике имеется один или два высокогомологичных гена (Artlip et al., 1997).

При изучении белков, экспрессирующихся в ответ на низкие температуры у *Brassica napus*, был очищен до почти гомогенного состояния рекомбинант из белка BN28 (rBN28) и была определена его структура. Антитела, полученные против rBN28, были использованы для характеристики рекомбинантного и нативного белков. Похожий на многие другие индуцируемые низкой температурой белки, BN28 необычайно гидрофилен и термостабилен настолько, что остается в растворе после кипячения. Иммуноблот-анализ клеточных фракций показал, что BN28 не был ассоциирован с клеточными мембранами и находился исключительно в растворимой фракции клетки. Хотя ранее предполагалось, что BN28-подобные белки из *Arabidopsis thaliana* должны обладать антифризной активностью, такая антифризная активность не была определена при рекристаллизации льда с rBN28 (Boothe et al., 1997).

Из библиотеки кДНК, изготовленной из акклиматизированных к холоду этиолированных проростков рапса (*Brassica napus* cv Samourai) был изолирован клон, соответствующий регулируемому холодом гену. Анализ последовательности и поиски гомологий показали, что этот ген кодирует белок, гомологичный с АТР-зависимой фосфоенолпируват карбоксикиназой (PEPCK, EC 4.1.1.49) из *Saccharomyces cerevisiae*,

Trypanosoma, *Rhizobium sp.*, и *Escherichia coli*. Аналог из *B. napus* был обозначен как VnPERCK. Потенциальный АТР-связывающий сайт, существующий во всех белках PERCK, также обнаруживался и в VnPERCK. Хотя в ходе исследований и была установлена конститутивная экспрессия VnPERCK в контрольных проростках при комнатной температуре, было также установлено, что уровень содержания копий его мРНК статистически достоверно повышался при 4 °С и уменьшался до контрольного уровня, когда проростки возвращались на контрольную температуру (22 °С). Использование антител, полученных против рекомбинантного гистидин-VnPERCK слитого белка, продемонстрировало, что уровень содержания белка VnPERCK коррелирует с накоплением транскриптов Vnperck (Saezvasquez et al., 1995).

Для экспериментов, имеющих целью понять механизмы развития морозоустойчивости, индуцированной экзогенной абсцизовой кислотой, были использованы культивируемые клетки эмбрионов озимой пшеницы (*T. aestivum*, cv Chihoku). Культивируемые клетки обрабатывались 50 мМ абсцизовой кислоты в течение 5 дней при 23 °С для достижения максимального уровня морозоустойчивости (LT₅₀ = -26.6 °С). Возросшая морозоустойчивость обработанных экзогенной абсцизовой кислотой клеток была тесно ассоциирована со значительным накоплением в плазматической мембране полипептида с молекулярной массой 19 кДа. 19-кДа полипептидный компонент был выделен путем препаративного гелевого электрофореза и далее разделен на мажорную (AWPM-19) и минорную полипептидную компоненту при помощи Трицин-SDS-PAGE. Была определена N-концевая аминокислотная последовательность AWPM-19 и при помощи PCR из библиотеки, выделенной из обработанных экзогенной абсцизовой кислотой культивируемых клеток, был выделен клон кДНК (wpm-1), кодирующий 18.9 кДа гидрофобный полипептид AWPM-19, с четырьмя мембранно-связываемыми доменами и щелочной точкой pI (10.2). Экспрессия мРНК wpm-1 сильно индуцируется обработкой в течение нескольких часов 50 мМ абсцизовой кислоты. Эти результаты показывают, что AWPM-19 должен быть тесно связан с индуцируемым экзогенной абсцизовой кислотой увеличением морозоустойчивости у культивируемых клеток пшеницы (Koike et al., 1997).

2.6 Гены белков, связанных с процессом льдообразования

Установлено, что бактериальный ген, связанный с образованием льда, *inaZ* при перемещении в трансгенные растения вызывает образование ядер льда. Предварительная инкубация преобразованной ткани растения при температурах около 0 °С существенно повысила активность нуклеации льда в растениях, хотя максимальная активность нуклеации льда была достигнута только после низкотемпературной обработки продолжительностью около 48 часов. Хотя трансгенные растения содержат сходные количества мРНК *inaZ* как при «нормальных», так и при низких температурах, установлено, что низкие температуры необходимы для накопления белка INAZ. Предлагается, что устойчивость INAZ белка и, таким образом, активность нуклеации льда в трансгенных растениях усиливается при низкотемпературной обработке (Vanzee et al., 1996).

2.7 Гены, кодирующие белки, связанные с передачей кальциевых сигналов

Вопрос о механизме восприятия и трансформации сигнала в клетках растений к настоящему времени все еще изучен недостаточно. Установлено, что роль вторичного посредника в передаче стрессовых сигналов у различных организмов, в том числе и у растений, играют ионы Ca^{2+} (Kikkawa, Nishizuka, 1986; Boss, 1989; Kight et al., 1991, 1992). В клетках растений, не подвергнутых действию стресса, уровень содержания Ca^{2+} при помощи активных Ca^{2+} -транспортирующих систем поддерживается на низком, наномолярном уровне. Холодовой шок вызывает резкое увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме (Kight et al., 1992). На животных клетках во время стресса были показаны активации ионами Ca^{2+} протеинкиназы C (Kikkawa, Nishizuka, 1986) и Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы (Hanson, Schulman, 1992), вызывающие изменения экспрессии генов. Для выяснения роли Ca^{2+} в процессах ответа растения на низкотемпературный стресс и адаптации к низкой температуре были проведены эксперименты по изучению влияния хелатора Ca^{2+} - ЭГТА и блокаторов кальциевых каналов – La^{3+} и верапамила – на процессы адаптации растений люцерны к холоду. Результаты экспериментов показывают, что ЭГТА ингибирует низкотемпературную адаптацию на 70%, а La^{3+} и верапамил полностью

блокируют развитие процесса низкотемпературной адаптации у люцерны (Monroy et al., 1993).

Чтобы далее исследовать путь передачи сигнала, который стимулирует ответ на холодовой шок у кукурузы, был выделен кодирующий низкотемпературно-индуцируемую кальций-зависимую протеинкиназу клон кДНК (*Zmcdpk1*). Эксперименты по изучению динамики ответа на стресс показали, что низкотемпературная индукция *Zmcdpk1* предшествует аналогичному показателю для *mlip15*, другого холодоиндуцируемого гена, кодирующего ДНК-связывающий белок типа лейцин-зиппер (*bzip*), что указывает на то, что *Zmcdpk1* может размещаться раньше *mlip15* в пути передачи вызванного холодным стрессом сигнала. При этом было отмечено, что уровень *mlip15* мРНК в конститутивном состоянии в большой степени возрос после обработки циклогексимидом. Кроме гена *mlip15*, циклогексимид увеличивает уровни транскрипции двух других индуцируемых низкой температурой генов - *Zmcdpk1* и *Adh1*, кодирующего алкогольдегидрогеназу 1. Напротив, экспрессия гена хальконсинтазы индуцировалась только низкой температурой. Аккумуляция транскриптов *mlip15* при низких температурах и в ответ на циклогексимид значительно уменьшалась после предварительной обработки хелатором кальция, что позволяет предполагать, что кальций вовлечен в обоих случаях индукции гена *mlip15* (Berberich, Kusano, 1997).

После холодового шока усиливается экспрессия ТСН-генов из *Arabidopsis*, которые кодируют калмодулин-связанные белки и ксилоглюкан эндотрансглюканазу. Была исследована возможная роль колебаний во внутриклеточных концентрациях иона кальция Ca^{2+} в вызванной холодовым шоком экспрессии гена ТСН. Для этого у трансгенных растений, несущих ген апоэкворина, был проведен мониторинг содержания Ca^{2+} с тем, чтобы исследовать необходимость индуцируемого холодом увеличения содержания Ca^{2+} для экспрессии ТСН. Индуцированное холодовым шоком увеличение содержания Ca^{2+} может быть заблокировано La^{3+} и Gd^{3+} , предполагаемыми ингибиторами Ca^{2+} -канала в плазматической мембране, и 1.2-бис (о-аминоэпокси) этан- $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -тетраацетиловой кислотой, внеклеточным хелатором Ca^{2+} . В ходе экспериментов было установлено, что индуцируемая холодовым-

шоком экспрессия ТСН генов затормаживается высокими уровнями содержания всех этих агентов, что, как было показано, блокирует увеличение содержания Ca^{2+} . Эти данные подтверждают то, что внутриклеточное увеличение содержания Ca^{2+} , следующее за холодовым шоком, требует внеклеточного Ca^{2+} и может получить необходимый приток Ca^{2+} опосредованно через Ca^{2+} каналы плазмалеммы. Во-вторых, результаты экспериментов свидетельствуют, что индуцируемая холодом экспрессия хотя бы подкласса ТСН-генов требует увеличения содержания внутриклеточного Ca^{2+} (Polisensky, Braam, 1996).

2.8 Гены белков холодового шока

Установлено, что у бактерий существует многочисленное семейство генов, экспрессирующихся только в ответ на резкое снижение температуры. Гены этого семейства обозначены как гены белков холодового шока (cold shock proteins – CSP). Показано, что для начала экспрессии некоторых из этих белков холодового шока бактерий достаточно снижения температуры на 10 – 15⁰С.

Известно, что экспрессия гена CspA, важнейшего белка холодового шока *Escherichia coli*, очень сильно индуцируется во время резкого снижения температуры. Установлено, что замена трех оснований около последовательности Shine-Dalgarno размером в 159-оснований в 5'-нетранслируемой области мРНК cspA стабилизирует мРНК, приводя к конститутивному синтезу CspA при 37⁰С. Как оказалась, эта стабилизация, по крайней мере частично, происходит из-за сопротивления деградации РНКазой E. Холодовая индукция cspA также достигалась путем замены его промотора промотором Ipp, не индуцируемым-холодовым шоком. Таким образом, полученные данные указывают на то, что ген CspA эффективно транскрибируется даже при 37⁰С. В то же время трансляция мРНК белка CSPА заблокирована вследствие ее предельной нестабильности при 37⁰С. Представленные результаты также демонстрируют, что ген cspA конститутивно транскрибируется при всех температурах; однако его экспрессия при 37⁰С предотвращена из-за дестабилизации его мРНК (Fang et al., 1997).

С целью оценить эффективность промоторов белков холодового шока для их низкотемпературной экспрессии, было сконструировано

транскрипционное слияние генов между промотором гена *cspA* и геном бета-галактозидазы *lacZ*. Показано, что в таком слитом гене синтез бета-галактозидазы эффективно подавлялся при 37⁰С, но быстро индуцировался при переносе в 15⁰С, приводя к трех- пятикратному увеличению в специфической активности белка относительно контрольной бактериальной культуры. Только продолжение инкубации культуры при 20⁰С, но не при 15⁰С, приводило к ослаблению активности из-за деления клетки и репрессии промотора, хотя исходные показатели накопления бета-галактозидазы при 20⁰С были в два раза выше измеренных при 15⁰С (Vasina, Baneyx, 1996).

Из двух штаммов *Lactobacillus plantarum* были клонированы два гена белков холодового шока, *cspL* и *cspP*. Эти гены, являющиеся неаллельными, присутствовали во всех исследованных штаммах. Данные гены кодируют полипептиды из 66-аминокислотных остатков, родственные друг другу и принадлежащие к семейству CSP – «белков холодового шока». Транскрипция гена *cspP* оканчивается единственной мРНК, в то время как для гена *cspL* были найдены две *cspL* мРНК с общими 5' концами. Содержание этих транскриптов умеренно возрастало в ответ на обработку культур холодом (Mayo et al., 1997).

При изучении ответа лактозно-кислых бактерий на замораживание было установлено, что при замораживании (-20⁰С в течение 24 часов) культуры лактозно-кислых бактерий жизнеспособность клеток в значительной мере снижалась. В то же время, когда культуры бактерий перед замораживанием были предварительно подвергнуты в течение 2 часов холодовому шоку при 10⁰С, значительно улучшалась жизнеспособность у штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (на 25-37%) и *Pediococcus pentosaceus* PO2 (на 18%), но она не менялась у штамма *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* и у штаммов *Lactobacillus helveticus* LB1 и *Streptococcus thermophilus* TS2. Жизнеспособность клеток возросла еще более, когда период холодового шока был продлен до 5 часов. Использование дегенерированных PCR праймеров, полученных как из гена важнейшего белка холодового шока (*csp*) *Escherichia coli*, так и *Bacillus subtilis* приводит к образованию PCR продуктов у всех изученных штаммов. PCR продукт из *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* M474 был клонирован и секвенирован. Вычисленная для этого белка

последовательность аминокислот показала высокую гомологию с аминокислотными последовательностями других белков семейства CSP. Использование PCR праймеров, основанных на последовательность M474, приводило к образованию PCR продуктов только у изученных штаммов лактококков, но не у изученных штаммов *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus* или *Pediococcus pentosaceus* (Kim, Dunn, 1997).

2.9 Гены протеинкиназ

Клон кДНК для гена рецепторо-подобной протеинкиназы (RPK1) был выделен из *Arabidopsis thaliana*. Этот клон длиной 1952 bp с открытой рамкой считывания размером 1623 bp кодирует пептид (RPK1) из 540 аминокислот, который содержит четыре области, характерных для рецепторной киназы. Во-первых, он содержит характерную для киназ предполагаемую аминотерминальную сигнальную область последовательности. Во-вторых, он содержит область с пятью экстрацеллюлярными богатыми лейцином повторяющимися последовательностями. В-третьих, он имеет мембрано-связывающую область и, в-четвертых, домен цитоплазматической протеинкиназы, который содержит все 11 субдоменов, характерных для протеинкиназ. Ген RPK1 экспрессируется в цветах, побегах, листьях и корнях. Показано, что экспрессия гена RPK1 индуцируется в течение 1 часа после обработки экзогенной абсцизовой кислотой. Ген также быстро индуцируется различными другими абиотическими стрессами, такими, как обезвоживание, высокая концентрация солей и низкая температура. Предлагается, что данный ген вовлечен в общий ответ клетки на стресс. Вызванная обезвоживанием индукция гена *grk1* не нарушается в дефицитных по эндогенной абсцизовой кислоте мутантах *aba-1*, *abi1-1*, *abi2-1*, *abi3-1* и, вследствие этого, предполагается, что эта индукция не зависит от обработки абсцизовой кислотой (Hong et al., 1997).

2.10 Гены картофеля, индуцируемые хранением на холоду

Хранение клубней картофеля на холоду при 4 °C связано с накоплением нескольких индуцируемых холодом транскриптов генов. Путем использования в качестве зонда ранее охарактеризованной кДНК (C17) был выделен и секвенирован соответствующий ген *ci7*.

Предполагаемый промотор *ci7* содержит последовательность элементов, которая, как было показано, регулирует экспрессию индуцируемых холодом генов у *Arabidopsis thaliana*. Транскрипты *CI7* дифференциально экспрессируются в клубнях и листьях картофеля в ответ на холодовой стресс, засуху, высокую концентрацию солей или обработку экзогенной абсцизовой кислотой. В то время как накопление транскриптов *CI7* во время хранения на холоду происходит в течение нескольких дней, индукция транскриптов *CI7* в ответ на засуху, экзогенную абсцизовую кислоту и солевой стресс происходит быстро, в течение нескольких часов. Накопление белка *CI7* в ответ на абиотические стрессы и обработку экзогенной абсцизовой кислотой в клубнях было небольшим, особенно по сравнению с уровнем содержания транскриптов. В листьях белок *CI7* отсутствовал после всех исследованных воздействий. В ходе экспериментов растения *S. tuberosum* были трансформированы слитым с репортерным GUS-геном 5'-фланкирующим промоторным регионом *ci7* размером 3 kb. Анализ клубней независимых трансгенных линий не обнаружил значительной индукции энзиматической активности GUS в ответ на низкотемпературное воздействие. В то же время, когда для анализа уровня индукции гена GUS с введенным *ci7* промотором был использован РНК блоттинг, гетерологичное слияние GUS сильно индуцировалось в ответ на низкие температуры. По сравнению с РНК блот-анализом трансгенных растений, изучение ядерной «run-on» транскрипции *ci7* гена показало, что большая часть температурно-регулируемой экспрессии гена *ci7* в клубнях может быть связана с посттрансляционными механизмами контроля (Kirch et al., 1997).

Анализ последовательности кДНК клона *CI21*, который соответствует другому индуцируемому холодом транскрипту, обнаруживает высокую гомологию с транскриптами томата (*Lycopersicon esculentum*) и дикого картофеля (*Solanum chacoense*), индуцируемыми созреванием и водным стрессом. Два гомологичных, неаллельных гена, *ci21A* и *ci21B*, были выделены и секвенированы. Нозерн-блот анализ показал, что самые высокие уровни содержания транскриптов *ci21* обнаружены в хранимых в холоде клубнях. Более низкие уровни транскриптов содержатся в стеблях и корнях, и самые низкие уровни отмечены в листьях и клубнях, хранимых при комнатной температуре. Обработка растений абсцизовой кислотой,

высокая концентрация соли и тепловой шок не оказывали значительного влияния на уровни содержания транскрипта *ci21* в клубнях и листьях. Подсушивание было единственным стрессом, вызывавшим транскрипцию *CI21* на листьях, но оно не вызывало ее в клубнях. Вестерн-блот анализ обнаружил белок *CI21* только в клубнях. Химерный ген, созданный путем слияния предполагаемой области промотора *ci21A* (фрагменты между 380 и 2000 bp области промотора *ci21A*) и репортер-геном *uidA*, тестировался на индукцию бета-глюкуронидазы низкой температурой в трансгенных картофельных растениях, при этом в ответ на хранение клубней при 4 °C у трансгенных растений наблюдалось двукратное увеличение активности бета-глюкуронидазы (Schneider et al., 1997).

2.11 Гены Y-box белков и белков, регулирующих процессы транскрипции и трансляции

В ходе исследований экспрессии генов семейства Y-бокс белков, регулирующих процессы транскрипции в клетках, было установлено, что высококонсервативный элемент основы промотора *grp78* играет важную роль в индукции *grp78* под разнообразными стрессовыми сигналами. Предшествующее изучение установило функциональную область в 3' конце основы промотора (стресс-индуцируемая область изменения [SICR]), которая проявляет стресс-индуцируемые изменения в стрессированных ядрах. В ходе экспериментов показано, что человеческий фактор транскрипции YY1 связывает SICR и трансактиваторный элемент основы промотора в условиях стресса. Скрининг библиотек с данным элементом промотора выявил два новых связывающих эту область промотора белка, YB-1 и DBPA. Оба белка принадлежат к семейству Y-бокс белков, для которых характерен эволюционно- устойчивый ДНК-связывающий мотив - домен холодового шока (CSD). В ходе исследований в экспериментах по ко-переносу было установлено, что Y-бокс белки выступают в стрессированных клетках антагонистами WI-опосредованного управляемого *grp78* усиления транскрипции. Таким образом, белки, имеющие домен холодового шока, могут быть частью механизма передачи сигнала стресса у млекопитающих (Li et al., 1997).

В то же время проблематично существование особых факторов транскрипции для специфических функций в элементах промотора,

особенно в таких системах, как G-бокс, поскольку существуют многочисленные синергические специфические для G-бокса факторы, в частности, промотора алкогольдегидрогеназы (Adh) у *Arabidopsis*, который регулирует экспрессию в ответ на холодовое воздействие и обезвоживание (Lu et al., 1996).

2.12 Гены, связанные с низкотемпературной акклиматизацией

В ходе исследований по изучению влияния низкотемпературной акклиматизации на экспрессию генов в растениях выявлено и охарактеризовано значительное число генов, экспрессия которых индуцируется во время этого процесса как в травянистых, так и в древесных растениях. Значительное число этих генов индуцируется также экзогенной абсцизовой кислотой и засухой. В то же время выявлены гены, которые специфичны для процесса акклиматизации растения к низким температурам и не индуцируются другими типами абиотического стресса.

Для установления молекулярных основ холодовой акклиматизации у клубники (*Fragaria xanannassa*) было проведено выявление генов, ассоциированных с низкотемпературной акклиматизацией. Дифференциальный скрининг библиотеки кДНК, изготовленной из акклиматизированных к холоду растений клубники, позволил изолировать различные кДНК, дифференциально экспрессирующиеся при низкотемпературной акклиматизации. Нозерн-блот анализ показал, что уровень транскриптов Fcor1 (*Fragaria* cold-regulated) возрастал после 2 дней низкотемпературной акклиматизации, в то время как аналогичный показатель Fcor2 увеличивался только после 2 недель низкотемпературной акклиматизации. С другой стороны, уровень содержания транскриптов Fcor3 снижался в течение 24 часов воздействия низкотемпературной акклиматизации и оставался на низком уровне в течение 8 недель периода акклиматизации. Гены Fcor1 и Fcor2 экспрессируются во всех тканях, в то время как ген Fcor3 специфичен для листьев. Кодированный геном Fcor1 белок имеет высокое содержание лейцина, изолейцина, глицина, пролина и серина. Данный белок имеет гомологию с белками, кодируемыми геном ячменя blt101, индуцируемым низкотемпературной акклиматизацией, и геном *Lophopyrum* esi3, индуцируемым солевым стрессом. Белок FCOR2 богат лизином, лейцином, валином, аланином и аргинином и не имеет

гомологии ни с каким из продуктов известных генов. Частичный клон кДНК Fcor3 кодирует полипептид, имеющий очень высокую идентичность с субъединицей V PSI из шпината и с полипептидом PSI Psag из ячменя. Уровень накопления транскриптов Fcor1 коррелирует с устойчивостью к замораживанию у исследованных сортов клубники (Dong et al., 1997).

Клон кДНК rbn59 был изолирован путем дифференциального скрининга библиотеки кДНК акклиматизированного к холоду озимого рапса (*Brassica napus*). Нуклеотидная последовательность BN59 оказалась гомологичной последовательности, кодирующей 70 кДа субъединицу вакуолярной H⁺-АТФазы в растениях. Транскрипты, гибридизующиеся с BN59, аккумулируются во время воздействия низкой температуры и воздействия экзогенной абсцизовой кислоты. Вестерн-блоттинг белков также показал увеличение содержания 70 кДа субъединицы во время акклиматизации к холоду. Накопление эндомембранной H⁺-АТФазы следует также из наблюдений за осмотическим регулированием, увеличением содержания эндогенной абсцизовой кислоты и пролиферации эндомембран в течение холодной акклиматизации (Orr et al., 1995).

Двенадцать клонов индуцируемых холодом кДНК были изолированы путем дифференциального скрининга библиотеки кДНК, подготовленной из мРНК холодоустойчивого картофеля (*Solanum soganandinum*). При помощи нозерн-блот гибридизации было проанализировано накопление мРНК, соответствующей каждому клону. Изолированные в данном исследовании клоны кДНК обозначены как Ssci (*S. Soganandinum* cold inducing). Все клоны отчетливо индуцировались в ответ на холод - накопление соответствующих транскриптов было замечено уже после одного дня закаливания к холоду. Максимальная аккумуляция мРНК, соответствующих клонам Ssci1, Ssci2, Ssci6 и Ssci8, была отмечена в первый день холодого закаливания, тогда как для клонов Ssci3, Ssci4, Ssci5, Ssci7, Ssci9, Ssci10, Ssci11 и Ssci12 - после 8 дней закаливания. Частичная последовательность ДНК была определена для 5' и 3' концов клонов и был произведен поиск гомологии с последовательностями в базах данных. Результаты поиска показали, что выделенные клоны кДНК соответствуют известным генам и кодируют мРНК для следующих белков: мРНК для двух различных S-аденозил-L-метионин декарбоксилаз (Ssci1 и 2), два хлоропластных шаперона (Ssci3, Ssci4), белок цикла деления

клетки CDC48 (Ssci5), малатдегидрогеназу (Ssci6), мио-инозитол-1-фосфат синтетазу (Ssci7), протопорфирин IX:Mg хелатазу (Ssci8), фактор элонгации EF-1 α (Ssci9), хлоропластный фактор элонгации трансляции EF-G (Ssci10), рибосомальный белок L-3 (Ssci11) и мРНК для белка томата TAS14, индуцируемого экзогенной абсцизовой кислотой. Выявленные гены могут участвовать в двух различных механизмах, относящихся к холодоустойчивости. Одна группа может предохранять хлоропласты и клеточные структуры во время стресса, в то время как другая может быть вовлечена в механизмы приспособления растительной клетки к холоду (Rorat et al., 1997).

Были изучены некоторые из ответов мутантов *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh), не развивающих максимальной холодостойкости после холодовой акклиматизации, на холодовое воздействие. В ходе экспериментов были изучены холодовая индукция трех белков, уровни содержания сахарозы и глюкозы, жирнокислотный состав липидов, а также накопление антоцианинов в листьях. Четыре мутации (sfr3, sfr4, sfr6 и sfr7) понижали или устраняли накопление антоцианина во время холодной акклиматизации. Одна мутация (sfr4) предотвращала индуцируемое холодом в норме повышение уровня содержания сахарозы и глюкозы. Мутации sfr4 и sfr7 влияли на жирнокислотный состав липидов после холодовой акклиматизации. С другой стороны, поскольку все исследованные параметры у мутаций sfr1, sfr2 и sfr5 не отличались от таковых у дикого типа, то предполагается, что они имеют другое, вполне возможно, высокоспецифическое действие в ответ на низкотемпературное воздействие (McKown et al., 1996).

Регулируемый холодом оперон rbpA1-rpsU кодирует РНК-связывающий белок и рибосомальный белок М3 у *Anabaena variabilis*. Уровень экспрессии этой группы генов примерно в десять раз выше при температурах ниже 30 °С, чем при 38 °С. С целью изучения функций белка RbpA1 *in vivo* был создан нарушенный вставкой ген rbpA1. Эти мутанты были полностью лишены белка RbpA1, но содержали нормальный уровень продукта гена rpsU - рибосомального белка S21. При 38 °С мутанты были морфологически нормальными, но при 22 °С они с небольшой частотой производили необычные клетки. По-видимому, эти клетки были на начальном этапе образования прогетероцист. В присутствии нитрата при

22 °C у мутантов на молекулярном уровне также происходили различные события, обуславливающиеся инициацией превращения в гетероцисты, а именно, иссечение 11-kbp элемента ДНК в *nifD* и накоплении копий *xisA* и *hetR*, но в то же время эти события не происходили в присутствии аммония или при 38 °C. Полученные результаты позволяют считать, что RbpA1 необходим для полной репрессии инициации образования гетероцист при низких температурах в присутствии нитрата (Sato, Wada, 1996).

В ходе изучения низкотемпературного ответа генома *Arabidopsis thaliana* были охарактеризованы две связанные кДНК (RCI2A и RCI2B), соответствующие генам, экспрессия которых временно индуцируется низкими температурами. RCI2A и RCI2B кодируют небольшие (54 аминокислоты) сильно гидрофобные белки, которые несут два потенциальных трансмембранных домена. Анализ их аминокислотной последовательности показал сродство с регулируемыми различными стрессовыми условиями белками, кодируемыми генами из ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и *Lophophytum elongatum*. Их высокий уровень гомологии последовательностей (78%) и их геномная локализация в отдельном рестрикционном фрагменте подтверждают то, что оба гена появились в результате тандемной дупликации. В то же время их регулирующие последовательности достаточно различаются для того, чтобы считать их различными генами. Подобно большинству охарактеризованных индуцируемых холодом генов растений, экспрессия RCI2A и RCI2B также усиливается экзогенной абсцизовой кислотой и дегидратацией, но не общей реакцией растения на стрессовые условия, поскольку она не индуцируется солевым стрессом или анаэробизмом. Более того, низкая температура способна вызвать экспрессию RCI2A и RCI2B в АВА-дефицитной и нечувствительной генетической среде, что свидетельствует о том, что низкотемпературный ответ этих двух генов регулирует и зависимые от абсцизовой кислоты, и независимые от нее пути (Capel et al., 1997).

Для изучения генетического регулирования морозоустойчивости рапса у популяции F2 *Brassica rapa* и двойной гаплоидной популяции *Brassica napus in vitro* определялась относительная морозоустойчивость акклиматизированных и неакклиматизированных растений. Для идентификации предполагаемых локусов количественных признаков

использовались разработанные раньше карты связей. У популяции *B. parvis* области генома со значительным влиянием на морозоустойчивость не были обнаружены, но у *B. rapa* четыре области ассоциировались со связанной с акклиматизацией морозоустойчивостью (FTA) и способностью к акклиматизации (FTB), но две другие области связывались с морозоустойчивостью, не связанной с акклиматизацией (FTN). Способность к акклиматизации регулировалась генами с очень небольшими как положительными, так и отрицательными эффектами доминирования. Аллель озимых родителей имела положительные добавочные эффекты, но отрицательные доминантные эффекты в локусах количественных признаков FTN. RFLP локусы обнаруживались при помощи индуцируемой холодом и связанной со стрессом кДНК из *Arabidopsis thaliana*, картированной около двух локусов количественных признаков для FTA/FTB (Teutonico et al., 1995).

Недавние исследования определили в растениях *cis*-действующий ДНК-регулирующий элемент, «С-повтор/отвечающий на обезвоживание элемент (DRE)», который стимулирует транскрипцию в ответ на действие низкой температуры и водного дефицита. Из *Arabidopsis thaliana* была выделена кДНК, которая кодирует «С-repeat/DRE» связывающий фактор, CBF1 (C-repeat/DRE binding factor 1). Анализ выведенной аминокислотной последовательности CBF1 показывает, что белок имеет молекулярную массу 24 кДа, потенциальную ядерную локализацию последовательности и возможную активность в кислой области. CBF1 также имеет область AP2, которая является ДНК-связывающим мотивом из 60 аминокислот, имеющимся в белках *Arabidopsis* APETALA2, AINTEGUMENTA, и TINY и в других растительных белках с неизвестными функциями. Уровни содержания транскриптов CBF1, которые конститутивно являются единичными или низкими, незначительно изменялись в растениях, подвергнутых низкотемпературной обработке, или в отдельных листьях, подвергнутых дефициту воды. Связывание CBF1 к «С-repeat/DRE» продемонстрировано при помощи анализа со сдвигом геля при использовании рекомбинантного белка CBF1, экспрессированного в *Escherichia coli*. Кроме того, обнаружено, что экспрессия CBF1 в дрожжах активизирует транскрипцию репортер-генов, содержащих «С-repeat/DRE» как активизатор, расположенный выше последовательности, но не

активизирует транскрипцию мутантной версии элемента ДНК. Считается, что CBF1 может функционировать как активизатор транскрипции, который связывается с «C-repeat/DRE» ответственным элементом ДНК и, вероятно, играет роль в индуцированной холодом и обезвоживанием экспрессии гена у *Arabidopsis* (Stockinger et al., 1997).

Из обработанных холодом проростков холодоустойчивого сорта сои (*Glycine max* L. cv. Kitamusume) при помощи дифференциального секвенирования были выделены две регулируемые холодом кДНК - src1 и src2. Уровень содержания транскриптов src1 увеличивается после воздействия низкой или высокой температурой (5, 15 и 40°C), засухой, ранением и инфекцией вирусом мозаики соевого боба (SMV). Транслированный из кДНК src1 полипептид (SRC1) имеет 102 аминокислоты, гидрофилен и имеет девять аминокислотных повторов, богатых глютаминовой кислотой, гистидином, лизином и глицином. SRC1 имеет гомологию с белком водного стресса риса (WSI724) и регулируемым холодом белком люцерны (CAS15). Уровень содержания транскриптов src2 увеличивался только после понижения температуры до 5°C, что указывает на то, что этот ген индуцируется только охлаждением. Транслированный из кДНК src2 полипептид (SRC2) состоит из 290 аминокислот и содержит семь повторов последовательностей аминокислот, богатых пролином, глицином, тирозином и глутамином и гидрофобную область у карбокси-конца, которая может связываться с мембраной. Уровень транскриптов src2 при 5°C продолжал увеличиваться вплоть до 48 часов действия низкой температуры в холодоустойчивом сорте Kitamusume, в то время как он достигал максимума через 12 часов и затем понижался в чувствительном к холоду сорте Koganejuro (Takahashi, Shimosaka, 1997).

Из *Arabidopsis thaliana* был изолирован геномный фрагмент EcoRI размером 7 kb, который содержит два тесно связанных dhb/lea/rab-подобных гена - lti29 (прежде именуемый lti45) и cor47 в tandemном оформлении. Для обоих транскриптов показана аккумуляция в ответ на низкотемпературный стресс, обработку экзогенной абсцизовой кислотой и обезвоживание. Сравнение последовательностей аминокислот транслированных полипептидов показало, что они на 67% идентичны. Рассчитанные молекулярные массы этих полипептидов были 29 кДа для

LTI29 и 30 кДа для COR47. Оба полипептида содержат один консервативный сериновый домен и три богатых лизином повтора, как у DHN/LEA/RAB-подобных белков. Кроме того, как LTI29, так и COR47 имеют N-терминальный кислый повтор, обнаруживаемый только у нескольких среди DHN/LEA/RAB белков. Близкое расстояние между двумя генами (всего 2,7 kb) и их тандемная организация в геноме *A. thaliana*, а также общая гомология последовательности области кодирования на нуклеотидном уровне позволяют предположить, что два гена развились путем дублирования. Это, по-видимому, представляет собой общую черту среди зависимых от низкотемпературного стресса генов *A. thaliana* (Welin et al., 1995).

Paldi с соавторами был изучен эффект низкой температуры на процессинг рРНК у пшеницы. Две линии пшеницы, использованные в этой работе, отличались друг от друга только морозоустойчивостью. В ходе экспериментов было показано, что в случае слабоморозоустойчивой линии количественные и качественные изменения в процессе созревания рРНК произошли как результат действия низкой температуры. В течение холодной обработки последние предшественники (с мол. массами 1.4 и 0.9 МДа) двух стабильных цитоплазматических рРНК (с мол. массами 1.3 и 0.7 МДа) накапливались в качестве стабильных фракций рРНК. Это накопление увеличивалось по мере увеличения продолжительности холодной обработки. В то же время это изменение не было выявлено у линии с хорошей морозоустойчивостью. Результаты свидетельствуют, что в слабоморозоустойчивых линиях холодовая обработка имела ингибирующий эффект на последнюю стадию процесса созревания рРНК, то есть при низкой температуре этот процесс не может завершиться (Paldi et al., 1996).

Известно, что тепловая обработка плодов помидора индуцирует также и устойчивость к повреждению от охлаждения. Ранее было показано, что специфические белки теплового шока (БТШ) экспрессируются в нагретых плодах помидора после хранения на холоде. Для поиска индуцируемых теплом генов, экспрессирующихся при низких температурах, была изготовлена, а затем подвергнута дифференциальному скринингу библиотека кДНК из предварительно прогретых, а затем охлажденных плодов помидора. В ходе этих экспериментов был выделен новый клон

кДНК, *hcit2*, кодирующий белок с молекулярной массой 16.5 кДа. Кодируемый им белок содержит три предполагаемых трансмембранных гидрофобных последовательности, что позволяет предполагать, что этот белок локализован в мембранах. Экспрессия *hcit2* в плодах индуцировалась высокой температурой, но не иными видами стресса, такими, как, например, низкая температура, засуха или анаэробные условия, и не наблюдалась во время созревания плода. Высокий уровень транскриптов *hcit2* был обнаружен в нагретых плодах после 2-х недель хранения при 2⁰ С. Высокие температуры также индуцировали экспрессию *hcit2* в листьях, цветах и стеблях помидора. Авторы предполагают, что белок HCIT2 может быть вовлечен в процесс приобретения растением устойчивости к повреждению охлаждением (Adnan et al., 1998).

У ряда линий дикого картофеля (*Solanum soganandinum*) были проанализированы динамика холодостойкости и изменения в транскриптуемых мРНК во время холодной акклиматизации. Перед низкотемпературной обработкой все линии были полностью закалены в течение восьми дней при 4⁰С. Наиболее холодостойкая линия 1 усилила холодостойкость (LT₅₀) от -3,2⁰С до - 8,9⁰С, а наименее холодостойкая линия 10 увеличила свою холодостойкость (LT₅₀) от -2,5⁰С до -6,5⁰С. В ходе исследований были изолированы поли(А)мРНК из закаленных и незакаленных растений линий 1 и 10 и продукты их трансляции *in vitro* были разделены двумерным-PAGE-электрофорезом. Анализ профилей продуктов трансляции *in vitro* закаленных растений линии 1 обнаружил изменения в содержании приблизительно 31 продукта в области молекулярных весов от 14 до 69 кДа и рI в районе от 6,7 до 5,0. Содержание 26 продуктов во время холодной акклиматизации повышалось, а двух других белков - уменьшалось. Во время, когда растения подвергались низкотемпературному стрессу, было возможно идентифицировать вновь образующиеся продукты трансляции - три с мол. массами около 18 кДа и два с мол. массами около 45 кДа. Большинство продуктов, содержание которых изменялось в течение холодной акклиматизации, было обнаружено в группе низкомолекулярных белков с молекулярными массами от 14 до 21 кДа и от 24 до 35 кДа. В менее устойчивой линии 10 в течение холодной акклиматизации изменялось содержание только 19 продуктов трансляции, и в ней не было отмечено

вновь образующихся продуктов. Все изменения в продуктах трансляции в обеих линиях появлялись после двух дней холодной обработки, когда морозоустойчивость линий еще повышалась (Rorat, Irzykowski, 1996).

Таким образом, к настоящему времени накоплено большое количество данных об отдельных индуцируемых низкой температурой генах у различных видов растений. Особенно большой объем данных в настоящее время получен в связи с проводимым полным сиквенсом генома *Arabidopsis thaliana*. В то же время необходимо отметить, что, несмотря на обилие данных о влиянии низкой температуры на экспрессию генов в растениях, эти исследования проводятся отрывочно и бессистемно. В основном, полученные данные говорят об индукции экспрессии определенных генов низкой температурой. В то же время данные о взаимосвязи экспрессии различных генов при низкотемпературном стрессе крайне ограничены. Все же из рассмотренных выше данных можно сделать вывод, что, хотя по сравнению с «нормальными» температурными условиями содержание ДНК при гипотермии меняется незначительно, в то же время гипотермия вызывает значительные изменения в экспрессии генов на уровне транскрипции. При низкотемпературном стрессе и в процессе низкотемпературной адаптации у разных исследованных видов индуцируется экспрессия ряда генов, некоторые из которых являются видоспецифичными. В то же время выделено несколько семейств генов, которые индуцируются в ответ на низкотемпературный стресс у многих из исследованных видов. Установлено, что многие из экспрессирующихся при низкой температуре генов индуцируются также в ответ на обработку экзогенной абсцизовой кислотой и засуху. Индукция некоторых генов является общим неспецифическим ответом организма на стресс, так как они индуцируются всеми изученными видами абиотического и биотического стресса. Поскольку установлено, что низкотемпературный стресс вызывает изменения экспрессии генов на уровне транскрипции, можно перейти к рассмотрению результатов, полученных при изучении его влияния на уровне трансляции.

3 ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ

3.1 Влияние гипотермии на содержание водорастворимых белков в тканях высших растений

Предположение о том, что во время закаливания растений к холоду происходит синтез белков, было впервые высказано Дж. Дойлом и П. Клинчем в 1927 году. Первые доказательства того, что процесс синтеза белка непосредственно участвует в закаливании растения, были получены Г. Симинович (цит. по Браун, 1983). Впоследствии во многих работах сообщалось об изменении содержания нуклеиновых кислот и общего белка во время закаливания растений к холоду (Колоша, Костенко, 1976; Brown, Vixby, 1975; Chen, Li, 1977; Graham, Patterson, 1982). Анализ изменений водо- и солерастворимых белков озимой пшеницы после закаливания и перезимовки показал увеличение содержания водорастворимых белков (Беличенко, Грязина, 1980; Колоша, Костенко, 1976). В то же время содержание солерастворимых белков снижалось. По этим признакам обнаружены различия между озимой пшеницей сорта Безостая 1 и высокозимостойким мутантом этого сорта, полученным под действием нитрозометилмочевины. Аминокислотный анализ изучаемых белков выявил значительные изменения по этому признаку как у исходной формы, так и у мутанта под действием перезимовки (Беличенко, Грязина, 1980). В ряде других работ сообщалось об изменении содержания общего белка во время действия низкой температуры (Колоша, Черепенчук, 1968) и закаливания (Браун, 1983; Kasperska-Palacz et al., 1977a,б). При изучении биосинтеза белка во время низкотемпературной адаптации озимых злаков в связи с их морозостойкостью (Карасев и др., 1992) было установлено, что у озимой пшеницы, озимой ржи и ячменя при снижении температуры с 18⁰С до 2⁰С в первые - третьи сутки адаптации происходит снижение уровня синтеза белка, но на пятые - седьмые сутки синтез белка возрастает, при этом 10-15% общей массы растительного белка составляют вновь синтезированные белки, не присутствовавшие в контрольных растениях.

Во время перезимовки растений озимой пшеницы происходят значительные изменения в содержании белков в тканях корня и узлов

кущения: наблюдается гидролиз белков в корнях и перемещение свободных аминокислот в узлы кущения, причем если осенью с понижением температуры количество растворимых белков в корнях уменьшается, то к весне оно увеличивается (Мусич, 1968). Накопление белков (в основном в виде легкорастворимых форм) за счет более слабого по сравнению с ростом замедления скорости белкового синтеза отмечалось в клетках корня кукурузы под влиянием пониженной температуры (Родченко и др., 1988).

Применение электрофореза для разделения растительных белков позволило получить новую информацию о влиянии гипотермии на состав белков растений. Резкое снижение температуры вызывает заметные изменения в электрофоретическом спектре легкорастворимых белков. В частности, у озимой пшеницы в период перезимовки обнаружены значительные изменения в составе белков, выделенных из узлов кущения (Барашкова, 1971, 1979). В процессе закаливания образование белков, судя по количеству полос в электрофоретическом спектре, нарастало, а в осенне-зимний период уменьшалось. Была отмечена сортовая специфика в отношении этого признака. В частности, морозоустойчивый сорт озимой пшеницы отличался от морозочувствительного сорта большим числом полос в электрофоретическом спектре.

Появление новых полос в спектре белков под действием гипотермии и в процессе закаливания растений к холоду отмечается многими исследователями. В частности, в ходе процесса адаптации озимой пшеницы к низким отрицательным температурам отмечалось появление в электрофоретическом спектре белков с молекулярными массами 24 и 85 кДа (Карасев и др., 1991), а также в дополнение к ним 67 и 74 кДа (Карасев и др., 1993). При изучении полипептидного состава белков узла кущения озимой пшеницы в процессе зимовки было обнаружено изменение содержания глобулинов с молекулярными массами 23 и 48 кДа (Новожилова и др., 1994). Закаливание озимой пшеницы приводит и к изменениям в составе белков надземных органов (Бабенко, Нигрецкая, 1971), при этом наблюдается новообразование четко выраженных полос в электрофоретическом спектре в зонах высоко- и низкоподвижных белков. Авторы, учитывая, что значительная часть белков обладает ферментативными свойствами, предполагают появление ферментов,

которые обнаруживаются только при холодовом воздействии на озимую пшеницу.

При исследовании белков, синтез которых коррелирует с возрастом холодоустойчивости клеточных культур *Bromus inermis* Leyss. cv. Manchag было отмечено усиление синтеза белков с молекулярными массами 25, 165, 190 и 200 кДа (Robertson et al., 1988).

Одним из наиболее изученных к настоящему времени семейств белков, содержание которых в растении коррелирует с холодоустойчивостью, являются дегидрины (члены семейства D II белков LEA [late embryogenesis abundant – белки позднего эмбриогенеза]) (Close, 1996). Данное семейство белков имеет определенные, характерные для этого семейства последовательности аминокислот, что позволяет достаточно легко и уверенно идентифицировать его членов как на уровне транскриптов, так и на уровне индивидуальных белков. В связи с этим члены данного семейства в настоящее время интенсивно изучаются.

Значительные изменения под действием холодовой акклиматизации были обнаружены при изучении экспрессии дегидринов у яровых и озимых зерновых культур (Fu et al., 1994). Было установлено, что содержание дегидриновых транскриптов возрастает с сентября по ноябрь, причем их содержание у яровых культур возрастает меньше, чем у озимых. При исследовании экспрессии гена дегидрина (белок DHN-4) было обнаружено, что после 14 дней закалывания в контролируемых условиях (2/-2⁰C) в значительных количествах обнаруживаются три транскрипта, гибридизующихся с кДНК белка DHN-4. После низкотемпературной закалки растений в полевых условиях к ноябрю в растениях накапливался высокий уровень транскриптов дегидрина, при этом растения развивали очень высокую морозостойкость (LT₅₀= -30⁰C) (Robertson et al., 1994). Увеличение уровня синтеза дегидрина с молекулярной массой 50 кДа во время холодовой акклиматизации было отмечено у пшеницы (Houde et al., 1992). Было также установлено, что некоторые из полипептидов, появляющиеся под действием закалывания у других культур (в частности, полипептид с молекулярной массой 60 кДа), также относятся к семейству белков–дегидринов (Arora et al., 1993).

С помощью электрофореза белков в градиенте ПААГ и изоэлектрофокусирования было показано, что закаленные и незакаленные

к холоду листья озимой пшеницы имеют различающиеся белковые спектры (Makinen, Stegemann, 1981). После закаливания наблюдалось появление белковых компонентов с высокой молекулярной массой. В ряде работ (Weidner, Heuel, 1979; Weidner et al., 1982) было высказано предположение, что холодовая обработка индуцирует синтез полипептидов с отличающейся первичной структурой, поскольку этими авторами было установлено, что охлаждение (2 дня при 4⁰С) проростков яровой пшеницы приводит к появлению новых полос не только в спектрах нативных белков, но и в электрофоретических спектрах белков, обработанных додецилсульфатом натрия.

Ф.Р. Гималов с соавторами (1991) констатировали, что под действием холодового шока у пшеницы происходит индукция синтеза полипептидов с молекулярными массами 50, 70 и 94 кДа. Впоследствии этими же авторами (Гималов и др., 1996) был проведен скрининг ряда представителей трибы Triticeae (*Triticum urartu*; *T. monococcum*; *T. sinskajae*; *T. dicoccum*; *T. aestivum* /озимый сорт Альбидум 114, яровой сорт Заря/; *Aegilops longissima*, *Ae. Rauschii*; *Secale cereale* /сорт Чулпан/) для сравнения полипептидов, синтезирующихся у них под действием гипотермии. Обработка объектов низкой температурой (5⁰С) проводилась в течение 7 суток. Радиоактивная метка вводилась в течение последних 24 часов холодовой обработки. При помощи электрофореза в ПААГ и радиоавтографии было установлено, что у всех диплоидных видов (*T. urartu*, *T. sinskajae*, *T. monococcum*) понизился уровень синтеза полипептидов с молекулярной массой 50 и 66 кДа. У всех этих видов в спектре белков появился полипептид с молекулярной массой 43 кДа. В растениях вида *T. urartu* синтезировались также белки с молекулярными массами 20, 27 и 37 кДа; у вида *T. sinskajae* - 20 и 37 кДа, а у *T. monococcum* - 20 и 27 кДа. У эгилопсов в спектрах появлялись белки с молекулярными массами 33 и 43 кДа и наблюдалось увеличение синтеза белков с молекулярными массами 20, 40, 50 и 62 кДа. У *T. dicoccum* наблюдалось уменьшение синтеза белка с молекулярной массой 66 кДа и усиление синтеза белков с молекулярными массами 45 и 48 кДа. В белковом спектре появлялись полосы с молекулярными массами 20, 33 и 43 кДа. У *T. aestivum* наблюдалось появление в спектре белков с молекулярными массами 43 кДа (у озимого сорта Альбидум 114) и 43 и 48

кДа (у ярового сорта Заря). Уменьшалось включение радиоактивной метки в белок 66 кДа (у ярового сорта) и 46 кДа (у озимого сорта). У озимой ржи (*Secale cereale*, сорт Чулпан) было отмечено снижение включения метки в белки с молекулярными массами 13, 38, 50 и 90 кДа и увеличение включения метки в белки с молекулярными массами 15 и 22 кДа. В белковом спектре появлялась полоса с молекулярной массой 28 кДа. Авторы (Гималов и др., 1996) выделяют ряд полипептидов (в частности, с молекулярной массой 43 кДа), которые появляются в белковых спектрах большинства исследованных видов растений под действием пониженной температуры.

Из листьев закаленной к холоду капусты (*Brassica oleracea* L.) был выделен и очищен белок (криопротектин), который защищал тилакоиды незакаленного шпината (*Spinacea oleracea* L.) от повреждения при замораживании (Sieg et al., 1996). Процедура выделения включала в себя осаждение тепловой обработкой, осаждение сульфатом аммония и гликозаминогликаном гепарина, а также колоночную хроматографию на Полиамиде 6 и обращенно-фазную хроматографию на матриксе C-18. После обращенно-фазной хроматографии на электрофореze была выявлена одна полоса с приблизительной молекулярной массой 7 кДа. Эта фракция имела криопротекторную активность. Гель-фильтрация подтвердила, что данный белок является мономером с молекулярной массой 7 кДа. Этот белок можно выделить только из закаленных к холоду растений капусты, но не из растений, выращенных в незакаливающих условиях. С использованием меченых пероксидазой лектинов было показано, что данный криопротектин является гликопротеином и содержит связанный остаток α 1-3 связанной фукозы.

Листья омелы (*Viscum album* L.) содержат тригалактозу и специфические N-ацетилгалактозаминные-изолектиновые группы (ML I, II и III). Группы ML I и ML III показали высокую криозащитную активность в изолированных мембранах тилакоидов шпината (*Spinacea oleracea* L.) в период замерзания и оттаивания почвы, в то время как ML II не обладали такой активностью. В ходе экспериментов установлено, что криозащитная эффективность белков коррелировала с их относительной гидрофобностью. Было установлено также, что морозостойкость листьев омелы сезонно регулируется природными условиями. В то время как

листья, собранные зимой, не повреждались при замерзании почвы до -20°C , листья, собранные в июле, претерпевали 70% утечку электролита после замерзания почвы до -5°C . Данные экспериментов свидетельствуют, что и количество фракций ML I и ML III изменяется в течение года. Наиболее высокое содержание этих криозащитных лектинов наблюдалось зимой и ранней весной, а наиболее низкое - в период летних месяцев. Изменений в содержании ML II не было зафиксировано. Эти данные подтверждают то, что некоторые лектины могут играть роль в стабилизации клеточных мембран под действием стрессовых условий окружающей среды (Hincha et al., 1997).

При изучении влияния развития морозоустойчивости на синтез белков было идентифицировано семейство белков, ассоциированное с развитием морозоустойчивости у пшеницы. Данное семейство белков специфическое для злаков и их содержание регулируется низкой температурой. Антитела, полученные против белка с мол. массой 50 кДа (WCS120), реагируют, по крайней мере, с пятью членами данного семейства. Используя эти антитела, были определены содержание и локализация данного семейства белков в акклиматизированных к холоду всходах пшеницы. Вестерн-блоттинг субклеточных частиц показал наличие всех членов семейства в цитозоле и очищенных ядерных частицах. После 21 дня холодовой акклиматизации озимой пшеницы эти белки накапливались вплоть до 0.9% от всех растворимых экстрагируемых белков. Их клеточная концентрация составляла $1.34\text{ }\mu\text{M}$. Иммуногистохимическая локализация показала, что содержание этих белков наиболее высоко в зоне сосудистого перехода. Эти белки не были обнаружены в зрелой ксилеме, в верхушечной меристеме побегов или в боковых корневых примordiaх. Данная тканеспецифичная индукция позволяет предполагать, что чувствительные клетки в областях, где вода имеет тенденцию замерзать в первую очередь, для своей защиты требуют более высокого содержания этих белков (Houde et al., 1995).

Полученные данные хорошо соответствуют тому факту, что отрастание после замораживания в значительной степени зависит от жизнеспособности данной части побега. Электронно-микроскопический анализ с использованием иммуно-золотой метки показал, что эти белки присутствуют в цитоплазме и в нуклеоплазме. В то же время они не были

найжены в клеточных стенках или других клеточных органеллах. Исследование криозащитного действия *in vitro* показало, что белок WCS120 (PD_{50} 10 $\mu\text{г/мл}$ или 0.2 $\mu\text{М}$) так же эффективно, как БСА и сахараза (в концентрации 250 мМ), защищает лактатдегидрогеназу от денатурации в ходе замораживания (Houde et al., 1995). Эти результаты показывают, что данное семейство белков может быть вовлечено в общий механизм защиты растворимых частиц клетки. Их присутствие в нуклеоплазме также позволяет предложить как их возможную функцию - предохранение процессов транскрипции. Высокая гидрофильность, высокое содержание данных белков и устойчивость этих белков при кипячении позволяют предлагать, что они могут обеспечивать особую микросреду, необходимую для выживания клетки в чувствительной зоне сосудистого перехода во время стресса при замораживании (Houde et al., 1995).

При исследовании взаимосвязи ответов растения на различные типы стресса было обнаружено, что солевой стресс увеличивает морозоустойчивость у некоторых видов травянистых растений. С целью понять молекулярные основы увеличения индуцируемой холодным стрессом морозоустойчивости при помощи двумерного электрофореза в ПААГ был проанализирован эффект обработки солевым раствором (100 мМ NaCl) на состав общих белков растений картофеля (*Solanum commersonii* Dun). После 24 часовой обработки NaCl, во время которой холодоустойчивость возрасла в три раза, были выявлены девять индуцируемых солевым стрессом белков (Ryu et al., 1995). Прямое сравнение этих белков с белками, индуцируемыми низкотемпературным стрессом и экзогенной абсцизовой кислотой, позволило установить, что пять индуцируемых солевым стрессом белков индуцировались также низкотемпературным стрессом (4 /2⁰C), а семь - обработкой абсцизовой кислотой (40 $\mu\text{М}$). Три белка (мол. массы (кДа)/pI 13/7.0, 27/6.6 и 48/6.9) индуцировались и холодом и экзогенной абсцизовой кислотой и были связаны с изменением морозоустойчивости (Ryu et al., 1995). После 6 часов обработки солью, перед тем как развивалась холодоустойчивость, эндогенный уровень абсцизовой кислоты в листьях кратковременно увеличивался в шесть раз. Результаты позволяют считать, что солевая индукция холодового закаливания включает синтез холодоиндуцируемых

и индуцируемых абсцизовой кислотой белков, а также то, что изменение белкового синтеза можно связать с увеличением концентрации абсцизовой кислоты в ответ на солевой стресс. Эти данные также позволяют предполагать, что некоторая часть белков, индуцируемых холодом и абсцизовой кислотой, связана с солевым стрессом (Ryu et al., 1995).

3.2 Влияние гипотермии на содержание водорастворимых белков в тканях бактерий и водорослей

Изменение экспрессии водорастворимых белков в ответ на понижение температуры наблюдается также и у водорослей и у бактерий. Во время резкого понижения температуры в бактериях временно экспрессируются на высоком уровне «индуцируемые холодом белки» (CIP). При помощи двумерного электрофореза в ПААГ были идентифицированы некоторые из этих белков. Несмотря на это, общие функции данных белков, как ответа организма на холодовой шок, в настоящее время все еще неясны. В последнее время наибольшее внимание исследователей сфокусировано на группе «белков холодового шока» (CSP), синтез которых, как было показано, в значительной степени индуцируется во время холодового шока и после него и которые играют важную регуляторную роль в физиологии адаптации микроорганизмов к низким температурам. *E. Coli*, *B. Subtilis* и *B. Cereus* обладают семейством белков, насчитывающим, по меньшей мере, 3 - 7 белков CSP - небольших кислых белков, которые имеют между собой более 45% идентичности в последовательности аминокислот. Последние данные подтверждают, что члены этого широко распространенного семейства белков могут *in vitro* действовать как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. Тем не менее, все функции CSP остаются неизвестными. К тому же, в соответствии с недавно полученными данными, в индукции синтеза CSP также играет важную роль посттрансляционная регуляция. В этот процесс могут быть также вовлечены рибосомы. Это предположение находится в соответствии с моделью, в которой, как предполагается, рибосомы являются температурным сенсором в бактериях (Graumann, Marahiel, 1996).

Перенос *Enterococcus faecalis* в условия низкой температуры (8⁰С от 4 до 30 часов) вызывал усиление экспрессии 11 белков холодового шока. Кроме того, мезофильные прокариоты синтезировали также 10 белков

холодовой акклиматизации, 5 из которых совпадали с белками холодового шока, во время продолжительного роста (до 4 дней) при температуре 8⁰С (Panoff et al., 1997).

Listeria monocytogenes – грампозитивный продовольственный патоген - способен расти при температуре холодильника. При снижении температуры от 37 до 5⁰С у *L. monocytogenes* (штамм 10403S) индуцируется синтез двенадцати белков холодового шока (CSP) с молекулярными массами 48,6; 41,0; 21,8; 21,1; 19,7; 19,2; 18,8; 17,2; 15,5; 14,5 и 14,0 кДа. Это было установлено в экспериментах по включению метки (L-[S-³⁵]метионин) с последующим двумерным электрофорезом в геле. Штамм SLCC53 показал аналогичный ответ на холодовой шок. Белки холодовой акклиматизации наблюдались в культурах штамма 10403S в условиях роста при 5⁰С, четыре из этих белков, с молекулярными массами 48,0; 21,1; 19,7 и 18,8 кДа, также являлись белками холодового шока. Два чувствительных к холоду транспозон-индуцированных мутанта включали метку менее эффективно, чем нечувствительный к холоду родительский штамм, но в то же время ответная индукция белков холодового шока у изученных мутантов была очень похожа на ответную индукцию родительского штамма (Bayles et al., 1996).

Дальнейшее изучение основного белка холодового шока (18 кДа) *Listeria monocytogenes* при помощи двумерного электрофореза показало, что его изоэлектрическая точка (pI) составляет 5.1 (Hebraud, Guzzo, 2000). При помощи N-терминального сиквенса полученного при помощи двумерного электрофореза белка была установлена его полная идентичность с негеминовым железосвязывающим ферритином из *Listeria innocua*. Очистка этого ферритин-подобного белка позволила установить, что его нативная молекулярная масса составляет около 100-110 кДа, что свидетельствует о том, что он состоит из шести 18 кДа субъединиц (Hebraud, Guzzo, 2000). Нозерн-блот анализ показал присутствие его 0.8 kb мРНК в клетках во время фазы экспоненциального роста, а также значительное увеличение количества мРНК этого белка как после падения, так и после возрастания температуры (Hebraud, Guzzo, 2000).

CSPA является основным белком холодового шока *E. coli*, его синтез значительно возрастает в ответ на холодовой шок. Аминокислотная последовательность CSPA имеет 43% идентичности «домену холодового

шока» эукариотического Y-box семейства белков, члены которого взаимодействуют с РНК и ДНК для регуляции их функций. Показано, что CSPA кооперативно связывается с денатурировавшими под действием низкой температуры одноцепочечными РНК, размером больше, чем 74 основания. Для его кооперативного связывания необходима минимальная концентрация CSPA 2.7×10^{-5} М, что значительно ниже, чем присутствующая в клетке после холодового шока концентрация CSPA (10^{-4} М). Для связывания CSPA не было установлено специфических последовательностей РНК, что показывает, что он может связываться с широким спектром последовательностей. Когда состоящий из 142 оснований 5'-нетранслируемый участок собственной мРНК CSPA был использован как субстрат для рибонуклеаз А и Т1, добавление CSPA значительно стимулировало гидролиз РНК путем предотвращения образования РНКазоустойчивых связей из-за образования стабильных вторичных структур в 5'-нетранслируемом участке. Эти данные показывают, что связывание CSPA с РНК дестабилизирует вторичную структуру РНК и делает ее доступной для рибонуклеаз. Предполагается, что CSPA действует как шаперон РНК для предотвращения образования вторичной структуры у РНК при низких температурах. Эта функция CSPA может быть необходима для эффективной трансляции мРНК при низких температурах и, по-видимому, может также оказывать влияние на процесс транскрипции (Jiang et al., 1997).

При падении температуры в клетках *Escherichia coli* обнаружена сильная индукция синтеза важнейшего белка холодового шока - CSPA. Поскольку этот белок весьма консервативен, был использован подход, основанный на PCR с использованием пары дегенерированных праймеров, полученных из высоко консервативных областей cspA-связанных белков, чтобы доказать присутствие как минимум трех связанных с cspA генов в *Lactococcus lactis*. Один из них, cspB, был клонирован и секвенирован. Он кодирует белок из 66 аминокислот, который обладает 60% тождественности последовательности с CSPA из *Escherichia coli*. После холодового шока (падение температуры от 30 до 15⁰ С) уровень транскриптов мРНК CspB увеличивался, что было показано при помощи нозерн-блот гибридизации. Кроме того, наблюдалась индукция активности CSPB-зависимой бета-галактозидазы. Эти результаты указывают на то, что

ген *cspB* из *L. Lactis* индуцируется холодовым шоком (ChapotChartier et al., 1997).

Белок холодового шока *Bacillus subtilis*, CSPB, после гипотермии влияет на уровень содержания нескольких других белков холодового шока в *B. Subtilis*. Экспрессия CSPB в *Escherichia coli* при 37⁰С - в условиях, когда белки холодового шока CSPA и CSPB *E. Coli* не обнаруживаются - приводит к заметному снижению скорости роста клеток и имеет значительное влияние на уровень синтеза других белков. При этом происходит как уменьшение, так и увеличение уровней синтеза специфических белков. В частности, индукция CSPB приводит к усилению активности бета-галактозидазы, экспрессированной из слитых транскриптов *hns-lacZ*. Это увеличение отражает индукцию транскрипции *hns* и синтеза HNS после холодового шока и *in vitro* зависит от присутствия CSPA. Напротив, экспрессия мутантной формы CSPB (CspBf15a), которая неспособна связываться с суперскрученной ДНК *in vitro*, не имела влияния на степени увеличения экспрессии генов, уровня синтеза белка или активность бета-галактозидазы. Эти данные демонстрируют сильное влияние CSPB на синтез белка в *E. Coli* и предполагают аналогичную функцию для CSPA в *E. Coli* по сравнению с CSPB в *B. Subtilis* (Graumann, Marahiel, 1997). Однако впоследствии было установлено, что CSPA и CSPB по-разному связываются с одноцепочечной ДНК (Lopez, Makhatadze, 2000). В частности, в ходе этих исследований было установлено, что, если CSPB связывает поли-Т олигонуклеотиды примерно на порядок сильнее, чем поли-У или поли-С одноцепочечные ssДНК, тогда как CSPA связывает поли-Т, поли-У и поли-С ssДНК с одинаковой интенсивностью (Lopez, Makhatadze, 2000).

Как и другие бактерии, *Bacillus subtilis* обладает семейством гомологов небольших кислых белков (CSPB, CSPC и CSPD, идентичность более 70%), синтез которых индуцируется в ответ на холодовой шок. Делеция генов *cspC* или *cspD* не приводит к видимому изменению фенотипа; напротив, двойные мутанты по генам *csp* проявили серьезное снижение скорости клеточного роста как при 15⁰С, так и при 37⁰С и ухудшение выживаемости во время стационарной фазы роста. С помощью двумерного гель-электрофореза показано, что у двойных мутантов по генам *csp* разрегулирован синтез белка и потеря одного или двух белков

CSP приводит к увеличению синтеза остаточных CSP при 37⁰ C и после холодового шока, что позволяет предположить, что CSP ингибируют синтез других членов этого семейства белков. Тройной мутант cspB/C/D (64bcdbt) мог размножаться только в присутствии CSPB, перенесенного плазмидой, что свидетельствует о том, что хотя бы минимальное количество гена csp необходимо для жизнеспособности *B. Subtilis*. После холодового шока синтез CSPB в 64bcdbt был намного ниже, чем в клетках дикого типа, что сопровождалось прекращением роста и значительным уменьшением общего синтеза белка. Поскольку как CSPB, CSPC, так и CSPD показали способность связывать РНК кооперативным и интерактивным способом, предполагается, что белки CSP действуют как РНК-шапероны, облегчающие иницирование трансляции при оптимальных и низких температурах (Graumann et al., 1997).

При изучении характеристик CSPB было установлено, что CspB из *Bacillus subtilis* конформационно стабилен лишь в двух граничных состояниях, но чрезвычайно быстро меняет свою укладку между этими стабильными состояниями. Изучение соответствующих белков холодового шока из термофильной *Bacillus caldolyticus* и гипертермофильной *Thermotoga maritima* показало, что они обладают значительно более высокой конформационной стабильностью, но с неизменной очень быстрой кинетикой переходов между двумя стабильными состояниями. По-видимому, это неотъемлемое свойство небольших белков, полностью состоящих из β -изгибов (Perl et al., 1998).

В белке холодового шока CSPB из *Bacillus subtilis* имеются три незащищенных остатка фенилаланина (Phe 15, Phe 17 и Phe 27), которые необходимы для его функционирования при связывании с одноцепочечными суперскрученными нуклеиновыми кислотами. Обычно гидрофобные боковые цепи фенилаланина в складчатых белках спрятаны (Schindler et al., 1998). Авторами была предпринята попытка выяснить, может ли экспозиция этих остатков фенилаланина быть причиной низкой конформационной стабильности CSPB. В ходе экспериментов были измерены индуцированные мочевиной и индуцированные нагревом равновесные переходы для трех мутантов CspB, у которых Phe 15, Phe 17 и Phe 27 индивидуально были заменены аланином. Неожиданно было обнаружено, что все три мутации сильно дестабилизировали CspB

(Schindler et al., 1998). Таким образом, ароматические боковые цепи Phe 15, Phe 17 и Phe 27 в активном сайте важны и для связывания с нуклеиновыми кислотами, и для конформационной стабильности.

В целом, согласно современным представлениям, бактериальные белки холодового шока (CSP) функционируют как регуляторы трансляции и РНК-шапероны (Рис. 4). Во время роста при 37⁰С CSP связываются с мРНК и поддерживают ее в линейной форме. Во время трансляции рибосомы вытесняют CSP с мРНК, поскольку CSP обладают более низким сродством к мРНК. Во время холодового шока происходит резкое

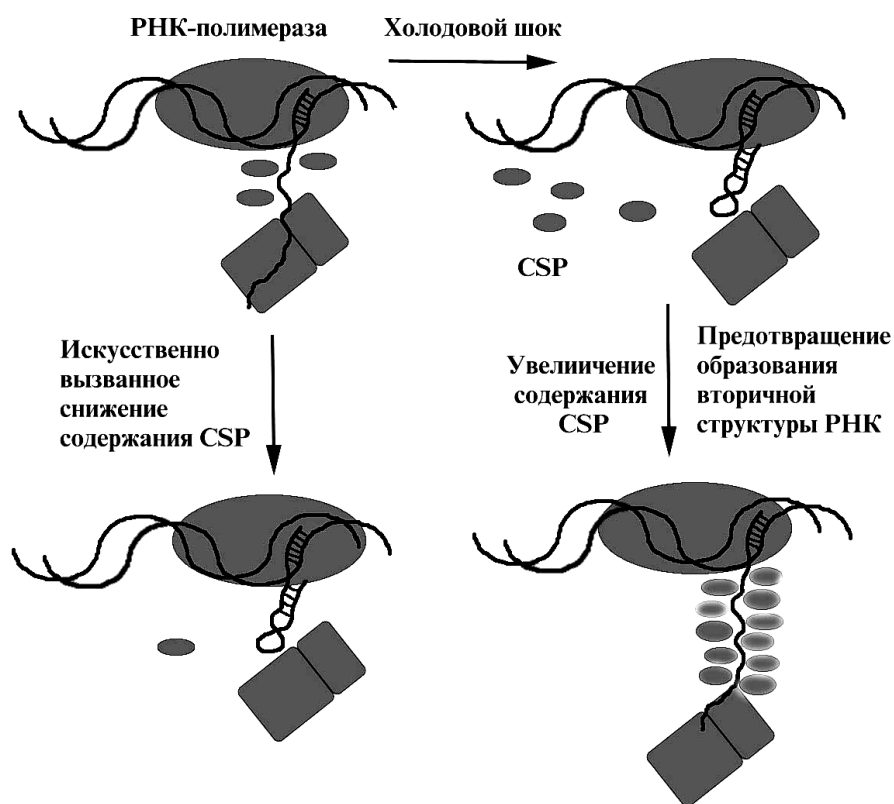


Рис. 4. Модель функционирования бактериальных белков холодового шока (CSP) как РНК-шаперонов, сопрягающих процессы транскрипции и трансляции мРНК (по Graumann, Marahiel, 1998).

увеличение содержания CSP, поскольку это необходимо для уравнивания возрастания стабильности вторичной структуры мРНК.

Искусственное снижение концентрации CSP приводит к образованию вторичной структуры мРНК и прекращению процесса трансляции (Graumann, Marahiel, 1998).

Как показано выше, после резкого падения температуры (холодового шока) различные виды бактерий проявляют мультигенный ответ. Доказательства такого рода ответа на действие холода у *Salmonella typhimurium* были получены при определении диапазона индуцируемых низкими температурами слияний генов, содержавших Mudlux-вставки. Из выделенных Mudlux-слияний генов было найдено одно, которое не производило детектируемого свечения во время выращивания при 30⁰С, но проявило быстрый и высокий уровень индукции при снижении температуры до 10⁰С. Мишень данного слияния гена (который был назван cspB), как было показано, расположена по соседству с umudc опероном и кодирует гомолог основного белка холодового шока *Escherichia coli*, CSPA. Изучение люминесценции показало, что детектируемое свечение происходило от слияния CspB::Mudlux при температурах ниже 22⁰С, но не при более высоких температурах, даже после падения температуры от 30⁰С. Более того, было обнаружено, что уровни содержания мРНК CSPB соответствуют данной модели люминесценции, что позволяет предлагать, что экспрессия cspB происходит ниже определенной пороговой температуры. Как было обнаружено, мРНК CSPB очень стабильна при 10⁰С, но становится чрезвычайно нестабильной, когда температура поднимается выше пороговой. Существующие клеточные РНКазы, таким образом, по-видимому, опосредуют разрушение мРНК CSPB при высоких температурах, но не способны совершать это при низких температурах (Craig et al., 1998).

Необходимо отметить, что белки холодового шока (CSP) у мезофильных и термофильных бактерий имеют большое сходство в структуре, но весьма отличаются в стабильности. Сравнение структуры CSP из мезофилов и гипертермофильной бактерии *Thermotoga maritima* показало большую значимость определенных заряженных групп белковой молекулы для ее стабилизации при низкой температуре (Frankenberg et al., 1999).

Среди белков холодовой адаптации бактерий особое внимание исследователей привлекли археи – психрофильные, мезофильные и

термофильные метаногены. В ходе исследований было установлено, что адаптация этих бактерий к различным температурам роста (от 113⁰С до температур ниже 0⁰С) связана с определенными изменениями в первичной структуре полипептидов, в частности, фактора элонгации 2 (Thomas, Cavicchioli, 1998). Трехмерное моделирование структуры этого белка позволило идентифицировать аминокислотные остатки, которые могут быть важны для обеспечения его функциональной активности при низких температурах.

Снижение температуры в течение 80 минут от 40 до 20⁰С останавливает рост *Bacillus subtilis* и значительно изменяет общие показатели макромолекулярного синтеза. Синтез белков в это время резко уменьшается и восстанавливается после охлаждения параллельно с восстановлением роста. Синтез РНК уменьшается до минимального уровня через 150 минут; впоследствии, транскрипция ускоряется до нового статичного уровня. Уровень синтеза ДНК после 80 минут холодового шока сначала падает до 20%, затем, после восстановления роста, он несколько увеличивается. Напротив, синтез фосфолипидов немедленно после падения температуры до 20⁰С устанавливается на новом уровне равновесия, при этом значительно изменяется состав полярных групп головок фосфолипидов. Это изменение предлагает эффективную адаптацию к холоду структуры бактериальной мембраны (Kunclova et al., 1995).

Synechococcus способен расти при температурах ниже оптимальной температуры роста, хотя и с меньшей скоростью. Электрофорез в геле клеточных белков, меченных с ¹⁴С гидролизатом белка, из обработанных холодом и тепловым шоком клеток, обнаружил различия в уровнях синтеза ряда белков. Молекулярный вес индуцируемых холодом (10-22⁰С) полипептидов был определен как 74, 64.5, 23, 17 и 14.7 кДа. Изучение синтеза белков во времени показало прогрессирующую индукцию некоторых белков холодового шока (CSP) при 13⁰С. Тепловой шок вызвал немедленную репрессию синтеза большинства нешоковых белков. Результаты исследований показали, что фотосинтетическая активность и области критических температур у *Synechococcus* зависят от температуры выращивания. Уменьшение потребления О₂ колебалось в пределах изученной низкотемпературной области от 37% до 47%. При температуре

10 и 13⁰С происходило быстрое ингибирование фотосинтетической активности (до 50%) после 17 и 29 минут, соответственно. Кроме того, при 13⁰С происходили изменения в спектре поглощения света образцом, что указывает на участие в данном случае общего механизма. Авторами предполагается, что холод вызывает функциональное отделение фикобилисом от хлорофилл-белкового комплекса (Hammouda, Borbely, 1996).

Индукцируемые закаливанием к холоду растворимые белки *Chlorella vulgaris* Beijerinck IAM C-27 были выделены и очищены при помощи двумерной жидкостной хроматографии высокого разрешения (2d-hplc) на анионо-обменной колонке с последующей обращенно-фазовой хроматографией. Некоторые из белков были разделены при помощи SDS-электрофореза, охарактеризованы путем аминокислотного секвенирования и отождествлены путем поиска гомологии в базах данных. В ходе эксперимента было установлено увеличение содержания, по крайней мере, 31 белка. Особый интерес представляла собой индукция синтеза после 12 часов закалывания белка с мол. массой 10 кДа с аминокислотной последовательностью аминокислот AGNKPITEQISDAVGAAGQKVG и индукция после 6 часов закалывания белка с мол. массой 14 кДа с аминокислотной последовательностью ALGEESLGDKAKNAFEDAK. Аминокислотные последовательности этих белков показывают, что они являются гомологичными с LEA-белками. Более того, уровень содержания белка 22-кДа также возрос после 12 часов закалывания. Аминокислотная последовательность этого белка, AAPLVGGPAPDFTAAAVFD, показывает, что он имеет гомологию с тиоредоксин-пероксидазой (Honjoh et al., 1995).

Таким образом, низкотемпературный стресс вызывает значительные изменения в содержании некоторых водорастворимых белков. Среди индуцируемых низкотемпературным стрессом белков выделено несколько семейств, определены их функции в клетке во время низкотемпературного стресса и их характеристики.

3.3 Влияние гипотермии на активность и содержание ферментов в тканях высших растений

Значительное количество выполненных к настоящему времени работ посвящено влиянию гипотермии и акклиматизации к холоду на активность и новообразование различных ферментов. Так, было отмечено, что активность инвертазы при гипотермии у морозостойких сортов ржи и пшеницы повышалась, а у слабоморозостойких - снижалась (Колупаев и др., 1993). Понижение температуры приводит к значительным как качественным, так и количественным изменениям в изоферментных спектрах малатдегидрогеназы в листьях пшеницы (Makinen, Stegemann, 1981) и многолетних злаковых растений (Жибоедов и др., 1994). В проростках озимой пшеницы были обнаружены две специфические рибонуклеазы с различными температурными оптимумами активности (Sasaki, Sasaki, 1976). Благодаря их наличию изменение температуры может приводить к активации или инактивации различных рибонуклеазных систем, что создает возможность регуляции интенсивности синтеза РНК и белков (Браун, 1983).

В периоды осеннего закаливания и весеннего «пробуждения» растений озимой ржи изоферментный состав пероксидазы в узлах кущения претерпевает значительные изменения. Наблюдается значительное увеличение числа изоферментов, причем у морозоустойчивого сорта они образуются раньше и в большем количестве, чем у морозочувствительного сорта (Файзулин, Лукманова, 1987).

У кукурузы обнаружены две группы изоферментов пероксидазы, различающихся по реакции на гипотермию. Если изоферменты первой группы претерпевают лишь количественные изменения, связанные с увеличением содержания той или иной изоформы, то изоферменты второй группы претерпевают качественные трансформации, поскольку происходит изменение их антигенной структуры. Эти изменения зависят от напряженности стресса и холодоустойчивости линий кукурузы (Савич, 1990). Также были обнаружены качественные и количественные изменения изоферментов пероксидаз в подвергшихся охлаждению листьях пшеницы (Савич, Таджибаева, 1988). Обнаружены закономерности в изменениях пероксидаз сорго при гипотермии, при этом рассчитаны

коэффициенты корреляции и их зависимость от длительности и интенсивности холодового стресса (Савич, 1989а,б).

При снижении температуры роста проростков пшеницы с 23 до 4⁰С наблюдалось возрастание активности сахарозосинтетазы, что вызывало быстрое увеличение уровня содержания сахарозы в листьях. Позднее при помощи антител к этому ферменту и использовании блоттинг-анализа при изучении экспрессии сахарозосинтетазы у пшеницы во время холодовой акклиматизации было установлено, что при понижении температуры до 4⁰С в течение 14 дней происходит увеличение количества пептида сахарозосинтетазы в 5 - 6 раз (Crespi et al., 1991).

Также было отмечено возрастание активности высокомолекулярной формы фосфофруктокиназы в листьях райграса многолетнего, подвергшихся холодовому закаливанию. При этом активность фосфофруктокиназы с низкой молекулярной массой оставалась без изменений (Breedemeijer, Esselink, 1994).

Другими авторами было отмечено значительное увеличение активности сахарозофосфатсинтетазы в листьях при низкотемпературной обработке. Это увеличение происходило из-за синтеза субъединиц фермента как во время, так и после действия гипотермии (Guy et al., 1992б).

При закаливании проростков озимой пшеницы в первой (+2⁰С) и второй (-4⁰С) фазах закаливания отмечалось повышение активности пептидгидролаз, причем максимальная активность наблюдалась у морозоустойчивого сорта после второй фазы закаливания (Вовчук и др., 1994).

Скрининг рибулозобифосфаткарбоксилазы у различных по холодоустойчивости сортов риса позволил установить, что у растений чувствительного к холоду сорта при гипотермии содержание малой и большой субъединиц Rubisco уменьшается, у устойчивого к холоду сорта их содержание увеличивается, а у растений среднеустойчивого к холоду сорта - остается без изменений (Shakya, A rawal, 1993).

При изучении вклада антиоксидантов в акклиматизацию к холоду в различных тканях выращенных в темноте проростков кукурузы (*Zea mays* L.) в отношении холодоустойчивости и защиты от вызванного образованием льда окислительного стресса было установлено, что

охлаждение вызывает накопление H_2O_2 как в колеоптиле и листе, так и в мезокотиле, но не в корнях, в то время как акклиматизация предотвращает этот процесс. Ни один из противooksидлительных энзимов не воздействовал на акклиматизацию при охлаждении в колеоптиле, листе и корне. Тем не менее, повышенные уровни глутатиона в акклиматизированных проростках могут содействовать увеличению способности перерабатывать H_2O_2 в колеоптиле и листе. В мезокотиле (визуально наиболее повреждаемом при охлаждении) уровень содержания каталазы увеличивался при акклиматизации проростков и это может быть первой стадией защиты от генерируемого митохондриями H_2O_2 . Содержание девяти из наиболее известных изозимов пероксидазы индуцировалось акклиматизацией. Два из них локализованы в клеточной стенке, что позволяет предположить их участие в процессе лигнификации. Содержание лигнина увеличивалось в мезокотиле акклиматизированных проростков, по-видимому, для повышения прочности мезокотилия. Содержание одного изозима цитозольной глутатион-редуктазы существенно уменьшалось в акклиматизированных проростках, в то время как двух других - увеличивалось, что, возможно, повышает эффективность энзима при низкой температуре. Все это, взятое вместе, иллюстрирует потенциальные пути в акклиматизации к охлаждению, при помощи которых может улучшаться выживание проростков кукурузы (Anderson et al., 1995).

Антиоксидантная активность ферментов была определена в первых, третьих и пятых ярусах листьев четырех имеющих различающуюся чувствительность к охлаждению инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.). При фотопериоде 16:8 (свет: темнота) растения подвергались одному из трех видов воздействия: (1) контроль ($25^{\circ}C$), (2) контрольная обработка плюс воздействие краткосрочным холодовым шоком ($11^{\circ}C$ 1 день перед уборкой урожая) и (3) длительного ($11^{\circ}C$ постоянно) охлаждения. В ходе экспериментов были оценены активность каталазы (CAT; EC 1.11. 1.6), аскорбатпероксидазы (ASPX; EC 1.11. 1.11), супероксиддисмутазы (GR; EC 1.15. 1.1), глутатионредуктазы (GR; EC 1.6. 4.2), и монодегидроаскорбатредуктазы (MDHAR; EC 1.6. 5.4). Как общие метаболические индикаторы стресса, были определены редуцированные и нередуцированные сахара и концентрация крахмала. Установлено, что

уменьшение активности CAT, ASPX и MDHAR может вызывать снижение устойчивости к охлаждению на ранних стадиях развития у кукурузы. Обнаруженные изменения в уровнях содержания сахара и крахмала указывают на более быстрое уменьшение утилизации углеводов по сравнению с уровнем фотосинтеза в чувствительной к охлаждению линии при краткосрочном холодовом шоке и предположительно вносят большой вклад в акклиматизацию в толерантных линиях в течение длинного периода охлаждения (Hodges et al., 1997).

Для исследования влияния стресса на экспрессию сахарозосинтетазы сахарной свеклы из корней *Beta vulgaris* с использованием гетерологичной кДНК сахарозосинтетазы из картофеля была выделена кДНК сахарозосинтетазы. Клон кДНК длиной 2762 оснований, обозначенный SBSS 1, кодирует полипептид из 822 аминокислотных остатков с предсказанной молекулярной массой 93,7 кДа. Предсказанная аминокислотная последовательность сахарозосинтетазы имеет 65-70% гомологии с последовательностями сахарозосинтетаз других видов. РНК-блот анализ показал, что SBSS 1 предпочтительно экспрессируется в корнеплоде в нормальных условиях. Воздействие низкой температуры и анаэробия вызывают увеличение содержания мРНК SBSS 1 в листьях и корнях. В то же время раневой стресс вызывает уменьшение содержания ее транскриптов (Hesse, Willmitzer, 1996).

При изучении механизма накопления фруктанов при холодовом воздействии (2⁰С, 6⁰С) использованы разновидности пшеницы (*Triticum aestivum* L. cv. Norin 61 и Yukichabo), отличающиеся по накоплению этих метаболитов. В ходе этих экспериментов был проведен сравнительный анализ изменений в содержании сахарозо-сахарозофруктозил трансферазы (SST; EC 2.4.1.99) и фруктанэкзогидролазы (FEN; EC 3.2.1.80). Было показано, что под действием низкой температуры с увеличением активности SST и уменьшением активности FEN концентрация фруктанов повышалась. Накопление фруктанов усиливалось при высокой активности SST при обработке низкой температурой (-2⁰С), что предлагает участие SST в накоплении фруктанов. При изучении разновидности пшеницы Norin 61, имеющей очень высокое накопление фруктанов и содержащей FEN высокой активности, было установлено, что с 10-ого дня действия температуры 6⁰С при увеличении активности FEN

концентрации фруктанов у Norin 61 уменьшаются, что позволяет предполагать, что генотипическое различие в накоплении фруктанов в основном зависит от уровня активности FEN (Yukawa et al., 1995).

В листьях растений озимого масличного рапса (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L. cv Jantar), выращенных в течение 3 недель при 2⁰С и затем подвергнутых в темноте кратковременному замораживанию и оттаиванию (-5⁰С в течение 18 часов с последующим оттаиванием 6 часов при 2⁰С), показаны возрастание морозоустойчивости растений и изменения в активности фенилаланин-аммоний лиазы (PAL, EC 4.3.1.5). Эти изменения заключались, во-первых, в значительном увеличении в общей и специфической активности фермента, отмеченной в течение первых 2 дней обработки растения низкой температурой, и, во-вторых, кратковременном значительном увеличении активности PAL, отмеченной сразу после замораживания и оттаивания. Также наблюдались изменения в каталитических активностях фермента, экстрагированного из предварительно обработанных холодом листьев: K_m для L-фенилаланина уменьшалась от 25 до 20 мМ, оптимум рН приближался к 8.4, фермент стал менее чувствительным к суб- или супероптимальным температурам, хотя оптимальная температура для активности фермента (35⁰С) в целом не изменялась в ходе акклиматизации. Изменения в активности PAL в ходе акклиматизации растения к низким температурам указывают, что фенилпропаноидный метаболизм может играть важную роль в развитии устойчивости растений к низким температурам (Solecka, Kasperska, 1995).

Пируват-ортофосфат дикиназа (PPDK) — фермент, играющий важную роль в процессах C-4 фотосинтеза, - типичный чувствительный к холоду энзим. Тем не менее, холодоустойчивая форма энзима была выделена из листьев *Flaveria brownii*. Изучение сайтонаправленного мутагенеза в системе экспрессии с использованием *E. Coli* и кДНК к PPDK из *F. Brownii* (холодоустойчивый вид), *F. Bidentis* (холодочувствительный вид) и кукурузы (промежуточно холодоустойчивый вид), показало, что всего три аминокислоты (из 880 аминокислот полипептида) сильно влияют на холодочувствительность PPDK из *Flaveria brownii*. Анализ экспрессированной в *E. Coli* PPDK при помощи гель-фильтрации показал, что ассоциация субъединиц этого фермента и холодоустойчивость тесно связаны (Ohta et al., 1997).

Два сорта (морозоустойчивый Sadovo 1 и морозочувствительный San Pastore) озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) были использованы для анализа защитного эффекта молибдена во время промораживания растений, выращенных на кислых почвах. Авторы отслеживали эффект холодовой акклиматизации (2⁰С в течение 7 дней) и промораживания (-5⁰С в течение 16 часов) на активности нитратредуктазы (NR), нитритредуктазы (NiR) и глутаминсинтетазы (GS) в листьях пшеницы, выращенной как на почве с pH 6.0, так и на почве с pH 4.5. Между сортами не было обнаружено никаких различий в изменениях активности ферментов, вызванных температурой. В течение холодовой акклиматизации активность трех ферментов повышалась независимо от pH почвы; это увеличение было наиболее выраженным для активности NADH:NR и сопровождалось увеличением содержания белка NR. Промораживание влияло только на активность NR в растениях, выращенных на кислой почве; наиболее сильный спад обнаруживался для активности NADH:NR и частично для активности FADH:NR. Молибден поддерживал рост озимой пшеницы cv. Sadovo 1 на почвах с pH 4.5, предохраняя от вызванного морозом спада активности NADH:NR (Yaneva et al., 1996).

Хотя и установлено, что устойчивость АТРазы V-типа при температурах от 0 до 4⁰С уменьшается в присутствии субстрата, механизм ее инактивации до сих пор малопонятен. Было проведено изучение индукции холодовой инактивации вакуолярной Н⁺АТРазы при 0⁰С у кукурузы (*Zea mays* L.) при помощи различных нуклеотидных аналогов, которые были определены как конкурентные или неконкурентные ингибиторы АТР-зависимого протонного транспорта, в сравнении с субстратной АТР. При 30 минутной инкубации при 0⁰С в присутствии 10 мМ KNO₃ и 2 мМ MgSO₄ либо не было отмечено, либо было отмечено незначительное падение активности. Добавление 2 мМ АТР вызвало значительное ингибирование за тот же период. Неконкурентные ингибиторы, такие как 5'-аденилилимидодифосфат и 2',3'-О-(4-бензоилбензоил)-аденозин трифосфат, не ускоряли потерю активности. Следовательно, связывание нуклеотидов не было достаточно для холодовой инактивации. Конкурентный ингибитор: диальдегид производная АМР, ускорял холодовую инактивацию Н⁺-АТРазы, но значительно меньше, чем АТР. Во время холодовой инкубации АТР и

диальдегид производная АМР гидролизывались, в то время как два неконкурентных ингибитора нет. Гидролиз нуклеотидов при 0°C был связан со степенью холодовой инактивации. Эти результаты позволяют считать, что гидролиз нуклеотидов при 0°C, а не их связывание, вызывает нестабильность комплекса H⁺-АТРазы, которая ведет к холодовой инактивации (Brauer et al., 1995).

Для определения возможных механизмов, ответственных за дифференциальный ответ на низкие температуры, среди экотипов обладающей С-4 типом фотосинтеза сорной травы вида *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv., определялась специфическая активность пяти антиоксидантных ферментов, ответственных за устранение или уменьшение содержания свободных радикалов и перекиси водорода в течение индуцированного холодом фотоингибирования у 5-недельных растений двух популяций, собранных с мест с контрастным климатом - Quebec (QUE) и Mississippi (MISS). Активности ферментов измерялись при температурах, изменяющихся от 5 до 30°C. При низких температурах активности аскорбатпероксидазы, монодегидроаскорбатредуктазы, дегидроаскорбат-редуктазы и глутатионредуктазы были значительно выше в акклиматизированных к холоду растениях популяции QUE, чем в акклиматизированных к теплу растениях популяции MISS. Специфическая активность супероксиддисмутазы, оцененная при 5 и 25°C, была одинакова у растений обеих популяций *E. crusgalli*. Концентрации аскорбата не различались среди растений двух популяций, что позволяет считать, что наблюдаемые различия в специфической активности аскорбатпероксидазы, оцененной при 5°C, действительно отражают связанную с процессом фотоингибирования лучшую возможность энзима QUE редуцировать H₂O₂ до воды в температурных условиях. Усиление специфической активности четырех из пяти антиоксидантных ферментов, показанное в адаптированной к холоду популяции QUE при низких температурах, коррелирует с синдромом низкотемпературной адаптации, изученным у растений этой популяции в более ранних исследованиях (Nakam, Simon, 1996).

Ферменты, модифицирующие компоненты клеточной стенки, по-видимому, играют критическую роль в изменении размера, формы и физических свойств клеток растений. Предполагается, что регулирование

такой модификационной активности может играть важную роль в течение морфогенеза и в выявлении изменений в развитии ряда признаков, которые возникают в ответ на внешние условия. Предшествующие работы показали, что ген *Arabidopsis* ТСН4 кодирует ксилоглюканэндотрансглюканазу (ХЕТ), которая влияет на важнейшие гемицеллюлозы клеточной стенки растения. Экспрессия ТСН4 эффективно усиливается в ответ на действие различных стимулов окружающей среды (включая прикосновение, ветер, темноту, тепловой и холодовой шок), а также гормонов ауксина и брассиностероидов. Было установлено наличие обширного ХЕТ-связанного семейства генов (ХТR) в *Arabidopsis*. Дополнительно к ТСН4, это семейство включает два прежде идентифицированных гена, EXT и Meri-5, и по крайней мере пять дополнительных генов. кДНК к семейству ХТR обладают от 46 до 79% тождеством последовательности, и предсказанные белки ХТR обладают от 37 до 84% тождеством. Все восемь белков включают потенциальную N-терминальную сигнальную последовательность, и большинство из них имеют консервативный мотив (DEIDFEFLG), который обнаруживается также в бациллярной бета-глюканазе и может быть важен для функционирования энзима. Семейство гена ХТR обладает различной чувствительностью к факторам окружающей среды и гормонам. Величина и кинетика регулирования различаются для разных генов. Дифференциальное регулирование экспрессии этого сложного семейства генов, которое может управлять свойствами клеточных стенок и тканей во время развития и в ответ на воздействие окружающей среды, предполагает участие связанных, но четко различающихся ферментов, модифицирующих клеточную стенку (Xu et al., 1996).

С помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS и флюорографии радиоактивно меченых *in vivo* белков было установлено, что синтез хитиназы в побегах бермудской травы “Midiron” и “Tifgreen” (*Cynodon dactylon* L. Pers. x *C. transvaalensis* Burt-Davy) коррелирует с холодной акклиматизацией. Возрастающий синтез некоторых белков во время холодной акклиматизации в побегах Midiron коррелирует с большей морозоустойчивостью Midiron по сравнению с Tifgreen. Этот анализ предпринимался для того, чтобы, во-первых, охарактеризовать дальнейшие изменения в белковом синтезе в побегах

Midiron и Tifgreen, и, во-вторых, идентифицировать регулируемые холодом белки (COR), кодируемые генами, экспрессия которых усиливается в течение холодной акклиматизации. Растения выращивались 26 дней в растильнях с контролируемыми условиями среды во время акклиматизации [8/2⁰С (день/ночь) циклы с 10 часовым фотопериодом] или в неакклиматизирующих [28/24⁰С] условиях. Белки, синтезированные изолированными побегами, радиоактивно метились *in vivo* в течение 16 часов с S⁻³⁵-метионином и S⁻³⁵-цистеином. Было показано, что среди различных групп COR белков низкомолекулярные (около 20-28 кДа) основные белки COR синтезировались в большем наборе и больших количествах в побегах Midiron, чем в побегах Tifgreen. Основным белком COR 27-кДа синтезировался в побегах как Midiron, так и Tifgreen. Этот белок из побегов Midiron был обозначен COR27 и идентифицирован путем сиквенса белка как хитиназа (Е.С. 3.2.1.14) (Gatschet et al., 1996).

3.4 Влияние гипотермии на активность и содержание ферментов бактерий

В качестве модели для изучения изменений в спектре белков под действием температуры было предложено использовать *E. coli*, поскольку было установлено, что среди 133 белков, идентифицированных у этого организма при помощи двумерного электрофореза и составляющих 70% массы белков клетки, некоторая часть значительно меняется при изменении температуры (Herendeen et al., 1979). Было также отмечено, что метаболическая координация в интервале температур 23-27⁰С достигается за счет увеличения активности, а не количества ферментов. При выходе температуры за рамки указанного диапазона происходит изменение содержания большинства белков, причем количество девяти из них увеличиваются в 5 - 25 раз. Содержание трех белков является простой линейной функцией температуры (убывающей для двух и возрастающей для одного белка) в интервале 13.5-16⁰С (Herendeen et al., 1979).

Психротропная бактерия, вырабатывающая акклиматизированную к холоду липазу во время роста при низких температурах, была выделена из почвы Аляски и идентифицирована как штамм *Pseudomonas*. У этого штамма был клонирован и секвенирован ген липазы (*lipP*). Вычисленная из нуклеотидной последовательности гена (924 основания) аминокислотная

последовательность соответствовала белку размером 308 аминокислотных остатков с молекулярным весом 33714 Да. LipP также имеет консервативный консенсусный мотив с другими акклиматизированными к холоду липазами, такими, как липаза 2 из антарктической *Moraxella* TA144 и гормон-чувствительная липаза млекопитающих. Пентапептид GDSAG предположительно содержит сериновый и BG дипептидный активные сайты. LipP был очищен из экстракта рекомбинантных клеток *Escherichia coli*, содержащих плазмиду C600, кодирующую ген lipP. Фермент показал 1.3-позиционную специфичность по отношению к триолеин, р-нитрофениловым эфирам жирных кислот с короткими и средними цепями (C-4 и C-6), которые являлись для него хорошими субстратами. Фермент был стабилен при pH между 6 и 9, а оптимальный pH для ферментативного гидролиза трибутирина был около 8. Энергия активации для гидролиза р-нитрофенил бутирата и р-нитрофенил лаурата была определена как 11.2 и 7.7 кКал/Моль, соответственно, в температурном диапазоне между 5 и 35°C. Фермент был нестабилен при температурах выше, чем 45°C. Км фермента для р-нитрофенил бутирата увеличивалась с увеличением температуры. Фермент сильно ингибировался Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} и Hg^{2+} , но не ингибировался фенилметилсульфонилфлюоридом и динитрофенилфосфатом. Различные водорастворимые органические растворители, такие, как, например, метанол и диметилсульфоксид при концентрациях от 0 до 30% активировали фермент (Choo et al., 1998).

Цианобактерии способны в ответ на уменьшение температуры десатурировать жирные кислоты в липидах своих мембран. Цианобактерия *Synechocystis* sp. PCC 6803 содержит четыре десатуразы, которые специфически катализируют десатуриацию в $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$ и $\Delta 3$ позициях жирных кислот. Уровни мРНК, транскрибированных с генов, кодирующих $\Delta 6$, $\Delta 12$ и $\Delta 3$ десатуразы, повышаются примерно в 10 раз, но в разной степени, при уменьшении температуры с 34 до 22°C, в то время как уровень мРНК для $\Delta 9$ десатуразы остается константой. Увеличение уровней содержания мРНК было вызвано как усилением транскрипции, так и возрастающей устойчивостью мРНК к низкой температуре. Вестерн-блоттинг показал, что уровни содержания $\Delta 6$, $\Delta 12$ и $\Delta 3$ десатураз в разной степени повышаются при низкой температуре, в то время как содержание $\Delta 9$ десатуразы остается постоянным. Эти наблюдения указывают на то, что

экспрессия генов для четырех десатураз регулируется температурой различными путями (Los et al., 1997).

3.5 Влияние гипотермии на содержание мембранных белков.

Изменения в содержании водонерастворимых белков растений при гипотермии изучены гораздо слабее, чем водорастворимых. Данные по количественным изменениям этих белков при охлаждении и закаливании весьма противоречивы (Broun, Bixby, 1975; Gusta, Weiser, 1972; Kasperska-Palasz, Weinslinska, 1977б). Ранее исследователями были получены отдельные сведения о поведении белков в мембранах хлоропластов при закаливании растений к холоду (Huner, Macdowall, 1975). Было также обнаружено, что при охлаждении томатов в темноте изменяется синтез хлоропластного белка с молекулярной массой 35 кДа (Liu et al., 1994). Однако в последние годы изменения в содержании мембранных белков растений привлекают все большее внимание исследователей.

Вызванные холодом изменения в белках плазматических мембран, связанные с развитием морозоустойчивости, были изучены у проростков озимой ржи (Uemura, Yoshida, 1984) и у холодоустойчивой озимой пшеницы (Zhow et al., 1994). Объектом такого рода исследований явились два сорта со значительными генотипическими различиями в способности к холодовой акклиматизации: сорт яровой пшеницы Chinese Spring и сорт озимой пшеницы Norstar. После четырех недель холодового закаливания холодоустойчивость побегов озимой пшеницы возросла до -18°C , в то время как у яровой пшеницы только до -8°C . Холодоустойчивость корней растений обоих сортов возросла незначительно. Холодовая акклиматизация вызвала значительные как сорто-, так и тканеспецифичные изменения в электрофоретических спектрах белков плазматических мембран (Zhow et al., 1994). Уменьшение уровня содержания полипептидов с молекулярными массами от 22 до 31 кДа отмечалось как в корнях, так и в побегах растений обоих сортов пшеницы, при этом содержание полипептидов с молекулярными массами 26 и 28 кДа резко снижалось только после одной недели холодовой акклиматизации. Напротив, уровни содержания полипептидов 17, 18, 23, 52, 83 и 89 кДа возрастали в побегах озимой пшеницы, при этом увеличение количества полипептидов с молекулярными массами 17, 18 и 23 кДа было

пропорционально увеличению холодоустойчивости. В то же время в корнях растений обоих сортов значительное увеличение отмечалось только для полипептида с молекулярной массой 17 кДа.

Содержание других белков корней озимой пшеницы, таких как 18 и 52 кДа, увеличивалось незначительно, содержание полипептидов с молекулярными массами 83 и 89 кДа не изменялось, а содержание полипептида с молекулярной массой 23 кДа в корнях растений обоих сортов уменьшалось. Белки плазматических мембран, содержание которых изменяется при холодовой акклиматизации, авторами были разделены на две группы: 1) белки, содержание которых резко снижается в начале процесса холодовой акклиматизации независимо от сорта или органа (26, 28 и 31 кДа) и 2) белки, содержание которых возрастает только в побегах холодоустойчивой озимой пшеницы (17, 18, 23, 52, 83 и 89 кДа) (Zhou et al., 1994).

При исследовании мембранных белков контрастных по морозоустойчивости сортов озимой пшеницы Альбидум 114 и Безостая 1 было установлено, что первый лист растений морозоустойчивого сорта Альбидум 114 содержит больше мембранных белков и накопление их идет интенсивнее, чем у слабоморозоустойчивого сорта Безостая 1. После закаливания растений к холоду содержание мембранных белков хлоропластов первого листа у морозоустойчивого сорта возрастало, в то время как у слабоморозоустойчивого не изменялось. Было отмечено также большее содержание низкомолекулярных полипептидов у морозоустойчивого сорта. Так, если количество полипептида с молекулярной массой 14.5 кДа при закаливании растений пшеницы Альбидум 114 увеличивалось в 10 раз, то у пшеницы Безостая 1 увеличение происходило только в 1,5 раза. Предполагается, что эти полипептиды ответственны за процессы циклического фосфорилирования, вклад которого в образование АТФ увеличивается в неблагоприятных условиях (Джанумов, Кузанын, 1987).

При исследовании состава полипептидов митохондрий озимой пшеницы при адаптации к низким температурам было установлено, что у холодоустойчивого сорта Мироновская 808 в спектре митохондриальных белков появляются полипептиды с молекулярными массами 85, 62, 55, 49 и

42 кДа, в то время как у малохолодостойкого сорта Безостая 1 - 83, 82, 56, 50, 45 и 43 кДа (Авхадиева и др., 1993, 1995).

Интересные данные были получены при цитохимическом изучении гликопротеинов на клеточных мембранах различающихся по морозоустойчивости сортов озимой пшеницы во время холодового закаливания. При сравнении холодоустойчивого сорта Yanda 1817 и неустойчивого к холоду сорта Zhengzhou 39-1 было отмечено накопление гликопротеинов в виде частиц, распределенных на плазмалемме, эндоплазматическом ретикулуме, ядерной оболочке и тонопласте. После низкотемпературного стресса количество гликопротеинов на эндоплазматическом ретикулуме и ядерной оболочке у холодоустойчивого сорта резко возрастало. Отмечалась также их транспортировка в плазмодесмы. У неустойчивого к холоду сорта эти процессы не наблюдались (Jian et al., 1991).

Синтез двух хлоропластных белков с молекулярными массами 32 и 34 кДа в значительной степени индуцируется в ответ на прогрессивный водный дефицит в целых растениях *Solanum tuberosum* (Pruvot et al., 1996). Эти хлоропластные засухоиндуцируемые стрессовые белки, накапливающиеся в строме и в тилакоидах, были обозначены CDSP 32 и CDSP 34, соответственно. Впоследствии были исследованы эффекты низкой температуры и высокой концентрации соли на синтез белков CDSP. Было показано, что холодовая обработка растений не влияла на накопление белка CDSP 32, а солевой стресс, наоборот, вызывал усиление его синтеза. Синтез тилакоидного белка CDSP 34 усиливался как после холодового, так и после солевого стресса (Pruvot et al., 1996). Значимое увеличение содержания абсцизовой кислоты (по крайней мере в 2.5 раза) было установлено в листьях растениях, подвергнутых водному дефициту, высокой концентрации соли или низкой температуре. Вклад абсцизовой кислоты в синтезе двух белков был исследован при помощи опрыскивания хорошо-увлажненных растений раствором 100 мкМ абсцизовой кислоты в течение 15 дней. Эта обработка вызывала 15-кратное увеличение содержания абсцизовой кислоты в листьях. В то время как синтез белка CDSP 32 не индуцировался добавлением экзогенной абсцизовой кислоты, синтез белка CDSP 34 индуцировался им в значительной степени. Основываясь на этих результатах, был сделан вывод, что абсцизовая

кислота является вероятным медиатором, усиливающим синтез CDSP 34 при засухе, низких температурах и высокой концентрации соли в среде, и что другой сигнал, вероятно, связанный с высоким осмотическим давлением, включает индукцию синтеза CDSP 32 (Pruvot et al., 1996).

Таким образом, имеющиеся в настоящее время данные позволяют констатировать, что низкотемпературное воздействие и закаливание к холоду приводят к значительным изменениям в содержании белков растений. Эти изменения в содержании белков отражают сдвиг баланса их синтеза и распада, что отражается на появлении или исчезновении ряда компонентов на электрофореграммах белковых смесей, выделенных из растений после гипотермии (Браун, 1983). В связи с этим представляется интересным рассмотреть изменения на посттрансляционном уровне, связанные с воздействием гипотермии.

3.6 Влияние гипотермии на фосфорилирование белков

Известно, что воздействие низких температур вызывает фосфорилирование ряда белков. Уменьшение фосфатазной активности при температурах ниже 12⁰С вызывает гиперфосфорилирование белка с молекулярной массой 58 кДа (PP58) в бесклеточном растительном экстракте. Температурный порог гиперфосфорилирования PP58 совпадает с температурным порогом индуцируемого холодом притока кальция. Поскольку приток кальция вызывается различными типами стресса, предполагается, что наблюдаемое прямое действие холода на фосфорилирование определенных белков позволяет клетке связать кальциевый сигнал с холодоспецифическими путями передачи (Monroy et al., 1997). Этими же авторами (Monroy et al., 1997) было показано, что акклиматизация к холоду и специфическая для холодовой акклиматизации экспрессия генов *cas* в люцерне требуют индуцированного холодом притока кальция и фосфорилирования специфических синтезированных предварительно белков. Экспрессия гена *cas15* была использована в качестве индикатора конечного пункта для выяснения роли фосфорилирования белков в передаче низкотемпературного сигнала в клетках люцерны. В то время как ингибитор протеинкиназы стауроспорин предотвращал холодовую индукцию *cas15*, ингибитор протеинфосфатазы - оадаиновая кислота индуцировала *cas 15* при 25⁰С. Показано, что при

воздействии на клетки холодом общая активность клеточной протеинфосфатазы быстро уменьшается на 30%, но все это уменьшение может быть обусловлено почти полным ингибированием протеинфосфатазы 2А (PP2A). В ходе экспериментов установлено, что данная холодовая инактивация PP2A оказалась опосредованна притоком кальция и могла быть воспроизведена при 25⁰С обработкой клеток ионофором кальция А23187 или антагонистом кальциевого канала К8644. При обработке клеток холодом уровень содержания транскриптов и каталитической субъединицы белка PP2A (PP2AC) не уменьшались, но в то же время связывание анти-pp2ac антител с нативным PP2AC возросло, что указывает на демаскирование эпитопа PP2AC (Monroy et al., 1998).

При исследовании действия холодового стресса на фосфорилирование *in vitro* белков в листьях проростков риса (*Oryza sativa*) было установлено, что экспонирование в течение 6 часов при 5⁰С двухнедельных проростков стимулирует фосфорилирование белка с молекулярной массой 60 кДа у холодочувствительного сорта риса IR 36. У холодоустойчивого сорта риса Kitaibuki этот белок исходно фосфорилирован. При исследовании ряда других сортов риса холодочувствительные сорта показывали сходное фосфорилирование по контрасту с холодоустойчивыми сортами риса (Komatsu, Kato, 1997).

Фосфорилирование белков является основным механизмом в регулировании функций белков хлоропластов. В субъединицах фотосистемы II тилакоидов хлоропластов, включая основную антенну светособирающего комплекса II и различные компоненты комплекса сердцевины, происходит обратимое фосфорилирование в зависимости от редокс-состояния электронных носителей. Недавно описан ранее неизвестный обратимый случай фосфорилирования для субъединиц CP29, который ведет к конформационным изменениям и защите от холодового стресса. В этом исследовании было идентифицировано место фосфорилирования на N-терминальном конце экспонированного в строму домена. Было показано, что оно располагается в последовательности, не гомологичной другим участникам семейства Lhc. В хлоропластных мембранах данная фосфорилируемая последовательность уникальна, поскольку она удовлетворяет требованиям для киназы СК2 (казеин киназы II) (Testi et al., 1996) .

Исследование низкотемпературного ответа фосфопротеинов в изолированных ядрах было проведено W. Kawczynski и R. Dhindsa для выяснения вопроса, действуют ли низкие температуры, как термодинамический фактор, независимо в разных частях клетки. Изолированные ядра люцерны (*Medicago sativa*) отвечали на холод быстрыми обратимыми изменениями в уровне фосфорилирования белков. Популяция таких регулируемых холодом фосфопротеинов и стимуляция холодом их фосфорилирования была больше у холодоустойчивого сорта Arisa, чем у холодочувствительного сорта Trek. После четырехдневной холодной обработки проростков было обнаружено значительное дополнительное стимулированное холодом фосфорилирование белков в ядрах сорта Arisa, в то время как у сорта Trek происходили лишь незначительные изменения. Более того, ядра из обработанных холодом проростков сорта Arisa обнаруживали и высокий уровень накопления термостабильных белков (Kawczynski, Dhindsa, 1996). Эти результаты подтверждают ту точку зрения, что реакция на низкие температуры и акклиматизация происходят во всех живых частях клетки и накопление термостабильных ядерных белков может быть связано с морозоустойчивостью.

4 СИНТЕЗ БЕЛКОВ ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Основные методические подходы, применяемые при изучении отдельных стадий синтеза белка и регуляции этого процесса под действием меняющейся температуры, связаны с использованием радиоактивно меченых аминокислот, электрофореза, автордиографии и применения ингибиторов белкового синтеза.

4.1 Изучение синтеза белков при помощи радиоактивной метки

При изучении включения ^{14}C -глицина и ^{35}S -метионина у скерды волокнистой и гаглопаппуса, меченых в течение 20-24 часов при 0.5°C , наблюдали интенсивное включение радиоактивной метки, мало отличающееся от включения при 20°C (Гриф, 1966). Эти результаты позволяют сделать предположение о том, что при снижении температуры почти до 0°C синтез белка сохраняется, хотя при таких низких температурах митоз у растений полностью остановлен. Автором сделано

закключение о том, что при низких температурах синтез белков тормозится в меньшей степени, чем синтез нуклеиновых кислот (Гриф, 1966). Другими же авторами, наоборот, отмечается высокая термостабильность процесса транскрипции, а наиболее чувствительным к действию температуры процессом считается инициация трансляции (Bernstam, 1978).

Резкое охлаждение растений озимой пшеницы приводит к сильному ингибированию белкового синтеза, который, тем не менее, сохраняется. Было показано, что даже после действия слабой отрицательной температуры (-3°C) включение ^{14}C - гидролизата белка в белки узлов кущения озимой пшеницы сорта Мироновская 808 составляло около 10% от включения метки при 18°C . В тех же условиях метка не включалась в белки пшеницы сорта Армавени, то есть проявляются генотипические особенности синтеза белков у озимой пшеницы при гипотермии. При -5°C включение метки прекращалось у обоих сортов (Колоша и др., 1978).

При изучении влияния холодового шока (-4°C , 1 час) на синтез белков в побегах высокоморозостойкого сорта озимой ржи сорта Удинская был зарегистрирован высокий уровень (30% от контрольного) включения ^{14}C -лейцина в белки (Войников, Бурбанова, 1981). Однако на основании только этих данных нельзя сделать вывод о синтезе белка *de novo* при гипотермии. Более важными с этой точки зрения являются результаты, полученные при помощи электрофоретических методов разделения белка.

4.2 Изучение синтеза белков при помощи ингибиторов белкового синтеза

Индукцируемые гипотермией изменения в белковом спектре могут быть следствием либо трансформации белковой молекулы, либо синтеза белка *de novo*. Опыты с применением циклогексимида позволяют склониться при решении данного вопроса в пользу второго предположения. Циклогексимид при введении в клетку блокирует трансляцию белков в цитоплазме на 80S рибосомах (Galling, 1982).

В целом ряде других работ показано, что блокирование синтеза белка циклогексимидом в растениях озимых злаков во время холодового закаливания тормозит развитие морозоустойчивости и она остается на уровне незакаленного растения (Трунова, Зверева, 1977; Титов и др., 1992). Исследование действия ингибиторов белкового синтеза (циклогексимида и

хлорамфеникола) показало отсутствие их влияния на накопление сахаров при закаливании пшеницы и позволило авторам сделать вывод, что эти ингибиторы снижали морозоустойчивость не через блокировку процесса накопления сахаров, а за счет торможения белкового синтеза. Поскольку ингибирование циклогексимидом синтеза белка на 80S рибосомах тормозило развитие морозоустойчивости в гораздо большей степени, чем блокирование синтеза на 70S рибосомах хлорамфениколом (Трунова, Зверева, 1977), то было сделано заключение, что в адаптационные перестройки при закаливании к холоду вовлечен, главным образом, цитоплазматический аппарат белкового синтеза (Weidner, Combrink, 1979).

В то же время имеются сведения о том, что эффект воздействия хлорамфеникола на закалывание растений к холоду в значительной степени зависит от уровня освещения. Если на свету в пластидах хлорамфеникол в значительной степени подавлял развитие закаленного состояния у растений, то в темноте этот эффект практически полностью отсутствовал. Эти результаты говорят о важной роли белков, синтезирующихся на 70S рибосомах, в процессе закалывания растений к холоду (Титов, Критенко, 1983). Данные об изменении программы экспрессии хлоропластного белка с молекулярной массой 35 кД в результате охлаждения в темноте были получены при изучении реакции томатов на гипотермию (Liu et al., 1994). Хотя эти данные и противоречат приведенным выше результатам, показывающим важность синтеза белка на 80S рибосомах для развития закаленного состояния растений, это противоречие может быть снято, если учесть скоординированность работы белоксинтезирующей системы пластид с работой белоксинтезирующей системы, контролируемой ядерным геномом.

При изучении формирования устойчивости в начальный период закалывания растений при действии ингибиторов белкового синтеза и цитокинина было обнаружено, что циклогексимид и актиномицин D задерживали начало процесса повышения устойчивости растения к холоду, в то время как цитокинин, являющийся стимулятором процесса синтеза белка, ускорял этот процесс (Титов и др., 1992). Обработка листьев пшеницы циклогексимидом перед охлаждением уменьшала накопление определенных белковых фракций (Kasperska-Palasz et al., 1977a). В дальнейшем была установлена локализация этих фракций в цитозоле. Во

фракции, содержащей митохондрии и хлоропласты, полосы белков с R_f 0.47 и 0.51 были настолько слабы, что объяснялись, по-видимому, цитозольным загрязнением. Изучение этих белков выявило их относительно низкую молекулярную массу (32 кДа и 26 кДа), а также то, что они обнаруживают свойства основных белков и не являются нуклеопротеидами или гликопротеидами (Kasperska-Palacz et al., 1977b).

Было также обнаружено, что циклогексимид препятствует накоплению пептидов с молекулярными массами 85, 74, 67 и 24 кДа, происходящему при гипотермии (в сумме эти четыре белка составляют до 10% от суммарного растворимого белка) (Карасев и др., 1993; Новицкая и др., 1995).

Закключение авторов упомянутых выше работ о цитоплазматической локализации синтеза белков пшеницы при гипотермии подтверждается и другими данными, полученными при использовании циклогексимида и хлорамфеникола. Было показано, что хлорамфеникол ингибирует трансляцию на 70S рибосомах в хлоропластах и митохондриях (Войников, Бурбанова, 1981). Имеются данные о том, что, если в присутствии циклогексимида при гипотермии включение ^{14}C -лейцина в белки пшеницы подавляется на 85%, то обработка хлорамфениколом не дает такого эффекта (Weidner, Combrink, 1979).

Эффекты декстрела (0.1, 1.0 и 10.0 мг/л) и хлорхолинхлорида (ССС, 1.0 и 10.0 мг/л) на ранних этапах развития холодоустойчивости у проростков огурца (*Cucumis sativus* L.) были изучены при закаливающих (10 и 8°C) и повреждающих (4°C) температурах. Другие внешние условия в ходе экспериментов сохранялись постоянными. Было показано, что действие ретардантов зависит от длительности предварительной обработки и их концентрации. Декстрел в концентрациях 0.1 и 1.0 мг/л усиливал начальные процессы адаптации в течение первого дня после помещения проростков в температуру 10°C. Этот эффект наблюдался, когда ретардант наносился на листья или корни перед закаливанием. Было продемонстрировано сходство эффекта гетероауксина при аналогичных условиях. При низкой повреждающей температуре (один день при 4°C), когда адаптивная возможность проростков огурца уменьшалась, декстрел противодействовал уменьшению адаптивного потенциала проростков более эффективно, чем СССР (Volkova et al., 1996).

С другой стороны, было показано, что холодовая обработка растений пшеницы приводит к изменению включения меченой аминокислоты в белки хлоропластов (Rochat, Therrien, 1975). Существуют также данные об уменьшении гидрофобности белков пшеницы при гипотермии (Weidner, Neucl, 1979).

Данные о влиянии гипотермии на полисомы растений достаточно противоречивы. С одной стороны, есть сведения о том, что во время закаливания растений к холоду полисомный профиль остается стабильным в отношении мономерных полисом (Leenders et al., 1974; Vigue et al., 1974). С другой стороны, по данным других авторов, одной из причин снижения уровня синтеза белка в клетках растений при гипотермии является именно распад полисом (Петрова, 1984). Третьи авторы отмечали, что, если полисомы из закаленных к холоду проростков озимых злаков при промораживании диссоциировали до моносом, а при оттаивании быстро собирались в полисомы без снижения их активности, то полисомный профиль из незакаленных растений был стабильным и они не восстанавливали свою активность после промораживания (Дунаева и др., 1993 а,б).

4.3 Изучение белкового синтеза в последствии гипотермии

Следует отметить, что, хотя большинство работ в этой области посвящены изучению изменений в белковом синтезе во время гипотермии, имеются сведения и о том, что после действия гипотермии также происходят значительные изменения в синтезе белков, причем оптимальная температура для этого процесса в проростках пшеницы, измерявшаяся по включению ^{14}C -лейцина, зависит от температуры выращивания (Weidner, Ziemens, 1975). Это было показано в экспериментах, в которых выращенные при 20°C растения переносили на четыре дня в измененные температурные условия (от 4°C до 36°C), а затем определяли температурный оптимум белкового синтеза. Как оказалось, у охлаждавшихся растений этот показатель на $7-8^{\circ}\text{C}$ ниже, чем у растений, находившихся в тепле.

Большой интерес представляют данные о воздействии на проростки озимой пшеницы кратковременной повторяющейся гипотермии. Оказалось, что уже после первого цикла действия гипотермии (-2°C , 1 час,

с последующим отрастанием растений при 20⁰С в течение 2 часов) происходит синтез стрессовых белков с молекулярными массами 15, 32, 33, 55 и 150 кДа. После трех циклов такого охлаждения, судя по размерам пятен радиоактивно меченых полипептидов, количество некоторых стрессовых белков (в частности, белка с молекулярной массой 150 кДа) было не ниже, чем после четырехсуточной непрерывной гипотермии (Войников, Корытов, 1993). На основании этих данных авторами был сделан вывод о возможности существования триггерного механизма запуска синтеза стрессовых белков при гипотермии.

Как было показано, гены морозоустойчивости у пшеницы локализованы в хромосомах 7A, 1B, 4D, 5D (Шумская, 1987), а также 6A, 3B, 5B, 5D, 2A, 5A (Roberts, 1986), то есть этот признак имеет мультигенную природу. В то же время было показано, что 70% этого признака локализовано в хромосоме 5A (Poysa, 1984; Sutka, Kovacs, 1985). Поэтому неудивительно то, что в центре внимания исследователей в последнее время оказались конечные продукты экспрессии генов во время холодовой акклиматизации - полипептиды. Основной целью этих исследований является идентификация и изоляция полипептидов, появляющихся во время закаливания к холоду, установление их природной функции. В тоже время следует отметить, что из-за использования различных режимов закаливания и, как следствие этого, достижения растениями различной степени холодоустойчивости нередко расхождения в результатах исследований.

4.4 Изучение синтеза белка *de novo*

Основными методами, позволяющими судить о синтезе белков *de novo*, являются трансляция *in vitro* с изолированных матриц, электрофорез и изоэлектрическая фокусировка в сочетании с радиоизотопными методами. По результатам изучения трансляции *in vitro* изолированных матричных РНК были выявлены три типа реакции ядерных генов на гипотермию: 1) уровень содержания большинства транскриптов оставался неизменным или слегка снижался; 2) уровни содержания матричных РНК, кодирующих хлорофилл *a/b* связывающий белок и ряд других белков, сильно снижались; 3) уровень же матричной РНК гена *Rab 21* повышался при гипотермии (Hahn, Walbot, 1989).

Отмечалось также повышение уровня синтеза матричной РНК белка с молекулярной массой 14 кДа у риса (Koga-Ban et al., 1991) и появление матричных РНК белков с молекулярными массами 52.5, 38, 16.2 кД при яровизации озимой пшеницы (Bin et al., 1992). В то же время уровни содержания хлоропластных мРНК при гипотермии сильно снижались, а активность митохондриальных генов не изменялась (Hahn, Walbot, 1989). Однако некоторыми авторами (Кузнецов и др., 1992) отмечается увеличение содержания транскриптов генов хлоропластных белков при повышении терморезистентности озимой пшеницы, индуцируемой обработкой картолином-2.

При помощи двумерного электрофореза, позволяющего в сочетании с флюорографией достигнуть высокого разрешения в идентификации белков, были получены следующие, весьма интересные данные. Холодовое закаливание этиолированных двухсуточных проростков пшеницы индуцировало накопление высокомолекулярного полипептида с молекулярной массой около 200 кДа (Sarhan, Perras, 1987). Для сравнения были взяты два холодоустойчивых сорта Fredrick и Norstar и менее устойчивый сорт Glenlea. Проростки подвергали длительному закаливанию от 10 до 30 суток, причем повышение содержания полипептида становилось заметным уже на десятые сутки и увеличение пятна на флюорограмме коррелировало со степенью холодоустойчивости сорта. Кроме того, повышалось содержание полипептидов с молекулярными массами 48, 47 и 42 кДа, а уровень содержания полипептидов с молекулярными массами 93, 89, 80, 68 и 63 кДа снижался в ходе закаливания.

Иммунологически родственный белку пшеницы с молекулярной массой 200 кДа белок ячменя с молекулярной массой 75 кДа также накапливался под действием низкой температуры в течение первых семи дней закаливания. Впоследствии его содержание оставалось на высоком уровне. Накопление этого белка происходило быстрее у более морозоустойчивых сортов (Crosatti et al., 1994).

Накопление высокомолекулярных белков в ответ на холодовое закаливание было отмечено и другими авторами (Abromeit et al., 1992), причем у холодоустойчивого сорта Roughrider накопление семи белков с

молекулярными массами 150 - 176 кДа было более выражено, чем у неустойчивого к холоду сорта Carappelle. Белки на электрофореграммах выявлялись уже после 48 часов закаливания.

После адаптации растений озимой пшеницы к низкотемпературному стрессу было отмечено накопление полипептидов с молекулярными массами 26-30 и 77-80 кДа (Петрова, 1992) и полипептидов с молекулярными массами 24 и 85 кДа (Карасев и др., 1991).

М. Perras и F. Sarhan изучали органоспецифичность белков холодого закаливания, а также сделали попытку определить, какие белки, синтезирующиеся при закаливании растений к холоду, относятся к стрессовым белкам, а какие являются белками роста и развития. Семидневные проростки пшеницы закаливали 10 и 40 суток, что соответствовало по физиологическому возрасту 9 и 14 суточным «контрольным» растениям. В закаленных растениях индуцировался синтез по меньшей мере восьми белков. Полипептид с молекулярной массой 200 кДа (pI 6.5) синтезировался в листьях, корнях и верхушках стеблей. В листьях была выявлена индукция синтеза двух белков (36 кДа с pI 5.55 и 5.7), в верхушках стеблей - трех: 150 кДа (pI 5.3), 45 кДа (pI 5.75), 44а кД (pI 6.8) и в корнях - двух: 64 кДа (pI 6.2) и 52 кДа (pI 5.55). Во время закаливания синтез значительного числа белков замедлялся или ускорялся. Для сравнения были взяты три различающихся по холодоустойчивости сорта пшеницы. Было установлено, что скорость синтеза ряда белков коррелирует с холодоустойчивостью сорта. С одной стороны, индукция синтеза белка с молекулярной массой 200 кДа, а также увеличение скорости синтеза полипептида с молекулярной массой 75 кДа во всех тканях указывает на то, что генетическая регуляция, связанная с повышением морозоустойчивости, происходит на уровне целого растения. С другой стороны, поскольку в природных условиях надземные части растения закаливаются при более низких температурах и развивают более высокую холодоустойчивость, чем корень, индукция в тканях листьев, верхушках стеблей и корнях различающихся стрессовых белков указывает на то, что регуляция некоторых генов морозоустойчивости является органоспецифичной. Было установлено, что процессы закаливания не связаны со стадией развития растения, поскольку одинаково закаливаются

как этиолированные проростки, так и зеленые растения (Perras, Sarhan, 1989).

Раннее начало синтеза специфических белков при холодовом шоке было зафиксировано у двух сортов ячменя. Все белки, синтез которых индуцируется гипотермией, были разделены на четыре группы: 1) белок с молекулярной массой 75 кДа, появляющийся спустя 6 часов закаливания при 5⁰С; 2) белки, синтезирующиеся через 24 часа при температуре 1⁰С; 3) белки, присутствующие в «контроле», содержание которых при гипотермии возрастает в несколько раз; 4) белки, содержание которых не изменяется (Cattivelli, Bartels, 1989).

При исследовании динамики синтеза стрессовых белков в проростках озимой пшеницы при закаливании к холоду (Войников, Коротков, 1991) были выявлены следующие группы белков: 1) белки, появляющиеся уже в течение первых суток закаливания при +3⁰С: 150 кДа (pI 6.1), 55 кДа (pI 6.3), 32 кДа (pI 6.3), 30 кДа (pI 4.6), 18 и 20 кДа (pI 3.2) и 15 кДа (pI 5.3); 2) белки, появляющиеся в течение 2-3 суток закаливания: 14-20 кДа (pI 3.2-5.3), 27-32 кДа (pI 4.6-9.4), 34-55 кДа (pI 7.9-9.5). В то же время было отмечено прекращение синтеза ряда белков на четвертые сутки гипотермии (28 кДа (pI 7.8), 29 кДа (pI 9.4), 36 кДа (pI 8.3), 48 кДа (pI 8.3) и 54 кДа (pI 7.9)) и на седьмые сутки (34 кДа (pI 9.5) и 40 кДа (pI 9.2)). Однако, начиная с четвертых суток закаливания, появлялись белки 41 кДа (pI 8.4), 49 кДа (pI 8.6) и 60 кДа (pI 8.8), синтез которых прекращался к 7-11 суткам закаливания. На основании полученных данных, авторами делается вывод о подразделении этих белков на две большие группы – «стрессовые» белки (с высоким уровнем индукции синтеза), которые синтезируются в первые 2-3 суток гипотермии и исчезают к 7-11 суткам и «белки адаптации» (с низким уровнем индукции синтеза), которые синтезируются при более длительной гипотермии (одиннадцать суток и далее).

Приведенные выше результаты позволяют сделать некоторые заключения. Во-первых, гипотермия вызывает сильное замедление (вплоть до прекращения) синтеза большинства белков, причем, по-видимому, на этот процесс влияют как нарушения в белоксинтезирующем аппарате, так и регуляция активности генома. Во-вторых, действие гипотермии приводит к синтезу *de novo* (в основном, по-видимому, на 80S рибосомах)

ряда новых белков, что связано с усилением транскрипции соответствующих генов.

5 ВЕРОЯТНЫЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ, СИНТЕЗИРУЮЩИХСЯ ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Несмотря на большое количество рассмотренных выше работ, показывающих вероятную связь закаливания растений к холоду с синтезом белков (Браун, 1983; Карасев и др., 1993; Касперска-Палач, 1983; Graham, Patterson, 1982), в настоящее время много неясного в биохимических механизмах реализации этой связи. Имеется относительно мало данных о природе и функциях белков, синтез которых стимулируется гипотермией. В большинстве работ показана только корреляция процесса закаливания к холоду с синтезом белка. В то же время эта корреляция позволяет предполагать важную роль белков в формировании закаленного состояния растения (Хатано, 1983; Касперска-Палач, 1983). Предполагается, что одним из неперенных факторов, требующихся для индукции морозоустойчивости озимой ржи, является усиленное образование протоплазмы и клеточных мембран (Siminovitch, Clounter, 1982).

В ряде работ показано влияние генов, локализованных в определенных хромосомах ядра, на активность митохондрий при гипотермии (Усова, Федотова, 1979; Войников, 1989). Было установлено, что охлаждение морозоустойчивых растений озимых злаков вызывает значительные изменения в интенсивности работы дыхательной цепи митохондрий и в степени сопряженности процессов окисления и фосфорилирования (Войников, 1978). Впоследствии был показан ядерный контроль за проявлением этого признака, поскольку введение в малохолодоустойчивый генотип озимой пшеницы хромосом из X-генома высокоморозоустойчивого пырея сопровождалось реакцией митохондрий на охлаждение, типичной для высокоморозостойких форм, то есть быстрым переходом митохондрий в низкоэнергетическое состояние. Замена же хромосом X-генома пырея на хромосомы пырейного D-генома в клетках пшенично-пырейного гибрида замедляла эту реакцию митохондрий на охлаждение (Войников, 1978; Усова, Федотова, 1979). Исследования, проведенные на митохондриях 43 хромосомных (42 хромосомы пшеницы + 1 хромосома генома X пырея) линий показали, что

гены, контролирующие данный признак митохондрий, локализованы, вероятно, в двух хромосомах X-генома. Изучение линий с межсортовым замещением хромосом, при котором все пары хромосом D-генома, а также некоторые хромосомы A- и B-геномов озимой пшеницы Безостая 1 были замещены на соответствующие пары хромосом высокоморозоустойчивой пшеницы сорта Альбидум 114, показало, что только две хромосомы (1D и 6D) генома пшеницы Альбидум 114 контролируют энергетическую активность митохондрий при гипотермии (Войников, 1987). Таким образом, поскольку, как показано выше, блокировка цитоплазматического синтеза белка не позволяет перейти митохондриям при гипотермии в низкоэнергетическое состояние, можно выдвинуть предположение, что ядро посредством изменения синтеза белков участвует в регуляции митохондриальной активности при гипотермии (Войников, 1987).

5.1 Дегидрины и ABA -регулируемые белки

В последнее время большой интерес исследователей привлекает изучение изменений в синтезе дегидринов (DHN) под действием холодовой акклиматизации. Изменение транскрипции генов белков LEA (Late Embryogenesis Abundant), RAB (responsive to ABA) и DHN было первоначально отмечено при действии водного стресса и после обработки растений абсцизовой кислотой. Все эти группы белков характеризуются высокой гидрофильностью белковой молекулы. Во время обезвоживания клетки под действием водного стресса эти белки за счет своей высокой гидрофильности препятствуют потере клеткой воды и стабилизируют клеточные белки (Skriver, Mundy, 1990). Впоследствии было обнаружено, что синтез этих белков усиливается и во время холодовой акклиматизации. Дегидрины при этом, по-видимому, препятствуют образованию льда в клетках и также стабилизируют клеточные белки (Guy et al., 1992a).

Среди белков, накапливающихся в растениях в ответ на обезвоживающее воздействие или действие низких температур, наиболее интенсивно исследуются дегидрины семейства LEA D II. Дегидрины состоят из различных типичных для белков данного вида доменов, соединяющихся в несколько наиболее распространенных вариантов полипептидов, а также многочисленных редко встречающихся вариаций. Эти домены включают в себя один или более небольших регионов альфа-

спиралей амфипатичных остатков, остатки серина (место фосфорилирования) и N-терминальную последовательность. До сих пор неизвестны все биохимические функции дегидринов, но значительное число исследований, посвященных выяснению локализации дегидринов в клетке при помощи клеточного фракционирования и иммулокализации, установили, что дегидрины могут локализоваться и в ядре, и в цитоплазме. Более того, полученные данные показывают, что этот класс белков ассоциируется с макромолекулами нуклеопротеинового комплекса в ядре и с мембранами цитоплазмы. В настоящий момент считают, что дегидрины являются факторами, предотвращающими коагуляцию ряда макромолекул, сохраняя их структурное единство во время стрессового воздействия (Close, 1997).

При исследовании отвечающих на охлаждение дегидринов ежевики (Aroga et al., 1997) было установлено, что обработка низкими закаливающими температурами (15/12 °C в течение двух недель) вызывает холодовую акклиматизацию растений, а также накопление трех дегидриноподобных белков с молекулярными массами 65, 60 и 14 кДа. Денситометрия гелей показала тесную взаимосвязь между содержанием дегидринов и степенью холодной закалки всех трех исследованных сортов ежевики. Авторы делают вывод, что изменения в экспрессии дегидринов более тесно связаны с холодовым закаливанием, чем с состоянием покоя растения.

Улучшенное восстановление замороженных меристем и каллусов смородины (*Ribes aureum* Pursh и *R. Ciliatum* Humb. & Bonpl.) было получено после 2 часов предварительной обработки в сахарозе, пролине, RAB - белках (RAB P), или бычьим сывороточным альбумине (БСА). Двухчасовое погружение в 0.4 М RIB-SM до промораживания существенно улучшило отрастание меристемы по сравнению с 0, 1, 3 и 4 часовым погружением. Двухчасовое погружение меристем в 5 и 10% пролин, растворенный в 0.4 М RIB-SM, значительно улучшило отрастание после промораживания. Первичный тест с экстрактами сырого RAB P из семян пшеницы показал, что отрастание замороженных апикальных меристем смородины улучшается после 2 часов предварительной обработки погружением с максимумом выживания в 1% RAB P. RAB P препараты, содержащие эквивалентные белки (1% сырой или 0.2%

диализованный RAB P), имели аналогичное действие на отрастание, что указывает на то, что эффект зависел от присутствия белков, а не сахаров и других углеводов в сырых экстрактах RAB P. Аналогичные результаты показывают меристемы и каллусы, предварительно обработанные 5 или 10% пролином, 1% раствором RAB P или 1% БСА в 0.4 М растворе сахарозы. Предварительно обработанные меристемы продолжили прирост через 3 дня после согревания и достигли максимума отрастания через 1 неделю, по сравнению с 2 неделями для предварительно необработанного контроля (Luo, Reed, 1997).

При исследовании действия короткого дня на *Betula pubescens* было установлено, что в дополнении к различным конститутивно синтезируемым дегидринам на коротком дне обнаруживались два специфических полипептида с молекулярными массами 34 и 36 кДа (Welling et al., 1997).

Из библиотеки кДНК, полученной из корней всходов проростков *Triticum durum*, подвергнутых водному стрессу, были охарактеризованы четыре клона дегидринов. Два из них, ptd27e и ptd16, кодируют белки с классическими характеристиками дегидринов, т.е. консенсусным мотивом KIKEKLPG, который присутствует за пределами последовательности сериновых остатков у карбоксильного конца. Белки, кодируемые Tddhn15 и Tddhn16, имеют сходство с последовательностями белков *Triticum aestivum*. Клоны ptd25a и ptd38 кодируют дегидрины, которые не имеют последовательности сериновых остатков и обладают сходством последовательности с Cor- белками *T. aestivum*. Чтобы скоррелировать устойчивость *T. durum* к засухе с экспрессией генов дегидринов, для четырех сортов было проведено сравнение накопления транскриптов дегидринов в корнях и побегах всходов в ответ на водный стресс и экзогенную абсцизовую кислоту. Исследование действия водного стресса во времени показало, что накопление транскриптов дегидринов запаздывает в засухоустойчивых сортах. При этом уровень аккумулялированных транскриптов был более высоким в засухоустойчивых, чем в засухочувствительных сортах. Аналогичные результаты были отмечены после обработки экзогенной абсцизовой кислотой (Labhilili et al., 1995).

Роль такого гормона, как абсцизовая кислота (АВА) в устойчивости растений к низким температурам изучалась у *Arabidopsis* путем использования мутантов, у которых был изменен либо биосинтез, либо режим действия данного гормона. Различные мутанты использовались для анализа роли АВА в развитии и прорастании семени и устойчивости к стрессу. Мутанты были выделены преимущественно по измененным характеристикам прорастания и роста проростков. Ген зеаксантинооксидазы, кодируемый геном *aba1*, клонировался по гомологии с геном *Nicotiana plumbaginifolia*, заблокированным на той же биосинтетической ступени. При этом были выявлены биохимические повреждения мутантов *aba1*, *aba2* и *aba3*. АВА-нечувствительные мутанты (*abi1* и *abi2*) также имеют фенотип, на который влияют различные АВА-зависимые процессы и, таким образом, позволяют предполагать, что они либо кодируют ранние ступени в передаче сигнала АВА, либо они влияют на специфические ступени (такие, как *abi3*, *abi4*, *abi5*). Гены *abi1* и *abi2* кодируют фермент протеинфосфатазу 2с и ген *abi3* кодирует фактор транскрипции со специфической экспрессией в семенах. Гиперчувствительный к абсцизовой кислоте мутант *era1* имеет нарушение в фарнезилтрансферазе (Koornneef et al., 1998).

В два раза было улучшено восстановление криоконсервированных *in vitro* концов побегов березы повислой (*Betula pendula* Roth) при помощи включения абсцизовой кислоты в культуральную среду во время холодового закаливания материнских побегов. Уровень восстановления концов побегов после холодового закаливания в течение 28 дней при +5 °С в 8/16 (свет/темнота) часовом фотопериоде на среде, содержащей 10^{-4} М абсцизовой кислоты был более 40%. Абсцизовая кислота была эффективной только в сочетании с низкой температурой и короткой длиной дня, хотя в ходе экспериментов и были отмечены большие генотипические различия. Абсцизовая кислота имела два различных варианта влияния: усиление холодовой закаленности и усиление формирования каллуса во время регенерации криоконсервированных концов побегов (Ruynanen, 1998).

5.2 Белки, препятствующие льдообразованию (антифризные белки)

Одной из функций белков, синтезирующихся в растениях при гипотермии, в частности, при действии отрицательных температур, является препятствование процессу льдообразования. Хотя, как было отмечено выше, в основном снижение температуры начала льдообразования происходит за счет накопления в растительной клетке сахаров в результате усиления синтеза и повышения активности соответствующих ферментов, в растительных клетках при гипотермии происходит также и синтез специфических белков, непосредственно влияющих на температуру начала льдообразования и рост ледяных кристаллов.

Способность контролировать внеклеточное образование льда во время замораживания является критической для выживаемости толерантных к замораживанию растений. Антифризные белки, которые являются белками, способными тормозить рост кристаллов льда, недавно были отождествлены как самые распространенные апопластные белки в листьях акклиматизированной к холоду озимой ржи (*Secale cereale* L.). Сравнения аминокислотных последовательностей, иммуно-перекрестной реактивности и ферментативной активности показали, что эти антифризные белки сходны с членами трех классов белков, относящихся к патогенезу, а именно, с эндохитиназами, эндо-бета-1,3-глюканазами и тауматин-подобными белками. Апопластные эндохитиназы и эндо-бета-1,3-глюканазы сильно индуцируются патогенами в чувствительном к замораживанию табаке и не обладают антифризной активностью. Полученные данные позволяют предлагать, что в патогенез-связанных белках могли развиваться тонкие структурные различия, которые позволили этим белкам получить возможность связываться со льдом (Non et al., 1995).

В листьях озимой ржи наблюдался синтез белка, продуцируемого эндогенно и выделяющегося в вакуоли и межклеточное пространство, который значительно изменял картину роста ледяных кристаллов и понижал температуру замерзания раствора (Griffith et al., 1992). В дальнейшем этими же авторами из апопласта листьев озимой ржи были выделены шесть антифризных белков, обладающих способностью абсорбироваться на поверхности льда и подавлять рост кристаллов. Антифризные белки ржи накапливались во время холодной

акклиматизации и сходны с растительными белками, связанными с патогенезом, включая два эндоглюканазоподобных, два хитиназоподобных и два тауматинподобных белка. Иммунолокализация эндоглюканазоподобных белков показала, что они накапливаются на межклеточной поверхности клеточных стенок мезофилла, в опектиненных районах, во вторичных клеточных стенках ксилемных сосудов и в эпидермальных клеточных стенках. Поскольку антифризные белки ржи локализованы в местах, где возможен их контакт со льдом, они могут выполнять функцию барьера на пути распространения льда или подавлять рекристаллизацию льда. Антифризные белки, сходные с патогенез-связанными белками, были также обнаружены в других видах трибы *Triticae*, но не у морозоустойчивых двудольных растений. Было установлено, что у озимой пшеницы накопление антифризных белков и развитие холодоустойчивости регулируются пятой хромосомой (Griffith et al., 1997).

Синтез значительного количества апопластных белков с молекулярными массами от 15 до 109 кДа наблюдался в процессе повышения морозоустойчивости озимой ржи (Griffith et al., 1993). Для определения того, является ли накопление этих антифризных белков общим явлением для травянистых растений, были исследованы антифризная активность и общее содержание белка в экстракте апопласта листьев ряда видов растений, растущих при низких температурах, включая как однодольные (озимая и яровая пшеница, озимый ячмень, яровой овес, кукуруза), так и двудольные (шпинат, озимый и яровой рапс, капуста, табак). Белки апопласта разделялись SDS-ПААГ электрофорезом и с помощью иммуноблоттинга определялось, действительно ли растения отвечают на низкие температуры накоплением белков, связанных с патогенезом. Полученные результаты показывают, что значительный уровень антифризной активности присутствовал только в апопласте морозоустойчивых однодольных растений после холодовой акклиматизации при 5/2 °C. Более того, во время холодовой акклиматизации только тесно связанная группа растений - рожь, пшеница и ячмень - накапливали антифризные белки, сходные со связанными с патогенезом белками. При этом накопление антифризных белков является специфическим ответом, который может быть скорее важен в

холодоустойчивости некоторых видов растений, чем как общий ответ всех растений на низкотемпературный стресс (Antikainen, Griffith, 1997).

Два антифризных белка ржи с молекулярными массами 32 и 35 кДа аналогичны в их аминокислотных последовательностях и эпитопах бета-1,3-эндоглюканазе. Локализация этих антифризных белков, которые были обозначены как глюканазо-подобные белки (GLP), была установлена с использованием иммунной сыворотки, полученной против антифризного белка 32 кДа. Иммуноэлектронная микроскопия высокого разрешения листьев акклиматизированных к холоду растений выявила высокое содержание GLP в стенках клеток мезофилла, в стенках клеток, смежных с межклеточными пространствами, и во второстепенных сосудах ксилемы. Учитывая отсутствие GLP в вакуолях, эти результаты подтверждают накопление апопластных антифризных белков в акклиматизированных к холоду растениях озимой ржи. В пределах клетки GLP локализовались в цистернах шероховатого эндоплазматического ретикулума, аппарате Гольджи и плазматической мембране, что указывает на то, что GLP выделяются через экзоцитозный путь. Наличие высокого содержания GLP в листьях акклиматизированных к холоду растений, их низкое содержание в листьях неакклиматизированных растений и недостаток GLP в корнях позволяют считать, что имеется корреляция между возрастающим накоплением GLP и повышением морозоустойчивости этих растений. Кроме того, локализация GLP в непосредственной близости к магистральям для свободной воды в пределах тканей подтверждает, что эти белки играют важную роль в кристаллизации и/или рекристаллизации воды при ее замораживании (Pihakaskimaunsbach et al., 1996).

Антифризные белки обладают способностью тормозить образование льда. Для того, чтобы объяснять их роль в данном процессе, были проведены определение их концентрации и иммунолокализация этих белков в листьях, побегах и корнях озимой ржи. Каждый из общих растворимых белков, экстрагированных из акклиматизированных к холоду ржаных листьев, стеблей и корней, обладал антифризной активностью, в то время как отсутствие антифризной активности наблюдалась в экстрактах из неакклиматизированных растений ржи. Антитела, полученные против трех апопластных антифризных белков из ржи, соответствующих глюканазоподобному белку (GLP, 32 кДа), хитиназоподобному белку

(CLP, 35 кДа) и тауматиноподобному белку (TLP, 25 кДа), были использованы для обработки тканевых отпечатков. При этом было показано, что антифризные белки локализуются в эпидермисе и в клетках, окружающих межклеточные пространства, у акклиматизированных к холоду растений. Хотя GLP, CLP и TLP присутствовали в неакклиматизированных растениях, они обнаруживались в других местах и не обладали антифризной активностью, что подтверждает, что при низкой температуре производятся другие изоформы связанных с патогенезом белков. Локализация антифризных белков у ржи может предотвращать вторичное повреждение клеток эпифизическим льдом или льдом, распространяющимся через ксилему. Распространение белков, связанных с патогенезом, и белков GLP, CLP, и TLP, накапливающихся под действием холода, аналогично и может отражать общие пути, которыми как патогены, так и лед входят и распространяются по тканям растения (Antikainen et al., 1996).

Синтетический ген антифризного белка экспрессировался в растениях и, как показали результаты экспериментов, снижал утечку электролита из листьев при температуре замерзания почвы. Синтетический антифризный белок экспрессировался в качестве слитого с сигнальным пептидом, направляющим его к межклеточному пространству, где вначале проявляется кристаллизация льда. Ген был введен в *Solanum tuberosum* L. Cv. Russet Burbank при помощи *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Трансформанты идентифицировались при помощи PCR - скрининга и экспрессия введенного белка проверялась иммуноблоттингом. Анализ высвобождения электролитов из листьев трансгенных растений выявил корреляцию между уровнем экспрессии трансгенного белка и степенью выносливости к замерзанию почвы (Wallis et al., 1997).

Применение методик, основанных на изучении рекристаллизации льда, позволило в последнее время установить в ряде видов растений наличие белков, обладающих антифризной активностью. В частности в корне акклиматизированной к холоду моркови (*Daucus carota* L.) был выделен и идентифицирован новый индуцируемый холодом антифризный белок с молекулярной массой 36 кДа (Smallwood et al., 1999). В ходе изучения его свойств было установлено, что этот белок подавляет рекристаллизацию льда и обладает термостерезисной активностью.

Показано, что этот полипептид существует в растворе в виде N-гликозилированного мономера. Белок, так же как и остальные известные антифризные белки, локализован в апопласте. Соответствующий этому белку ген, как показали результаты исследований, является уникальным и индуцируется холодом.

5.3 Регулируемые холодом белки (COR- белки)

Во время холодовой акклиматизации *Arabidopsis thaliana* синтезируются различные регулируемые холодом (COR) полипептиды, которые не имеют или имеют очень небольшое сходство с другими известными белками. Регулируемые холодом гены *cor15a* и *cor6.6* кодируют, соответственно, 15 и 6.6 кДа полипептиды. Известно, что полипептид COR15a транспортируется в хлоропласты и во время импорта процессируется в 9.4 кДа полипептид, обозначенный как COR15am. Полипептид COR6.6, как считается, локализуется в цитозоле. Кодированные последовательности *cor15am* и *cor6.6* были перенесены под промотор фага T7 и экспрессированы в *E. coli*. Рекомбинантные полипептиды COR15am(r) и COR6.6(r) были очищены до почти гомогенного состояния с использованием комбинации фракционирования сульфатом аммония, ионообменной хроматографии и адсорбционной хроматографии на гидроксиапатите. COR15am(r) и большинство образцов COR15am совместно мигрировали как на двумерном электрофорезе по O'Farrell, так и на неденатурирующем электрофорезе. Эти данные подтверждают место процессинга COR15a и показывают отсутствие различий в четвертичной структуре между COR15am(r) и большинством видов COR15am в растениях. Напротив, миграция пятен COR6.6(r) и COR6.6 на двумерных гелях показывает, что значительная часть популяции COR6.6 в растениях модифицируется (Gilmor et al., 1996). При дальнейшем исследовании этих двух белков были определены их гидратационные характеристики и их действие на переходы смеси фосфолипидов из жидкокристаллического в гелеобразное состояние и из ламеллярной фазы в гексагональную II фазу. После обезвоживания при осмотическом давлении от 8 до 150 МПа содержание воды в COR- полипептидах было меньше, чем в БСА, причем COR15am был гидратирован меньше, чем COR6.6. Ни COR6.6, ни COR15am не изменяли температуру вызванного дегидратацией перехода

как дипальмитоилфосфатидилхолина, так и диолеилфосфатидилхолина (DOPC) из гелеобразного в жидкокристаллическое состояние. В мультиламеллярных везикулах, состоящих из смеси дипальмитоилфосфатидилхолин:(DOPC) (1:1, моль: моль), ни COR15ам, ни COR6.6, ни БСА не влияли на вызванное обезвоживанием образование инвертированной гексагональной фазы как на функцию осмотического давления. Тем не менее, в смеси дипальмитоилфосфатидилхолин:(DOPC), дегидратировавшейся в присутствии COR15ам, наблюдалось специфическое ультраструктурное изменение - образование определенной поверхностной морфологии в ламеллярных доменах. Тем не менее, ни COR15ам, ни COR6.6, по-видимому, не участвуют в специфическом белково - фосфолипидном взаимодействии, изменяющим вызванное дегидратацией состояние фаз фосфолипидных везикул (Webb et al., 1996). Было проверено, действуют ли COR15ам и COR6.6 на индуцируемое холодом слияние или целостность мембран небольших униламеллярных везикул, состоящих как из различных видов фосфатидилхолина, так и из смеси диолеилфосфатидилхолина, диолеилфосфатидилэтаноламина и свободных стеролов (1:1:1, моль:моль), а также на общий липидный экстракт плазматических мембран как неакклиматизированных, так и акклиматизированных к холоду листьев риса. Когда везикулы были суспендированы в буферном растворе, как COR15ам, так и COR6.6 значительно уменьшали вызванное замораживанием слияние вне зависимости от их липидного состава. В то же время, когда везикулы были суспендированы в сахарозе или в среде, содержащей NaCl, COR-белки не оказывали влияние на индуцируемое холодом слияние. Более того, COR-белки не оказывали влияние на уменьшение вызванных холодом утечек, были ли везикулы суспендированы в чистом буфере либо в буфере с добавками NaCl или сахарозы. Фактически, действие COR-белков на везикулы, составленные из отдельных видов фосфатидилхолина, суспендированных в буфере, выражалось в аномальном увеличении вызванных замораживанием утечек. Таким образом, было установлено, что ни COR15ам, ни COR6.6 не имеют прямого криопротекторного действия на везикулы, замороженные *in vitro* (Uemura et al., 1996).

Многие растения, в том числе *Arabidopsis*, увеличивают устойчивость к замораживанию после воздействия низких незамораживающих

температур. Данный ответ, называемый холодовой акклиматизацией, опосредован ДНК-регулирующим элементом «С-повтор/засухо-отзывчивый элемент» (CRT/DRE) и связан с индукцией генов COR (регулируемые холодом гены). Усиление экспрессии у *Arabidopsis* CBF1, транскрипционного активатора, связывающегося с последовательностью CRT/DRE, индуцировало экспрессию генов COR и увеличивало устойчивость к замораживанию неакклиматизированных растений *Arabidopsis*. На основании этих данных был сделан вывод, что CBF1 представляет собой вероятный регулятор холодовой акклиматизации, контролирующей уровень экспрессии генов COR, и содействует повышению устойчивости к промораживанию (Jaglo-Ottosen et al., 1998).

5.4 Молекулярные шапероны

Другой возможной функцией белков, синтезирующихся в ответ на гипотермию и закаливание растений к холоду, является шапероновая активность. Первоначально шапероны были открыты как класс белков, участвующих в процессе формирования трехмерной структуры других полипептидов, но не являющихся компонентами конечной функциональной структуры этих полипептидов (Gatenby, Viitanen, 1994). Впоследствии было обнаружено, что шапероны с молекулярными массами 60, 70 и 90 кДа являются стрессовыми белками, синтезирующимися под действием высокотемпературного стресса, так называемыми «белками теплового шока» (БТШ). Было установлено, что во время действия теплового шока шапероны восстанавливают исходную укладку денатурировавших под действием теплового шока белков и таким образом, восстанавливая исходную трехмерную структуру ферментов и структурных белков, способствуют выживанию клетки в условиях высокотемпературного стресса. Таким образом, в настоящее время шаперон определяется как белок, который формирует и стабилизирует в ином случае нестабильную конформацию другого белка и путем его контролируемой трехмерной укладки и освобождения субстратного белка содействует правильной его судьбе *in vivo*, то есть укладке, олигомерной сборке и транспорте в определенные субклеточные компартменты или

контролирует переключение между его активной/неактивной конформацией (Hendrick, Hartl, 1993).

Хотя в абсолютном большинстве данные о синтезе и функциональной активности шаперонов относятся к случаю теплового стресса, имеются данные и о том, что некоторые белки, обладающие шапероновой активностью, синтезируются и во время гипотермии и адаптации растений к низким температурам. В частности, было установлено, что под действием холодового шока индуцируется синтез белков с молекулярными массами 70 и 94 кДа (Гималов и др., 1991), которые, возможно, являются аналогами БТШ70 и БТШ90, обладающими шапероновой активностью. Индукция белков со сходными молекулярными массами (74 и 67 кДа) наблюдалась Г.С. Карасевым с соавторами (Карасев и др., 1993) при адаптации растений к морозу. Ими же была установлена индукция синтеза белка с молекулярной массой 24 кДа, что соответствует молекулярной массе димера белка *cpr 10* (Hendrick, Hartl, 1993). Данные, указывающие на то, что белки, обладающие шапероновой активностью, принимают участие в процессе закаливания, были получены при исследовании регуляции синтеза белков *BiP* и БТШ 70 во время холодового закаливания шпината (Anderson et al., 1993). При помощи РНК-блот-анализа было обнаружено, что, хотя матричная РНК *BiP* обнаруживается при «нормальной» температуре, количество мРНК *BiP* увеличивается при холодовой акклиматизации. После прекращения действия гипотермии уровень матричной РНК *BiP* снижался до уровня ее содержания в незакаленных листьях. Этими же авторами был охарактеризован клон ДНК-копии, отвечающий за второй белок семейства БТШ70 - 4L. Матричные РНК, кодирующие белок 4L, не были выявлены при комнатной температуре, но обнаруживались во время холодовой акклиматизации. Эти матричные РНК, кодирующие белок 4L, исчезали после одного дня раззакаливания. Очищенный белок *BiP* при хроматографировании разделялся на три фракции: мономер (90 кДа), димер (220 кДа) и высокомолекулярный агрегат с молекулярной массой более 700 кДа. При анализе всех фракций методом SDS-электрофореза все они давали в спектре одну полосу с молекулярной массой 79 кДа.

Один из молекулярных шаперонов у *E. coli* - триггер-фактор (TF) обладает особыми свойствами: он имеет пропил-изомеразную активность,

ассоциируется с полипептидами рибосом, связывается с GroEL и вызывает дегидратацию определенных полипептидов. Однако в отличие от большинства шаперонов, которые являются белками теплового шока, содержание TF прогрессирующе увеличивается при снижении температуры с 42⁰С до 16⁰С и даже при хранении клеток при 4⁰С, подобно множеству белков холодового шока. Таким образом, имеются все основания предполагать, что TF является одним из холодовых защитных белков. Более того, выдвинуто предположение, что дифференциальная индукция TF при низких температурах и БТШ при высоких позволяет осуществлять селективную защиту клеток от экстремальных температур (Kandror, Goldberg, 1997).

5.5 Многофункциональные белки, принимающие участие в процессах транскрипции и трансляции

Недавно полученные данные показывают, что существенные взаимозависимости могут существовать между транскрипционными и посттранскрипционными процессами. Во-первых, выдвинуты предложения, что специфические промоторы влияют на посттранскрипционную судьбу транскриптов, что указывает на взаимосвязи между белковыми комплексами, собирающимися на ДНК, и образующейся пре-мРНК. Во-вторых, все большее количество белков оказывается многофункциональными, участвующими в транскрипционных и посттранскрипционных событиях. Классический пример этому - TFIIIA, необходимый как для транскрипции генов 5s рРНК ТАК и для упаковки 5s рРНК. TFIIIA теперь присоединяются к семейству Y-box белков, которые связываются с ДНК (с функциями активация и репрессии транскрипции) и РНК (упаковка мРНК). Более того, супрессор опухолей WT1, который, как первоначально считалось, представляет собой типичный фактор транскрипции, может также быть вовлечен в сплайсинг. Напротив, hnRNP К, типичный пре-мРНК-связывающий белок, выступает как фактор транскрипции. В данный момент самая приемлемая та точка зрения, что некоторые белки, которые первоначально идентифицировались в качестве факторов транскрипции, могут точно так же легко идентифицироваться в качестве сплайсинг- факторов, hnRNP, mRNP белками и наоборот. Более нельзя рассматривать экспрессию гена в качестве серии разделенных

процессов. Вместо этого, похоже на то, что многофункциональные белки способны координировать различные стадии экспрессии гена (Ladomery, 1997).

В ходе экспериментов была клонирована и охарактеризована кДНК из *Schistosoma mansoni*, кодирующая основной белок — гомолог человеческого Y-box связывающего белка 1 (YB-1). 1.3-kb транскрипт YB-1 из *S. Mansoni*, который экспрессируется на различных этапах цикла жизни паразита, кодирует белок размером 217 аминокислот, содержащий на своем N-терминальном конце связывающий нуклеиновые кислоты мотив, известный как домен холодового шока (CSD). Этот домен на 64% идентичен домену холодового шока других членов семейства Y-box связывающего белка и на 43% идентичен белку холодового шока CspA из *Escherichia coli*. В *S. mansoni* YB-1, домен холодового шока обладает некоторыми структурными характеристиками, которые позволяют образовываться димеру, как это происходит у белка холодового шока CspB из *Bacillus subtilis*. С-терминальная область YB-1 из *S. Mansoni* отличается от других Y-box связывающих белков из-за присутствия двойных повторений Arg и Gly, предположительно образующих фиброин-подобную структуру бета-сандвича. Это новый тип складывания для С-терминальной области YB-1 из *S. Mansoni*, что позволяет предположить специфическую функцию для этого белка у паразита (Franco et al., 1997).

5.6 Белки, разобщающие окисление и фосфорилирование в митохондриях и вызывающие термогенез во время гипотермии

Среди механизмов защиты растений от низкотемпературного стресса выделяется один механизм, связанный с термогенезом в митохондриях, который, как считалось раньше, присущ только животным организмам. Однако в митохондриях растений были также обнаружены системы, способные диссипировать энергию с образованием тепла.

Исторически первой из этих систем была открыта альтернативная цианидрезистентная оксидаза. Еще в 60-е годы было установлено, что во время цветения ароидных лилий в их цветках происходит активация цианидрезистентного дыхания, сопровождающаяся термогенезом, за счет чего температура цветка способна подняться на несколько градусов (Meeuse, 1975). Лилейные используют этот термогенез для испарения

аттрактантов с целью привлечения насекомых - опылителей (Meeuse, Buggeln, 1969). В ходе исследований было установлено, что этот термогенез обусловлен активацией альтернативной цианидрезистентной оксидазы, которая к настоящему времени обнаружена у всех исследованных видов растений и многих эукариотических водрослей (Siedow, Umbach, 2000). Альтернативная оксидаза обнаружена также у многих, но не у всех грибов (Vanlerberghe, McIntosh, 1997). Первые попытки выделения альтернативной оксидазы позволили идентифицировать ее как хинолоксидазу (Huq, Palmer, 1978; Rich, 1978). Впоследствии D.M. Rhoads и L. McIntosh выделили первый клон кДНК, соответствующий гену альтернативной оксидазы Aox1, используя поликлональные антитела против частично очищенной альтернативной оксидазы, изолированной из *Sauromatum guttatum* (Rhoads, McIntosh, 1992, 1993).

В дальнейшем при изучении структуры и механизмов регуляции альтернативной оксидазы было установлено, что, если у грибов функциональной единицей является мономер, то у растений альтернативная оксидаза функционирует в виде димера (Umbach, Siedow, 1993; Siedow, Umbach, 2000). В ходе изучения путей регуляции активности альтернативной оксидазы было установлено, что *in vivo* активность фермента очень сильно зависит от содержания белка альтернативной оксидазы, а следовательно, и степени экспрессии его гена, а также от концентрации его субстрата – восстановленного убихинона (Siedow, Umbach, 2000). В последние годы большое внимание уделялось изучению механизмов посттрансляционной регуляции активности данного фермента. В частности, было установлено, что в растениях альтернативная оксидаза существует в виде димера, и, когда его субъединицы ковалентно связаны дисульфидным мостом, то фермент практически неактивен (Umbach, Siedow, 1993). Восстановление дисульфидных связей дитиотриетолом резко повышает активность фермента (Umbach, Siedow, 1993). В то же время известно, что в изолированных митохондриях активность альтернативной оксидазы заметно усиливается при добавлении α-кетокислот, особенно пирувата (Day et al., 1994; Millar et al., 1993). Ряд авторов предполагает наличие связи между этими двумя регуляторными механизмами, поскольку установлено, что альтернативная оксидаза не

стимулируется α-кетокислотами при образовании дисульфидных связей между субъединицами (Siedow, Umbach, 2000) (рис. 5).

Таким образом, имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что альтернативная оксидаза является высокорегулируемым ферментом, причем его активация позволяет растению весьма эффективно переключать поток электронов с основной электронтранспортной цепи на диссипирующий энергию альтернативный путь. Данные о термогенезе у Ароидных лилий (Meeuse, 1975; Leach et al., 1996; Considine et al., 2001), участии альтернативной оксидазы в термогенезе во время созревания плодов манго (Kumar et al., 1990) а также о влиянии инфильтрации KCN проростков устойчивых озимых пшениц на их температуру во время низкотемпературного стресса (Войников, Корзун, 1984; Vojnikov et al., 1984) позволили предположить, что альтернативная оксидаза может принимать участие и в генерации тепла в так называемых «нетермогенных» растениях во время низкотемпературного стресса (Vojnikov et al., 1984; Ordentlich et al., 1991; Moynihan et al., 1995). Хотя ряд авторов считает, что это не может приводить к физиологически значимому увеличению теплопродукции (Меденцев и др., 1999), по-видимому, альтернативная оксидаза принимает участие в защите растения от низкотемпературного стресса.

Митохондриальные разобщающие белки (англ. транскрипция – uncoupling proteins, UCP) были открыты при изучении бурого жира млекопитающих. В начале 60-х годов, когда ряд групп исследователей смогли изолировать митохондрии из бурого жира и приступили к изучению их биоэнергетических характеристик, было установлено, что эти митохондрии были способны быстро окислять ряд субстратов, но классический дыхательный контроль в них отсутствовал (Nicholls, Rial, 1999). В то же время было установлено, что добавление пуриновых нуклеотидов, а также удаление эндогенных свободных жирных кислот возвращало эти митохондрии в «сопряженное» состояние. В ходе изучения влияния пуриновых нуклеотидов на дыхательный контроль митохондрий было предположено, что они связываются с определенным белком, который и отвечает за повышенную протонную проводимость внутренней мембраны митохондрий. Впоследствии при помощи синтетических радиоактивно меченых аналогов пуриновых нуклеотидов было

установлено, что, кроме адениннуклеотидтранслокатора эти аналоги связываются с еще одним белком с молекулярной массой 32 кДа. Последующая очистка и изучение свойств этого белка показали, что именно он ответственен за чувствительную к ГДФ протонную проницаемость митохондриальной мембраны (Lin, Klingenberg, 1982).

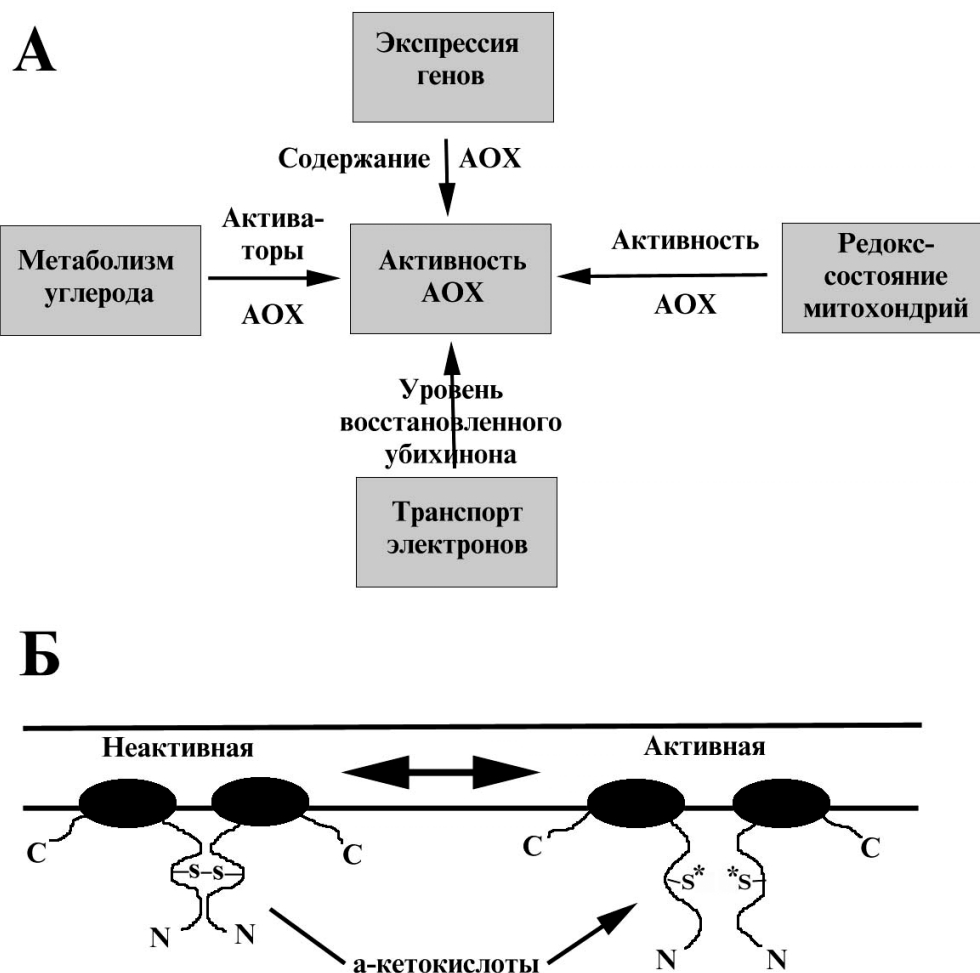


Рис. 5.

А. Основные факторы, влияющие на активность альтернативной оксидазы в митохондриях высших растений.

Б. Схема регуляции активности альтернативной оксидазы в митохондриях высших растений.

Разобщающие белки в настоящее время обнаружены как в митохондриях животных и человека, так и в растительных органеллах

(Скулачев, 1989; Vercesi et al., 1995; Samec et al., 1998; Jezek et al., 1998; Jezek et al., 2000; Bouillaud et al., 2001; Raimbault et al., 2001). Эти белки, как предполагают, являются филогенетически специализированными протеинами, с помощью которых осуществляется регулируемое разобщение процессов окисления и фосфорилирования (Fleury, Sanchis, 1999; Bouillaud et al., 2001). Все известные разобщающие белки принадлежат к семейству митохондриальных переносчиков и являются белками внутренней мембраны органелл (Jezek et al., 1998; Garlid et al., 2000; Garlid et al., 2001).

Кроме UCP1, который, в соответствии с имеющимися в настоящий момент данными, локализован исключительно в митохондриях бурого жира, у животных было обнаружено семейство UCP-подобных белков, локализованных в разных тканях. Это белки UCP-2 (Gimeno et al., 1997; Fleury et al., 1997), UCP-3 (Boss et al., 1997; Fleury et al., 1997; Dulloo et al., 2001) и UCP-4 (Мао et al., 1999), с уменьшающейся степенью гомологии между ними. Митохондриальные разобщающие белки UCP2 и UCP3 были открыты в 1997 году при помощи методов молекулярной биологии на основании их гомологии с UCP1. Ген UCP2 обнаружен в геноме человека и мышей, а его мРНК идентифицирована в сердце, буром и белом жире, скелетных мышцах, почках, легком, плаценте и в тканях иммунной системы, таких как лейкоциты и макрофаги (Fleury et al., 1997; Jezek et al., 1998). UCP2, как предполагают, может быть вовлечен в регуляцию веса тела и энергетического баланса и может защищать от действия оксидантов (Fleury et al., 1997; Jezek et al., 1998; Samec et al., 1998; Porter, 2001). Разобщающий белок UCP3 на 57% идентичен UCP1 человека. Этот белок, как считают, является специфическим белком скелетных мышц и бурого жира и служит, главным образом, для обеспечения несократительного термогенеза (Boss et al., 1997; Jezek et al., 1998; Samec et al., 1998; Cholley et al., 2001; Garcia-Martinez et al., 2001; Porter, 2001; Simonyan et al., 2001). В то же время в настоящее время появляются данные, свидетельствующие о том, что белок UCP3 может принимать участие в регуляции энергетического обмена и играет значительную роль в регуляции ожирения и инсулиннезависимого диабета (Diehl, Hoek, 1999; Ricquier, Bouillaud, 2000b; Dulloo et al., 2001; Crowley, Vidal-Puig, 2001; Dalgaard, Pedersen, 2001; Garcia-Martinez et al., 2001; Himms-Hagen, Harper, 2001).

Поскольку степень гомологии между этими UCP-подобными белками составляет только от 60 до 30%, они считаются скорее вариантами разобщающего белка, чем его изоформами (Klingenberg, 1999; Bouillaud et al., 2001; Porter, 2001). Все эти UCP-подобные белки имеют специфическую тканевую локализацию. Если UCP1 обнаруживается исключительно в буром жире, то UCP2 распространен в тканях более широко (Jezek et al., 1999), UCP3 обнаруживается в основном в скелетных мышцах (Muzzin et al., 1999; Giacobino, 2001), а UCP4 обнаружен практически исключительно в мозге (Klingenberg, 1999; Ricquier, Bouillaud, 2000; Bouillaud et al., 2001). Данные о распространении UCP-подобных белков в тканях основаны на анализе уровней содержания их мРНК, поэтому действительные уровни содержания белка оценить трудно. Известно, что уровни содержания мРНК UCP2 и UCP3 в тканях сильно индуцируются различными стрессовыми условиями (Muzzin et al., 1999; Klingenberg, 1999). Интересно отметить, что изучение экспрессии UCP1, UCP2 и UCP3 в дрожжах показало, что все эти белки вызывали разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях (Klingenberg, 1999). В то же время клетки дрожжей, в которых экспрессировался UCP3, по сравнению с клетками, в которых экспрессировался UCP1, очень слабо реагировали на свободные жирные кислоты и нуклеотиды, хотя дрожжи, содержащие UCP2 и UCP3, росли значительно слабее, чем содержащие UCP1, вследствие постоянной активности этих белков (Hinz et al., 1999). Дальнейшее изучение показало, что, если активность UCP1 была низкой вследствие низкого содержания свободных жирных кислот, то UCP3 оставался высокоактивным даже в их отсутствие (Klingenberg, 1999). Еще более интересным было различие в реакции UCP1 и UCP3 на добавление АДФ и АТФ. Если для UCP1 более сильным ингибитором были нуклеотидтрифосфаты, то для UCP3 в восемь раз более сильным ингибитором были нуклеотиддифосфаты (Klingenberg, 1999). Авторы предполагают, что эти факты могут быть объяснены, основываясь на различиях в физиологической роли и локализации данных белков. Если UCP1 является основным термогенным фактором митохондрий бурого жира и функционирует в условиях, когда митохондрии в значительной степени разобщены, то в скелетных мышцах термогенез и разобщение требуется только при отдыхе, когда отношение АТФ/АДФ является

низким, т.е. UCP3 активируется при низком содержании АДФ. Таким образом, авторы предполагают различия в механизмах функционирования этих разобщающих белков (Klingenberg, 1999). Разобщающие белки были обнаружены и у других организмов, отличных от млекопитающих. В частности, они были обнаружены у птиц (Raimbault et al., 2001) и простейших (Jarmuszkiewicz et al., 1999). Поиск иммунохимически родственных UCP белков выявил наличие разобщающего белка в несбраживающих паразитических дрожжах *Candida parapsilosis* (Jarmuszkiewicz et al., 2000). Этот белок получил название CpUCP. Активность CpUCP стимулировалась свободными жирными кислотами (линоленовой кислотой) и ингибировалась ГТФ, так же как и активность UCP. Активация CpUCP вызывала увеличение дыхания в состоянии 4 и уменьшение $\Delta\Psi$ и отношения АДФ/О (Jarmuszkiewicz et al., 2000).

UCP1, ранее известный как UCP или термогенин, является в этом смысле «классическим» митохондриальным разобщающим белком, специфичным для митохондрий бурой жировой ткани млекопитающих (Palou et al., 1998; Nicholls, Rial, 1999; Klingenberg, 1999; Klingenberg, Huang 1999; Stuart et al., 1999; Ricquier, Bouillaud, 2000). Этот белок кодируется ядерным геном. Мол. масса термогенина у всех исследованных видов животных и человека приблизительно равна 33 кДа. UCP1 представляет собой мономер, состоящий из 305 аминокислот у человека и 306 аминокислот у мыши (Jezek, Garlid, 1998). Функциональная единица белка является гомодимером (Palou et al., 1998; Ricquier, Bouillaud, 2000). Изучение структуры UCP1 показало, что он состоит из трех трансмембранных доменов (Miroux et al., 1993; Jezek, Garlid, 1998; Palou et al., 1998). Подобная тройничная структура имеется и у других UCP-подобных разобщающих белков (Fleury, Sanchis, 1999).

Бурая жировая ткань, как известно, представляет собой особую ткань млекопитающих, специализированную на выработке тепла. Своим цветом бурый жир обязан митохондриям, содержащимся в огромных количествах в клетках этой ткани. Митохондрии бурого жира имеют уникальную особенность – в их внутренней мембране содержится разобщающий белок (UCP1). Активностью этого белка в основном и обусловлена термогенная функция бурого жира (Скулачев, 1989; Garlid et al., 1998; Jezek et al., 1998; Palou et al., 1998). UCP1 функционирует как высокорегулируемый

переносчик протонов через внутреннюю мембрану митохондрий, который ингибируется пуриновыми нуклеотидами и активируется жирными кислотами (Скулачев, 1989; Palou et al., 1998). В активированном состоянии UCP1 служит промежуточным звеном возврата протонов в матрикс. В результате протонный потенциал, образуемый дыхательной цепью, рассеивается в виде тепла и происходит разобщение дыхания и фосфорилирования (рис. 6).

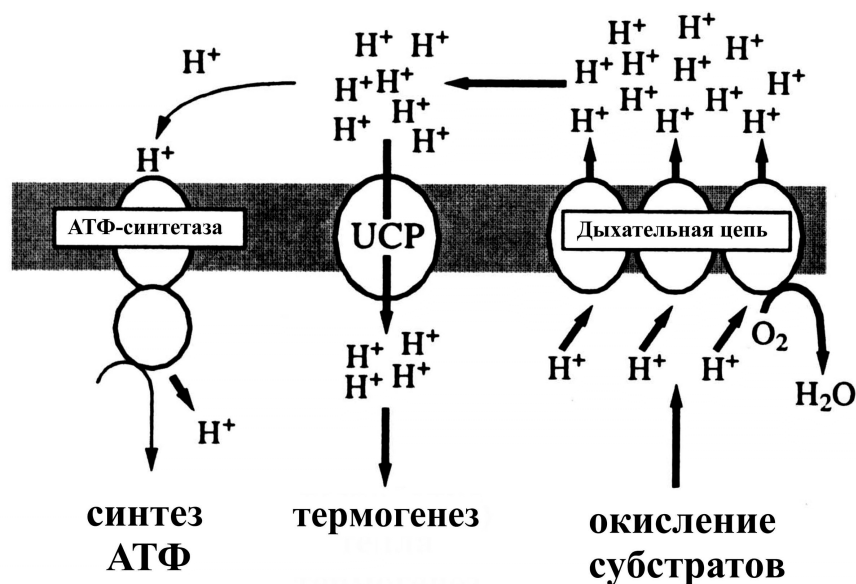


Рис. 6 Участие разобщающего белка в генерации тепла митохондриями при гипотермии (Palou et al., 1998).

В некотором отношении UCP1 функционирует как элементарный H⁺ транспортер. Его функционирование не связано с котранспортом или обменом ионов, как у H⁺-Na антипортера. Этот белок не является АТФ-зависимой транспортной машиной. Транспорт H⁺ у этого белка направляется только мембранным потенциалом и в этом сходен с механизмом функционирования мембранных каналов (Klingenberg, 1999). Все же UCP1 функционирует более как переносчик, чем как канал по причине очень низкой концентрации ионов H⁺ и участия в этом процессе свободных жирных кислот.

К настоящему времени предложено две модели, объясняющие эффект стимулирования UCP1 жирными кислотами. Согласно первой модели, UCP1 рассматривается как переносчик протонов, а жирные кислоты

служат аллостерическими активаторами этого транспорта (Nicholls, Rial, 1999; Klingenberg, 1999; Klingenberg et al., 2001). В этой модели предполагается, что молекула свободной жирной кислоты проникает из липидной фазы своей карбоксильной группой в канал транслокации H^+ . Там она взаимодействует как донор/акцептор с карбоксильными группами UCP1. Путь транспорта H^+ согласно этой гипотезе состоит из широкой водной поры и узкой части, локализованной на стороне матрикса (Рис. 7). Именно в этом месте происходит ингибирование транспорта H^+ под влиянием связывания нуклеотидов (Klingenberg, 1999).

Согласно второй модели, UCP1 выступает посредником, облегчающим трансмембранный перенос анионов жирных кислот (Palou et al., 1998; Garlid et al., 1998; Jezek, 1999; Skulachev, 1999; Stuart et al., 2001). Облегчение трансмембранного перемещения анионов жирных кислот имеет принципиальное значение для разобщающего действия жирных кислот, поскольку их анионные формы задерживаются на поверхности раздела мембрана/вода, ориентируясь карбоксилем в сторону воды, а жирным «хвостом» - в сторону липида. Именно поэтому мембраны плохо проницаемы для анионов жирных кислот и хорошо проницаемы для их нейтральных (протонированных) форм (Скулачев, 1989; Jezek et al., 1998). По этой гипотезе механизм разобщения жирными кислотами с участием разобщающего белка кратко сводится к следующему. Анионы жирных кислот переносятся к внешнему участку внутренней мембраны митохондрий с помощью UCP1, отталкиваясь от него, становятся протонированными и возвращаются в нейтральной форме, перенося при этом ионы водорода. Этот этап сопровождается разобщением окислительного фосфорилирования и выделением тепла. Таким образом, согласно гипотезе «циклического оборота жирных кислот», жирные кислоты выступают как циклические протонофоры (Jezek et al., 1998; Palou et al., 1998; Skulachev, 1999) (рис. 7).

Циклический оборот жирных кислот, опосредованный участием разобщающих белков, может регулироваться различными способами – разными для каждого белка. Другая важная характеристика разобщения при помощи жирных кислот состоит в том, что здесь не требуется специального механизма для прекращения разобщающего эффекта.

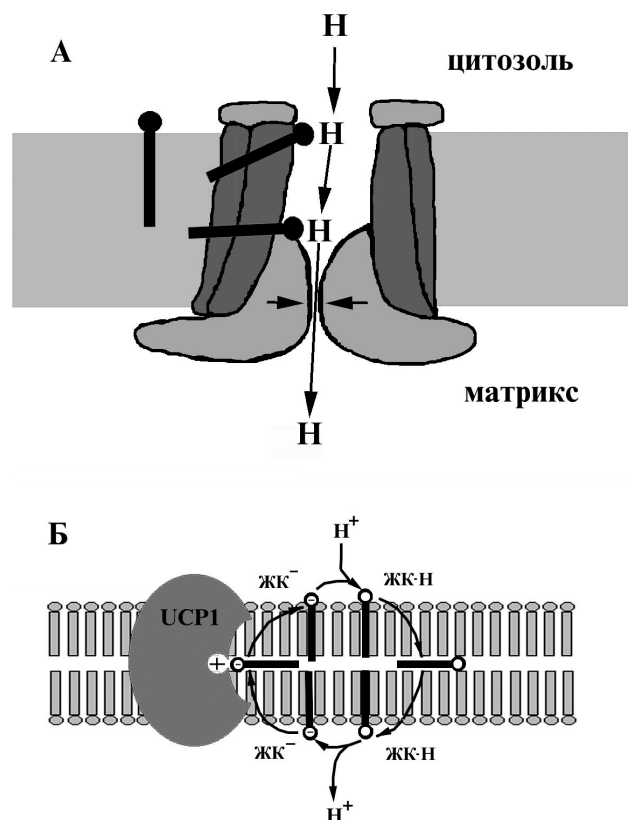


Рис. 7. Механизмы функционирования митохондриального разобщающего белка UCP1: как канала (А) (Klingenberg, 1999) и в соответствии с гипотезой «циклического оборота жирных кислот» (Б) (Jezek, 1999).

Разобщение исчезнет само по себе, как только скорость поступления жирных кислот в митохондрии станет меньше скорости их окисления (Скулачев, 1989; Jezek et al., 1998; Palou et al., 1998; Skulachev, 1999). Ряд авторов считает, что участие разобщающих белков в обороте жирных кислот экспериментально подтверждено для UCP1 и PUMP и предсказано для UCP2 и UCP3 (Jezek et al., 1998; Palou et al., 1998; Jezek, Garlid, 1998; Garlid et al., 1998).

Изучение геномов растений позволило установить, что в них присутствуют гены, кодирующие белки, имеющие высокую гомологию с

UCP1 и UCP2. Эти белки были названы растительными митохондриальными разобщающими белками (plant mitochondrial uncoupling proteins – PUMP) (Vercesi et al., 1995; Vercesi et al., 2001). Растительный разобщающий митохондриальный белок PUMP вначале был выделен из клубней картофеля, затем с помощью иммунологических методов был обнаружен в различных фруктах и кукурузе как полипептид с мол. массой 32 кДа и димер с молекулярной массой 64 кДа (Laloi et al., 1997; Jezek et al., 1998). Скрининг библиотеки генов картофеля привел к открытию белка StUCP, который на 44% гомологичен UCP1 (Laloi et al., 1997).

Впоследствии анализ геномов многих растений показал присутствие в них генов, кодирующих PUMP. В частности, такие гены были обнаружены у Арабидопсиса. Анализ выделенной кДНК показал, что этот ген кодирует белок, состоящий из 306 аминокислот с предсказанной молекулярной массой 32.7 кДа (Maia et al., 1998). Этот предсказанный полипептид был на 81% идентичен StUCP картофеля и имел мотив, общий для всех митохондриальных транспортеров. Было обнаружено, что ген AtPUMP экспрессируется во всех тканях и его экспрессия сильно индуцируется холодной обработкой, в связи с чем было предположено, что этот белок может принимать участие в защите растения от низкотемпературного стресса при помощи термогенеза (Maia et al., 1998). При дальнейшем изучении генома Арабидопсиса был обнаружен еще один ген, кДНК которого имела все характеристики известных UCP-подобных белков (Watanabe et al., 1999). В то же время было установлено, что этот ген, в отличие от генов других растительных разобщающих белков, не индуцировался холодом. На основании этих данных авторами было предположено, что у растений, так же как и у животных, семейство UCP-подобных белков мультигенно (Watanabe et al., 1999). Впоследствии при помощи вестерн-блоттинга белок PUMP был обнаружен у значительного количества исследованных видов растений (Jezek et al., 2000).

В дальнейшем две индуцируемые холодом кДНК, кодирующие растительные разобщающие белки, были изолированы из початков *Symplocarpus foetidus* (Ito, 1999). Эти кДНК были обозначены как SfUCPa и SfUCPb. SfUCPa кодирует белок из 303 аминокислот с предсказанной молекулярной массой 32.6 кДа, а SfUCPb кодирует белок из 268

аминокислот с предсказанной молекулярной массой 29.0 кДа. В то время как белок SfUCPa имел шесть трансмембранных доменов и тройничную структуру, SfUCPb имел только пять трансмембранных доменов, и, следовательно, имел отличающуюся топологию (Ito, 1999). Экспрессия мРНК обоих генов наблюдалась только в початках, но не в листьях, причем сильно индуцировалась в ответ на низкотемпературный стресс. Этот факт позволяет предположить, что SfUCPa и SfUCPb могут играть важную роль в термогенезе в початках *Symplocarpus foetidus* (Ito, 1999).

Изучение активности белка PUMP на разных стадиях онтогенеза показало, что он участвует в окончании синтетических процессов при созревании фруктов и во время климактерического подъема дыхания (дыхание перед полным созреванием плодов) (Jarmuszkiewicz et al., 1998; Jezek et al., 1998). Сравнение энергетических параметров митохондрий, изолированных из зеленых и зрелых плодов томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill.), показало, что, если митохондрии, изолированные из зеленых плодов, обладали высокой степенью сопряжения окисления и фосфорилирования, то митохондрии, изолированные из красных зрелых плодов, были в значительной степени разобщены (Costa et al., 1999). Для сопряжения этих митохондрий требовалось добавление БСА и АТФ, что свидетельствует о том, что это разобщение опосредовано активностью белка PUMP (Costa et al., 1999). Прямое доказательство увеличения содержания PUMP во время созревания плодов томата было получено А.М. Almeida с соавторами, наблюдавшими при помощи вестерн-блоттинга с антителами против PUMP увеличение содержания этого белка по мере созревания плодов (Almeida et al., 1999). Сходные данные были получены и для созревающих плодов манго (Considine et al., 2001).

Изучение механизма функционирования PUMP было проведено путем встраивания изолированного белка PUMP в липосомы и последующего изучения потоков K^+ и H^+ и влияния на них свободных жирных кислот (Jezek et al., 1997). Полученные данные свидетельствуют, что свободные жирные кислоты, не способные к флип-флоп переходам, в частности, фенилвалериановая кислота, не могут вызывать эффект протонной проводимости мембраны со встроенным в нее белком PUMP. На основании этих данных авторы делают вывод о функционировании белка PUMP в соответствии с механизмом «циклического оборота жирных

кислот» (Jezek et al., 1997). Интересно также отметить, что при изучении влияния активации PUMP свободными жирными кислотами на функционирование альтернативной оксидазы было установлено, что активация PUMP вызывает ингибирование альтернативной оксидазы (Sluse et al., 1998; Almeida et al., 1999).

Следует отметить, что почти все обнаруженные в растениях UCP-подобные разобщающие белки, в частности StUCP (Laloi et al., 1997) и PUMP в клубнях картофеля при хранении (Nantes et al., 1999), AtPUMP у арабидопсиса (Maia et al., 1998), а также SfUCPa и SfUCPb в початках *Symplocarpus foetidus* (Ito, 1999) индуцируются холодом. В связи с этим имеются все основания предполагать, что эти белки принимают участие в защите растений от низкотемпературного стресса при помощи термогенеза (Laloi et al., 1997; Maia et al., 1998; Ito, 1999) и, следовательно, могут считаться стрессовыми белками растений (Колесниченко и др., 2000).

Третьей системой, вызывающей при своем функционировании разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях растений, является стрессовый белок БХШ 310. Молекулярная масса этого нативного белка составляет 310 кДа. Показано, что этот белок состоит из двух типов субъединиц с молекулярными массами 56 и 66 кДа (Колесниченко и др., 1996). Показано увеличение содержания данного белка в клетках холодоустойчивых озимых злаков под действием низкотемпературного стресса (Колесниченко и др., 1996; Колесниченко и др., 1997). Использование линий нехолодостойкого сорта озимой пшеницы Безостая 1 с замещением хромосом от холодостойкого сорта Альбидум позволило установить, что конститутивный синтез этого белка контролируется 1 и 6 хромосомами D-генома мягкой пшеницы (Войников и др., 1998).

В ходе изучения влияния низкотемпературного стресса на содержание БХШ 310 в проростках озимой пшеницы установлено, что существует зависимость содержания этого белка от интенсивности низкотемпературного стресса. Наибольшее увеличение содержания БХШ 310 показано при температуре 3⁰С (Колесниченко и др., 1996). При закаливании растений к холоду происходит изменение содержания БХШ 310 в клетках озимых злаков. Значительное увеличение его содержания происходит в течение первого часа гипотермии. Затем в течение первых суток воздействия закаливающей температуры содержание БХШ 310

снижается. По данным ракет-иммуноэлектрофореза, отмечается повторное увеличение содержания БХШ 310 после третьих суток воздействия закаливающей температуры (Колесниченко и др., 1997). Необходимо отметить, что в ходе дальнейших исследований было показано, что у закаленных растений термогенез, который является одной из основных функций БХШ 310, выражен в значительно меньшей степени, чем у незакаленных (Kolesnichenko et al., 2001e). Поскольку в ходе изучения функционирования БХШ 310 в митохондриях выявлено различие разобщающей способности конститутивно синтезируемой и стрессовой форм данного белка (Pobezhimova et al., 2001), то можно предполагать, что синтезирующаяся у закаленных растений конститутивная форма БХШ 310 не переходит в стрессовую. В таком случае, функции БХШ 310 в ходе закаливания растений к низкой температуре должны отличаться от тех, которые он выполняет во время кратковременной гипотермии.

Содержание БХШ 310 в незакаленных проростках высокоустойчивых сортов и генотипов озимой пшеницы выше, чем у неустойчивых (Колесниченко 1988; Колесниченко и др., 1990). Этот факт позволяет сделать вывод, что уровень конститутивного синтеза БХШ 310 оказывает влияние на уровень устойчивости сорта озимой пшеницы. Это можно также связать с наличием двух форм данного белка, причем конститутивно синтезируемая форма в данном случае выступает как «депо», позволяющее более устойчивым сортам быстрее отвечать на воздействие низкой температуры (Kolesnichenko et al., 2001g).

При изучении функций БХШ 310 в растительной клетке во время кратковременной гипотермии показано, что этот стрессовый белок является посредником в ядерно-митохондриальных взаимодействиях, разобщая окисление и фосфорилирование в митохондриях и вызывая термогенез (Побежимова и др., 1997; Voinikov et al., 1998). В ходе изучения функций стрессового белка БХШ 310 установлено, что белок, синтезирующийся у трехсуточных проростков озимой ржи конститутивно, обладает более слабой разобщающей активностью, чем находящийся в клетке во время низкотемпературного стресса (Pobezhimova et al., 2001).

Показано, что БХШ 310 по-разному воздействует на комплексы дыхательной цепи митохондрий. Наиболее сильное увеличение

нефосфорилирующего дыхания отмечено при функционировании первого комплекса дыхательной цепи (Рис. 8). На остальные комплексы митохондриальной дыхательной цепи этот белок влияет в значительно меньшей степени (Grabelnych et al., 2001a). Показан эффект термогенеза, вызываемого добавлением к митохондриям БХШ 310 (Voinikov et al., 2001).

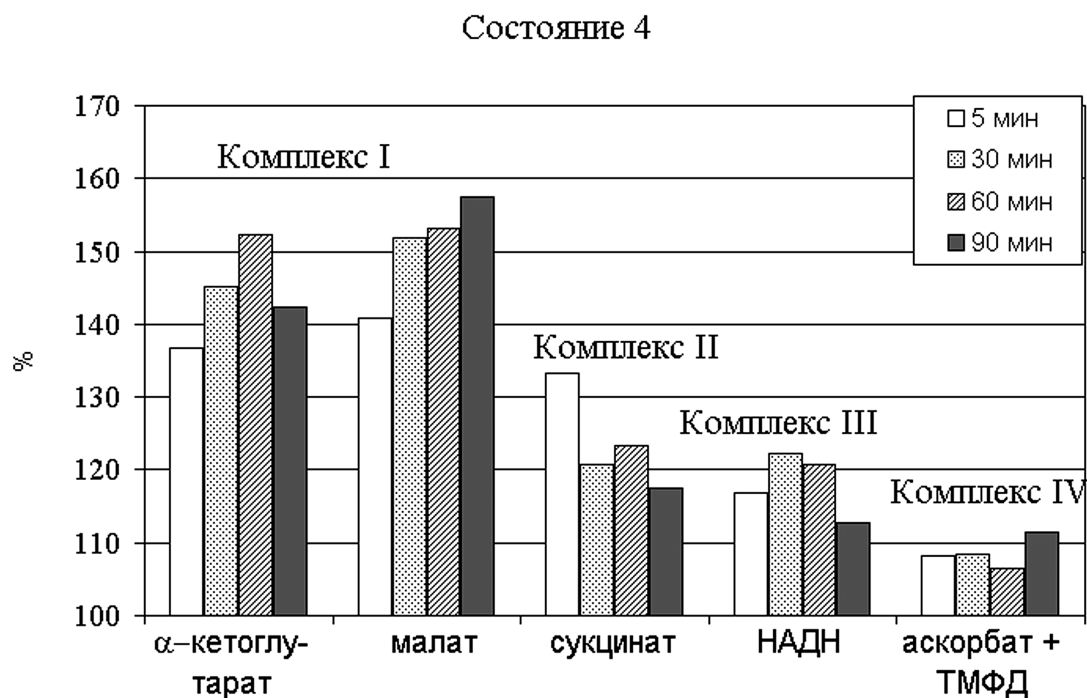


Рис. 8. Изменение относительной скорости нефосфорилирующего дыхания митохондрий озимой пшеницы при окислении ими различных субстратов цикла трикарбоновых кислот во время инкубации органелл *in vitro* при 0°C с БХШ 310 (цит. по Grabelnych et al., 2001a).

При изучении влияния ингибиторов известных растительных разобщающих белков (PUMP и StUCP) на разобщающую активность БХШ 310 установлено, что бычий сывороточный альбумин в концентрациях, связывающих свободные жирные кислоты и полностью подавляющих активность известных разобщающих белков, не оказывает влияния на

разобщающую активность БХШ 310 (Войников и др., 2001a; Kolesnichenko et al., 2002). В то же время показано, что БХШ 310 не является активатором альтернативной циапидрезистентной оксидазы, поскольку вызванное его добавлением увеличение нефосфорилирующего дыхания и термогенез ингибируется KCN (Войников и др., 2001б). В связи с этим выдвинуто предположение, что механизм разобщающего действия БХШ 310 отличается от механизма действия известных разобщающих растительных белков. В то же время показано, что при инкубации изолированных митохондрий с данным белком при 0 °С происходит быстрая и сильная ассоциация БХШ 310 с митохондриями. Установлено, что эта ассоциация не зависит от $\Delta\Psi$, и таким образом, энергонезависима (Kolesnichenko et al., 2001с).

Поиск белков, иммунохимически родственных БХШ 310, в клеточных фракциях показал, что у озимой ржи имеется целый ряд иммунохимически родственных БХШ 310 белков, состоящих из двух типов субъединиц с мол. массами 56 и 66 кДа (Kolesnichenko et al., 2000a). Изучение состава этих белков в цитоплазматической, митохондриальной и ядерной фракциях показало, что состав высокомолекулярных белков этого семейства различен в этих фракциях. Если белки с мол. массами 230, около 140 и 56 и 66 кДа обнаружены во всех клеточных фракциях, то в цитоплазме присутствовали также белки с мол. массами 470 и 310 кДа, в ядерной фракции - белки с мол. массами 470 и 320-330 кДа, а в митохондриальной фракции - белок с мол. массой 310 кДа (Kolesnichenko et al., 2000a). Окраска гелей бромистым этидием позволила установить, что цитоплазматический белок с молекулярной массой 310 кДа и ядерные белки с мол. массами 320 - 330 кДа и 470 кДа являются нуклеопотеинами (Kolesnichenko et al., 2000a; Kolesnichenko et al., 2001g).

Под действием холодового шока в цитоплазме происходит увеличение содержания высокомолекулярных белков с мол. массами 310 и 470 кДа, и в то же время значительно уменьшается содержание иммунохимически родственных БХШ 310 белков с мол. массами 230 и около 140 кДа. В ядерной фракции при гипотермии уменьшается содержание белка с мол. массой 470 кДа, но увеличивается содержание белка с мол. массой 320 кДа. В митохондриальной фракции холодовой шок вызывает появление белков с мол. массами 320 и 470 кДа, отсутствующих в белках

контрольных проростков озимой ржи. При этом по данным вестерн-блоттинга с антителами на БХШ 310, содержание низкомолекулярных иммунохимически родственных ему белков во всех клеточных фракциях резко снижается (Kolesnichenko et al., 2000a).

Полученные при изучении влияния низкотемпературного стресса на состав и характеристики белков семейства БХШ 310 данные представляют интерес в связи с тем, что, как отмечалось в обзоре литературы, бактериальные белки холодового шока (CSPs), по существующим в настоящее время представлениям, являются РНК-шаперонами и принимают участие в регуляции и обеспечении функционирования процессов трансляции во время низкотемпературного стресса (Jiang et al., 1997). В связи с этим можно предположить, что цитоплазматический белок с мол. массой 470 кДа, который под действием низкотемпературного стресса начинает связывать нуклеиновые кислоты, также может участвовать в регулировании процессов трансляции во время низкотемпературного стресса. В то же время тот факт, что некоторые белки семейства БХШ 310 под действием низкотемпературного стресса высвобождают нуклеиновые кислоты, связанные с ними ранее, позволяет выдвинуть предположение, что эти нуклеиновые кислоты могут быть «маскированными» РНК, синтез белков с которых происходит во время низкотемпературного стресса. Полученные данные также позволяют говорить о существовании в цитоплазме озимой ржи двух форм стрессового белка БХШ 310 – «конститутивно синтезируемой», связанной с нуклеиновой кислотой и «стрессовой», не связанной с нуклеиновой кислотой (Pobezhimova et al., 2001; Kolesnichenko et al., 2001g). Этот вывод подтверждает также тот факт, что при исследовании влияния этих двух форм БХШ 310 на энергетическую активность митохондрий было показано различие в способности разобщать окисление и фосфорилирование в митохондриях этих двух форм белка БХШ 310 (Pobezhimova et al., 2001).

При изучении полиморфизма иммунохимически родственных БХШ 310 белков у ряда культурных и дикорастущих злаков - озимой ржи, озимой пшеницы, кукурузы и пырейника - был выявлен значительный полиморфизм среди белков цитоплазматической фракции (Kolesnichenko et al., 1999; Колесниченко и др., 2000a). У всех изученных злаков были

обнаружены низкомолекулярные иммунохимически родственные БХШ 310 белки с мол. массами 230 кДа и ниже. В высокомолекулярной области у озимой ржи обнаружено присутствие в цитоплазме белков с мол. массами 470 и 310 кДа, у озимой пшеницы - 310 кДа, а у пырейника ряд белков с мол. массами 320-380 кДа. В то же время при изучении митохондриальных иммунохимически родственных БХШ 310 белков выявлен значительный консерватизм - митохондрии всех изученных видов содержали один и тот же набор белков с мол. массами 310, 230, около 140 и 56 и 66 кДа. Установлено, что во всех исследованных видах растений иммунохимически родственные БХШ 310 белки состоят из двух типов субъединиц с мол. массами 56 и 66 кДа (Kolesnichenko et al., 1999; Колесниченко и др., 2000a). Результаты этих экспериментов позволяют сделать вывод, что в цитоплазме озимой ржи и, в несколько меньшей степени, в цитоплазме озимой пшеницы, существует своего рода «депо» малоактивной формы БХШ 310, которая во время низкотемпературного стресса переходит в активную и быстро переводит митохондрии в низкоэнергетическое состояние, характеризующееся разобщением окисления и фосфорилирования.

При изучении влияния БХШ 310 на процессы ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы было установлено, что, в отличие от УСР-подобных разобщающих растительных белков (Kowaltowski, Vercesi, 1999), добавление экзогенного БХШ 310 к митохондриям вызывает значительную индукцию перекисного окисления в условиях искусственно вызванного окислительного стресса при помощи активации ферментативного и неферментативного ПОЛ (Zykova et al., 2000; Зыкова и др., 2000). При этом была отмечена сильная зависимость индукции неферментативной и ферментативной систем ПОЛ от концентрации экзогенного БХШ 310 в среде инкубации митохондрий. В то же время необходимо отметить, что стрессовый белок БХШ 310 не оказывал индуцирующего влияния на ПОЛ в неактивных митохондриях и в модельном эксперименте с индукцией ПОЛ в эмульсии линолевой кислоты, что позволяет предположить, что этот белок не обладает прямой прооксидантной активностью, а оказывает влияние на ПОЛ в митохондриях путем регулирования их энергетической активности (Kolesnichenko et al., 2001i; Zykova et al., 2001a,b). Полученные в ходе экспериментов результаты позволяют предположить, что БХШ 310

обладает апоптической активностью, и что одна из функций БХШ 310 состоит, возможно, в «разборке» определенной части митохондрий, наиболее пострадавших от действия температурного стресса, путем активации ПОЛ и последующих митоптоза и апоптоза (Скулачев, 1998). В связи с этим необходимо отметить, что к настоящему времени в растениях, в отличие от животных, не обнаружены каспазы (caspase), каскад которых является основным компонентом механизма апоптоза. Считается также, что в растениях реализуется несколько отличный вариант программируемой клеточной смерти, определяемый как «программируемый онкозис» (Jones, 2000). В то же время известно, что необходимым условием апоптоза является выход из митохондрий в цитоплазму цитохрома *c* (Reed, 1997), который является «апоптическим фактором – 2» (Araf-2) (Jones, 2000). В связи с этим, а также принимая во внимание наличие в наружной и внутренней митохондриальных мембранах иммунохимически родственных БХШ 310 полипептидов и быструю его ассоциацию с митохондриями (Kolesnichenko et al., 2000b), можно предположить, что БХШ 310 в растении связывается с мембранными белками и образует комплекс, подобный известной митохондриальной поре (РТР). При этом в поврежденных во время стресса митохондриях этот комплекс вызывает усиление образования ими АФК.

Несмотря на то, что при изучении влияния экзогенного БХШ 310 на ПОЛ в изолированных митохондриях был установлен факт возможности определенного прооксидантного действия экзогенного БХШ 310, эксперименты с изучением влияния на ПОЛ антисыворотки против данного белка, преципитирующей эндогенный БХШ 310 и устраняющей его разобщающую активность, показали, что добавление к митохондриям антисыворотки против БХШ 310 значительно индуцирует ПОЛ в митохондриях (Kolesnichenko et al., 2001d). Эксперименты *in vivo* показали, что инфильтрация проростков стрессовым белком БХШ 310 вызывает значительное уменьшение уровня ПОЛ в проростках во время последующего низкотемпературного стресса (Kolesnichenko et al., 2001i; Zyкова et al., 2001b), что свидетельствует о том, что из двух активностей (прооксидантной и антиоксидантной) в целом растении во время низкотемпературного стресса превалирует антиоксидантная активность (Рис. 9).

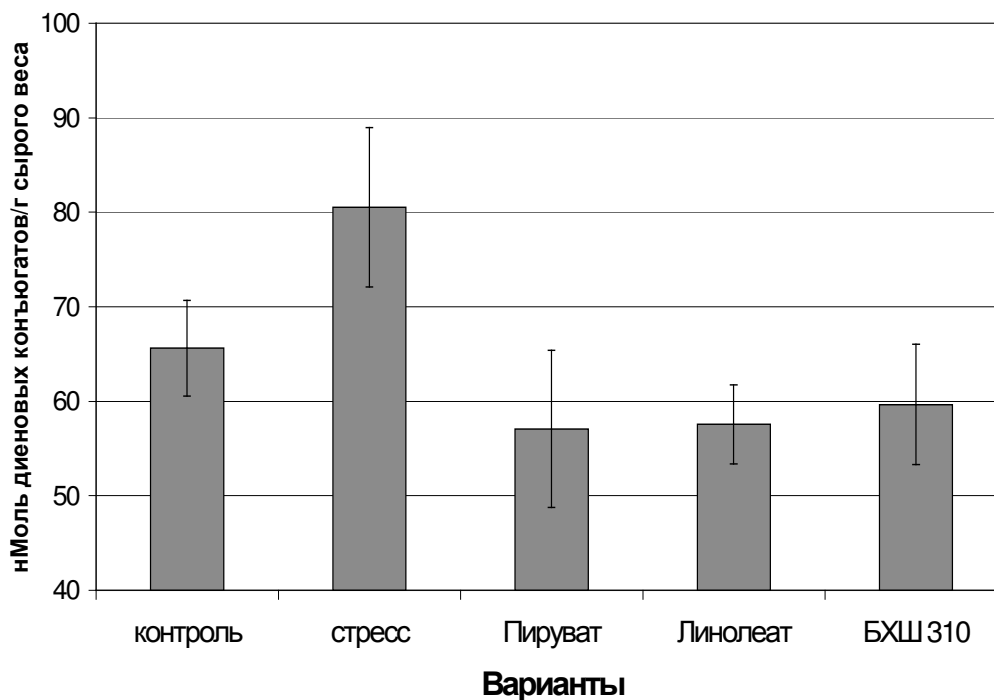


Рис 9. Влияние активаторов известных растительных разобшающих систем на перекисное окисление липидов в митохондриях озимой пшеницы во время низкотемпературного стресса (цит по Kolesnichenko et al., 2001i).

Эти результаты позволяют сделать вывод, что эндогенный БХШ 310 в митохондриях, также как и известные к настоящему времени растительные UCP-подобные разобшающие белки (Kowaltowski, Vercesi, 1999), оказывает антиоксидантный эффект за счет общего снижения содержания кислорода в растительной клетке вследствие разобщения окисления и фосфорилирования в митохондриях. В этом случае можно считать, что, в соответствии с гипотезой В.П. Скулачева (1994, 1998), любые белки, разобшающие окисление и фосфорилирование в митохондриях во время низкотемпературного стресса, являются частью антиокислительной защиты клетки.

Интересные данные, хорошо согласующиеся с данными о влиянии БХШ 310 на энергетическую активность растительных митохондрий, были получены при изучении влияния БХШ 310 и антисыворотки против этого белка на ПОЛ при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий (Kolesnichenko et al., 2001d). Эксперименты по

изучению влияния БХШ 310 на функционирование различных комплексов дыхательной цепи митохондрий показали, что наиболее чувствительным к разобщающему действию БХШ 310 является комплекс I митохондриальной дыхательной цепи (Grabelnych et al., 2001a). Результаты экспериментов по изучению влияния этого белка на ПОЛ в митохондриях свидетельствуют, что экзогенный БХШ 310 оказывает статистически достоверное влияние на интенсивность ПОЛ только при функционировании I комплекса дыхательной цепи митохондрий озимой пшеницы (Kolesnichenko et al., 2001d) и I и II комплекса дыхательной цепи митохондрий кукурузы (Kolesnichenko et al., 2001a). При этом необходимо отметить, что влияние, оказываемое экзогенным БХШ 310 на ПОЛ в митохондриях кукурузы, было сильнее, чем в митохондриях пшеницы.

При сравнении влияния антисыворотки против БХШ 310 на ПОЛ в митохондриях при функционировании различных комплексов дыхательной цепи установлено, что присутствие в среде инкубации митохондрий антисыворотки против БХШ 310, преципитирующей этот белок и оказывающей сопрягающее действие на митохондрии (Pobezhimova et al., 2001), приводит к индукции процессов ПОЛ в митохондриях как пшеницы, так и кукурузы (Kolesnichenko et al., 2001d). При этом активация ПОЛ меньше зависела от использованного субстрата дыхательной цепи митохондрий.

Эксперименты по изучению влияния антисыворотки против БХШ 310 на ПОЛ в митохондриях, изолированных из стрессированных проростков показали, что сыворотка оказывает более сильное индуцирующее влияние на ПОЛ в митохондриях стрессированных проростков как озимой пшеницы, так и кукурузы, по сравнению с митохондриями, выделенными их контрольных проростков (Kolesnichenko et al., 2001d; Zykova et al., 2001a,b).

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что в условиях *in vivo* БХШ 310 во время низкотемпературного стресса в неповрежденных митохондриях выполняет, так же как и другие известные разобщающие белки, антиокислительную функцию. В то же время в поврежденных митохондриях БХШ 310 может принимать участие в их апоптической «разборке» путем активации в поврежденных митохондриях процессов ПОЛ.

Установлено, что добавление к изолированным митохондриям злаков антисыворотки, полученной против БХШ 310, позволяет устранить разобщающий эффект этого стрессового белка (Войников и др., 2001a; Kolesnichenko et al., 2001c). Поскольку антитела могут преципитировать антиген только на поверхности наружной мембраны митохондрий, то данный факт позволяет сделать вывод о том, что БХШ 310, вызывающий разобщение окисления и фосфорилирования, локализован снаружи митохондрий (Kolesnichenko et al., 2001c). При изучении влияния антисыворотки на митохондрии показано, что даже при выделении митохондрий из «контрольных» растений из-за охлаждения растительного материала в процессе выделения происходит ассоциация БХШ 310 с митохондриями и разобщение окислительного фосфорилирования.

Показано отсутствие *in vivo* разобщающей активности БХШ 310 в митохондриях двудольных растений (Grabelnych et al., 2001c). В модельных экспериментах на митохондриях гороха продемонстрирован разобщающий дыхание и фосфорилирование эффект добавления к ним БХШ 310 и возможность элиминировать этот эффект добавлением антисыворотки против БХШ 310 (Войников и др., 2001a). Отсутствие *in vivo* разобщающего эффекта БХШ 310 у исследованных двудольных растений (Grabelnych et al., 2001c) позволяет утверждать, что механизм разобщения окисления и фосфорилирования во время низкотемпературного стресса с участием этого белка является специфичным для злаков и представляет собой относительно недавнее эволюционное приобретение.

Установлено, что добавление к БХШ 310 митохондриям озимой пшеницы вызывает термогенез и, как следствие этого термогенеза, повышение температуры суспензии митохондрий по сравнению с контрольной суспензией, инкубируемой без добавления белка (Войников и др., 2001б; Voinikov et al., 2001). Добавление к митохондриям антисыворотки против БХШ 310, преципитирующей эндогенный БХШ 310 и повышающей степень сопряжения окисления и фосфорилирования митохондрий, вызывает снижение температуры в ячейке по сравнению с контрольными митохондриями. Изучение влияния KCN на термогенез в суспензии митохондрий показало, что термогенез, вызванный добавлением БХШ 310, полностью подавляется KCN, и, следовательно, зависит от

функционирования комплекса IV дыхательной цепи митохондрий (Войников и др., 2001б; Voinikov et al., 2001).

Данные о влиянии интенсивности холодового шока на температуру проростков озимой пшеницы свидетельствуют об увеличении выработки тепла побегами проростков озимой пшеницы (Войников, Корзун, 1984; Vojnikov et al., 1984; Kolesnichenko et al., 2001e). Этот факт позволяет предположить, что процесс генерации тепла проростками озимой пшеницы является одним из физиологически регулируемых механизмов защиты растения от низкотемпературного стресса, а не является вторичным эффектом изменения метаболизма растительной клетки во время низкотемпературного стресса. При этом необходимо отметить, что образование льда в убитых незакаленных проростках озимой пшеницы происходило при той же температуре, что и у живых проростков, но быстрее. Следовательно, можно предположить, что генерация тепла проростками озимой пшеницы позволяет им получить дополнительное время на подготовку к повреждающему действию образующегося льда.

Таким образом, имеющиеся к настоящему времени данные позволяют утверждать, что разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях растений является регулируемым физиологическим процессом. В отличие от животных, обладающих одной системой, регулирующей степень разобщения окисления и фосфорилирования, у растений в митохондриях имеется несколько систем, регулирующих степень сопряжения окислительного фосфорилирования. У всех растений обнаружены альтернативная цианидрезистентная оксидаза и растительные UCP-подобные митохондриальные разобщающие белки. У злаков в дополнение к ним обнаружен белок БХШ 310. Все эти обнаруженные у растений белки являются белками ядерного кодирования, что позволяет говорить о ядерном контроле степени сопряжения окисления и фосфорилирования в митохондриях.

Функции, выполняемые разобщающими митохондриальными системами в растениях, в общем, совпадают с теми, которые они выполняют у животных. Ими являются термогенез, снижение образования активных форм кислорода митохондриями и регуляция энергетического и метаболического баланса. Все митохондриальные разобщающие системы участвуют в ответе растения на различные типы стрессовых воздействий, в

связи с этим их можно рассматривать как специфические стрессовые системы. Несмотря на то, что растительные разобщающие системы в настоящее время активно изучаются рядом групп исследователей, все же они изучены недостаточно и для исследователей остается широкое поле действия.

6 ВЗАИМОСВЯЗЬ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА С ДРУГИМИ ТИПАМИ СТРЕССА - ОБЕЗВОЖИВАНИЕМ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ

Поскольку, как отмечалось выше, одной из стратегий, применяемых растениями для выживания во время низкотемпературного стресса, является обезвоживание цитоплазмы, то действие низкотемпературного стресса и засухи на растения в значительной степени совпадают. Обезвоживание растительной клетки под действием низкотемпературного стресса имеет ряд опасных последствий, которые могут привести ее к гибели. Это, во-первых, повышение концентрации растворенных веществ, и прежде всего солей. Во-вторых, обезвоживание вызывает изменение pH внутриклеточных растворов. В-третьих, оно вызывает образование ковалентных связей между макромолекулами и вызывает конформационные изменения структуры макромолекул из-за снижения содержания стабилизирующих их молекул воды и, наконец, приводит к нарушению структуры мембран и вызывает повреждение структуры протоплазмы при обратном поглощении воды (Левитт, 1983).

Поскольку внеклеточное замерзание воды предотвращает образование внутриклеточного льда, но вызывает при этом обезвоживание макромолекулярной структуры клетки, предполагается, что процесс закаливания включает в себя следующие механизмы: 1) облегчение оттока воды из клетки через мембраны; 2) защиту клеточных компонентов от действия обезвоживания.

Обеспечение оттока воды через мембраны может обеспечиваться путем повышения ненасыщенности липидов (de la Roche et al., 1972; Smolenska, Kuiper, 1977). Изменения содержания фосфолипидов также влияют на свойства мембран и повышают их проницаемость для воды, а быстрое снижение содержания фосфолипидов при замораживании

вызывает усиленный отток воды в межклетники и защищает клетку от внутриклеточного льдообразования (Касперска-Палач, 1983).

Повреждения, вызываемые обезвоживанием при замораживании у закаленных растений могут быть предотвращены следующими путями: 1) структурными и конформационными изменениями компонентов клетки, которые они претерпевают в процессе закаливания (при этом происходит как переход макромолекул в устойчивые, выдерживающие сильное обезвоживание, формы, так и индуцируемый гипотермией синтез специфических макромолекул, устойчивых к обезвоживанию); 2) защитой компонентов клетки от обезвоживания взаимодействием с низкомолекулярными веществами и 3) функционированием определенных стрессовых белков.

Отмечено, что низкотемпературный стресс, высокая концентрация кислорода и озона в атмосфере, некоторые дефолианты, такие как паракват, и обезвоживание растения вызывают в клеточных мембранах повреждения со сходными симптомами, которые включают повышенную вязкость мембран, формирование областей гелевой фазы, деградацию фосфолипидов и накопление свободных жирных кислот (McKersie et al., 1988; McKersie, 1991). Все эти симптомы можно наблюдать *in vitro*, если изолированные мембраны обработать супероксидом. Уровни содержания перекиси водорода и малонового диальдегида увеличиваются во время низкотемпературного стресса, особенно при замерзании растений, что предполагает индукцию перекисного окисления липидов (Loubaresse et al., 1991).

Эти наблюдения подтверждают гипотезу, что общие симптомы повреждения клеток являются следствием развития окислительного стресса, и что устойчивость к окислительному стрессу является важным компонентом устойчивости к низкотемпературному стрессу (Kendall, McKersie, 1989). В дальнейшем было также установлено, что акклиматизация злаков к низким температурам роста стимулирует не только увеличение морозоустойчивости, но также усиливает устойчивость к действию свободных радикалов, образующихся при обработке рядом гербицидов, таких как паракват и ацифлюорфен. В связи с этим было предположено, что мембраны акклиматизированных к холоду проростков накапливают липидорастворимые антиоксиданты, эффективно удаляющие

активированный кислород и ингибирующие реакции перекисного окисления (Kendall, McKersie, 1989).

Повреждения при охлаждении, как и при замерзании, частично обусловлены действием свободных радикалов кислорода как агентов, вызывающих вторичные повреждения в мембранах и фотосистемах. С одной стороны, предполагается, что активация кислорода фотосистемами при интенсивном свете является основным сайтом образования свободных радикалов в листьях (Parkin et al., 1989). В то же время другие электронно-транспортные системы, включая системы в митохондриях или плазмалемме, также могут производить активные формы кислорода, особенно в нефотосинтезирующих тканях. В частности, было показано, что митохондрии являются основным источником супероксида в чувствительных к охлаждению растительных тканях при низких температурах (Purvis et al., 1995).

В соответствии с терминологией, предложенной J. Raison и J. Lyons (1986), окислительный стресс может рассматриваться как вторичный ответ на первичное повреждение в редокс-ферментной системе. Развитие симптомов повреждения при низкотемпературном стрессе совпадает с развитием процесса перекисного окисления жирных кислот (Parkin et al., 1989). R. Shewfelt и M. Erickson (1991) предположили, что перекисное окисление липидов (ПОЛ) изменяет физические свойства мембран и ингибирует функционирование мембранно-связанных белков, что способствует развитию визуальных симптомов повреждения при низкотемпературном стрессе.

В частности, при охлаждении на свету теплицы с проростками огурца до 5 °С наблюдали следующие симптомы: 1) снижение фотосинтеза в течение 2 часов; 2) образование продукта ПОЛ – этана; 3) уменьшение содержания токоферола на 80%; 4) уменьшение содержания хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов; 5) уменьшение содержания глутатиона; 6) уменьшение содержания аскорбата на 70%. В других экспериментах при обработке низкой температурой устойчивого к охлаждению гороха подобные изменения, напротив, не происходили (McKersie, 1996).

При изучении морозоустойчивого дикого томата (*Lycopersicon hirsutum*) и культивированного генотипа (*L. esculentum* cv.H722) также наблюдалось уменьшение содержания антиоксидантов во время

охлаждения растений в течение 72 часов при 2 °C (Walker, McKersie, 1993). Содержание токоферола, аскорбата и глутатиона снижалось у *L. esculentum* в большей степени, чем у *L. hirsutum*. В действительности, у *L. hirsutum* содержание каротиноидов, аскорбата и глутатиона после охлаждения даже увеличивалось, что указывает скорее на акклиматизацию, чем на повреждение растений низкой температурой (Walker, McKersie, 1993). Тем не менее, авторы не связывают видовую устойчивость растений к холоду с абсолютным уровнем содержания антиоксидантов до охлаждения.

Воздействие на некоторые чувствительные к холоду виды растений различными типами стресса может вызывать у них устойчивость к повреждению при охлаждении. Например, было показано, что охлаждение вызывает накопление H_2O_2 в coleoptile, листе и мезокотиле проростков кукурузы выращенных в темноте, но не вызывает накопления H_2O_2 в их корнях (Anderson et al., 1994). В то же время у предварительно обработанных H_2O_2 семян симптомы повреждения холодом были незначительны. При этом в акклиматизированных проростках наблюдалось повышение содержания глутатиона и каталазы, что может быть защитой от генерируемой в митохондриях H_2O_2 (Anderson et al., 1994). Более высокая при низких температурах активность ферментов, связанных с синтезом глутатиона, способствует увеличению содержания глутатиона при акклиматизации растений (Brunner et al., 1995; Kocsy et al., 1996).

Данные, полученные при использовании методов молекулярной биологии также показывают, что между охлаждением, образованием свободных радикалов и акклиматизацией растений существует связь. Действительно, промотор гена цитозольной Cu/Zn-СОД, индуцировался в клетках табака после охлаждения и после обработки растений сульфидриловыми антиоксидантами, такими как редуцированный глутатион и цистеин (Herouart et al., 1994). В настоящее время считается, что в цитозоле экспрессия СОД прямо связана со специфичным для клеток образованием излишков радикалов супероксида.

Таким образом, имеющиеся литературные данные позволяют считать, что низкотемпературный стресс находится в тесной связи с другими видами стресса, такими как обезвоживание и окислительный стресс. Под действием низкотемпературного стресса происходят изменения в

структуре и составе клеточных мембран и изменения в метаболизме, приводящие к увеличению образования активных форм кислорода в растительной клетке. В связи с этим во время низкотемпературного стресса и процесса адаптации растения к действию низкой температуры включаются многочисленные и разнообразные защитные механизмы.

7 НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЙ СТРЕСС И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

В отсутствие экстремальных эндо- или экзогенных факторов процесс ПОЛ протекает в клетках сбалансировано. Концентрация продуктов ПОЛ удерживается на постоянном, низком уровне (Барабой и др., 1992). АФК и перекиси липидов вовлекаются в нормальный метаболизм клетки, участвуют в синтезе ряда веществ, разборке поврежденных мембранных структур (Бурлакова, Храпова, 1985). Показано, что $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , NO при низких концентрациях являются физиологическими модуляторами в митохондриях, регулируя транспорт Ca^{2+} (Richter et al., 1995). АФК участвуют также в лигнификации клеточной стенки, защите растений от микрофлоры (Albert et al., 1986). Перекиси липидов могут выступать в роли аллостерических эффекторов, активируя или ингибируя деятельность некоторых ферментов. Кроме того, ПОЛ - процесс, связанный с изменением структуры мембран и может использоваться клеткой как механизм регуляции активности мембраносвязанных ферментов (Бурлакова, Храпова, 1985). Предполагается, что ПОЛ в интактных клетках принимает участие в транспорте веществ через мембрану (Владимиров, Арчаков, 1972). Стационарность скорости реакций ПОЛ поддерживается антиоксидантными системами. В условиях стресса происходит нарушение равновесия про- и антиоксидантов в клетке.

Многочисленные исследования, проведенные к настоящему времени, не оставляют сомнения в том, что в стрессовых условиях в организме возникают повреждения, связанные с окислительными процессами. Активация реакций ПОЛ наблюдается при стрессах различной природы: интоксикации O_3 , SO_2 , NO_2 , ионизирующей и УФ радиации, авитаминозах, гипер- и гипотермии, гипероксии и гипоксии, засолении, водном дефиците и т.д. (Владимиров, Арчаков, 1972; Козлов, 1973; Иванов и др., 1975; Тарусов, Веселовский, 1978; Меерсон, 1986; Куликов и др., 1988; Мерзляк,

1989; Веселовский, Веселова, 1990; Владимиров и др., 1991; Барабой и др., 1992, Bohnert, Sheveleva, 1998; Gueta-Dahan et al., 1997).

В 50-60х годах были разработаны методы регистрации световых потоков крайне низкой интенсивности. Исследования показали, что окисление ненасыщенных липидов сопровождается свечением. Б. Тарусов и В. Веселовский (1978) регистрировали вспышку свечения при охлаждении растений до температуры ниже 0°C. Ими было установлено, что чем морозоустойчивее организм, тем при более отрицательной температуре возникала вспышка излучения. Работа проводилась на корнях и этиолированных побегах проростков злаков. Ингибитор свободнорадикальных реакций (пропилгаллат) уменьшал интенсивность низкотемпературной вспышки свечения. Окисление липидов мембран во время низкотемпературного стресса связывают с активацией липолитических ферментов (Родионов, 1978), а также с процессами ПОЛ (Белоус, Бондаренко, 1982; Parkin et al., 1989).

В работе В.К. Жирова с соав. (Жиров и др., 1982) показано, что замораживание-оттаивание вызывает в тканях листьев гороха разрушение полиненасыщенных жирных кислот и пигментов, а также накопление малонового диальдегида (МДА). Важно отметить, что у растений акклиматизированных к температуре 10°C по сравнению с растениями, выращенными при температуре 20°C, интенсивность ПОЛ была ниже. Сравнение содержания уровня МДА у растений с различной чувствительностью к низким температурам не выявило накопления МДА у высокоустойчивых растений. Таким образом, эти данные указывают на то, что морозоустойчивость растений может быть связана со способностью клеток препятствовать развитию ПОЛ мембранных липидов.

Рядом исследователей было отмечено, что при действии низких положительных температур на теплолюбивые растения в клетках развивается окислительный стресс (McKersie, 1996; De Santis et al., 1999). Повреждения холодочувствительных растений могут быть сопряжены с активацией ингибитора каталазы, в результате чего в тканях накапливается H₂O₂ (Patterson et al., 1984). Х. Hasselt в 1974 г. также продемонстрировал фотоокислительное повреждение термофильных растений (*Cucumis*) при температуре 1 °C. На свету в клетках происходило разрушение пигментов, полиненасыщенных жирных кислот и увеличение содержания ТБК-

активных продуктов (McKersie, 1996). Т.В. Жигалова с сотр. (Жигалова и др., 1989) связывают повреждение хлоропластов у чувствительного к водному стрессу сорта с активацией ПОЛ.

Активация процессов ПОЛ отмечается и в условиях загрязнения атмосферы. Озон, являясь сильным окислителем, способен реагировать с ненасыщенными липидами и инициировать ПОЛ (Мерзляк, 1989). Некоторые исследователи устанавливают зависимость токсического действия низких концентраций озона с продуктами его распада. Озон, растворяясь в воде, образует свободные радикалы $O_2^{\bullet-}$, HO_2^{\bullet} , HO^{\bullet} и H_2O_2 . Показано, что после 30-ти минутного воздействия озона возрастает содержание МДА в листьях гороха (Веселовский, Веселова, 1990).

Активацию перекисного окисления липидов наблюдали при действии многих гербицидов (Мерзляк, 1989). Токсический эффект гербицида может реализовываться по нескольким механизмам. При обработке растений паракватом происходит быстрое увядание листа, за которым через 24 часа следует некроз. Этот гербицид функционирует, как катализатор в переносе восстановленных эквивалентов к кислороду (McKersie, 1996). Некоторые гербициды участвуют в фотоокислительных процессах, связанных с образованием синглетного кислорода (Мерзляк, 1989; McKersie, 1996).

Для клетки в состоянии стресса характерно увеличение содержания антиоксидантов. При действии УФ радиации в клетках пшеницы накапливается α -токоферол (Веселовский, 1982). Низкие температуры и гипероксия вызывают многократное увеличение концентрации токоферола в тканях эвглены (Ruggeri et al., 1985). Содержание токоферолов в зерне яровой пшеницы увеличивается после воздействия весенних заморозков на 25%, осенних - на 32% (Винтер, 1980). Считается, что устойчивость растений к озону тем выше, чем больше в тканях содержится СОД. Наряду с СОД при фумигации возрастает количество пероксидазы, аскорбатоксидазы (Веселовский, Веселова, 1990). В клетках корня кукурузы в условиях гипотермии также возрастает активность пероксидазы (Акимова, Родченко, 1976). Таким образом, накопление различных антиоксидантов можно отнести к проявлению общей неспецифической защитной реакции клетки (Куликов и др., 1988). Ряд авторов отводят активации ПОЛ роль ключевого звена в патогенезе стресса (Барабой, 1991; Барабой и др., 1992). В связи с этим рассматривают

три последовательные фазы стресс-реакции, соответствующие классическим. Во время первой фазы (фаза тревоги) происходит резкая активация липопероксидации. На второй стадии реакции стабилизируется про- и антиокислительное равновесие на уровне, близком к исходному. Ее можно охарактеризовать как стадию резистентности, в ходе которой снижается интенсивность ПОЛ за счет увеличения антиоксидантных ресурсов. Для третьей фазы реакции типична вторичная индукция ПОЛ и соответствующее снижение суммарной антиоксидантной активности. Эту стадию стресса можно рассматривать как проявление определенного истощения антиоксидантных ресурсов.

8 ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В МИТОХОНДРИЯХ

Несмотря на доказанную универсальность механизма ПОЛ в биологических мембранах, обнаружены некоторые отличия этого процесса в разных клеточных органеллах. По мнению Ю.А. Владимирова и А.И. Арчакова (Владимиров, Арчаков, 1972), они обусловлены в основном особенностями структурно-функциональной организации мембран этих органелл.

Митохондрии являются «энергетическими станциями», обеспечивающими клетки энергией, необходимой для их функционирования. Это обязательные органеллы эукариотических клеток. Они образованы двумя мембранами, разделенными межмембранным пространством. В матриксе митохондрий содержатся ДНК, рибосомы, ферменты цикла Кребса, β -окисления, а также ферменты, обеспечивающие синтез белков и репликацию генетического материала митохондрий (Войников и др., 1991; Douce, 1985). В этих органеллах осуществляется окислительное фосфорилирование, в результате чего в ходе окисления субстратов (например, НАДН или сукцината) образуется АТФ. Внешняя мембрана отделяет внутреннюю часть митохондрий от цитоплазмы. Она гладкая, не имеет складок и перегибов, содержит ферменты и белки, образующие неспецифические поры, способные пропускать вещества с молекулярной массой не более 10 кДа. Внутренняя мембрана имеет большое число складок - крист. Она проницаема только для воды и небольших нейтральных молекул, но непроницаема для катионов K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , анионов Cl^- , Br^- , NO_3^- , сахаров и большей части аминокислот, а

также для НАД⁺, НАДФ⁺, НАДН, НАДФН, для нуклеотид-5'-моно-, ди- и трифосфатов, коэнзима А и его эфиров (Douce, 1985). Во внутренней мембране митохондрий локализованы дыхательные цепи и АТФ-синтетаза. Этот ферментный комплекс функционирует как окислительно-восстановительная протонная помпа (Войников, 1987; Войников и др., 1991).

Дыхательная цепь митохондрий растений и животных имеет сходную организацию, основные отличия касаются цианид (CN⁻)-резистентного пути переноса электронов и строения НАДН-дегидрогеназного сегмента дыхательной цепи. Растительные митохондрии способны окислять как эндогенный, так и экзогенный НАДН (Douce, 1985). Все переносчики электронов в митохондриях сгруппированы в четыре комплекса.

Комплекс I осуществляет перенос электронов от НАДН к убихинону. Он содержит ротенончувствительную НАДН-убихинон-оксидоредуктазу. В его состав входят ФМН и железо-серные центры. Согласно современным данным на поверхности внутренней мембраны локализована ротенон-нечувствительная НАДН-дигидрогеназа (Palmer, Ward, 1985). Благодаря деятельности этой «внешней» НАДН-дегидрогеназы растительные митохондрии способны напрямую окислять цитозольные НАД(Ф)Н. Митохондрии животных используют для этой цели челночные механизмы, работающие с затратой энергии (Douce, 1985).

Комплекс II (сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза) осуществляет транспорт электронов от сукцината к убихинону. В его состав входят ФАД и три железо-серных центра. Перенос электронов на данном этапе ингибируется малонатом и оксалоацетатом; активируется сукцинатом, АТФ, АДФ, НАДН и др. агентами. Имеются сведения, что торможение активности сукцинатдегидрогеназы оксалоацетатом, появляющееся после 2-6-ти часового охлаждения, выступает в качестве одного из механизмов, позволяющих растениям адаптироваться к действию низких температур (Войников, 1987).

Комплекс III (убихинон-цитохром *c*-оксидоредуктаза) переносит электроны от восстановленного убихинона к цитохрому *c*. Его структурная организация в митохондриях растений изучена пока слабо. Известно, что в его состав входят цитохромы *b*₅₆₀ и *b*₅₆₆, цитохром *c*₁ и железо-серный белок Риске. Этот комплекс чувствителен к антимицину А (Шугаев, 1991).

В терминальном комплексе IV (цитохром *c*-оксидаза) электроны переносятся от цитохрома *c* к кислороду. Он содержит два цитохрома - α и α_3 , а также два атома меди. Цитохром *c*-оксидаза блокируется цианидом, азидом. Известно, что у растений и грибов, в отличие от животных, имеется альтернативный путь переноса электронов, который называется цианид-резистентным дыханием (Шугаев, 1991). Оно обусловлено активностью цианид-резистентной оксидазы (альтернативная оксидаза). Предполагается, что местом ответвления альтернативной оксидазы от основной дыхательной цепи является убихинон, и в ее состав входит медь-содержащий флавопротеид. Перенос электронов по этому пути не сопровождается фосфорилированием (Войников и др., 1991; Шугаев, 1991).

Согласно одной из гипотез о механизме переноса протонов в дыхательной цепи (модель петель) выброс протонов из матрикса происходит в результате транспорта электронов между переносчиками H-атомов и чисто электронными переносчиками. К атомным переносчикам относят ФМН, убихинон, цитохром *c*-оксидазу. По теории Митчелла электрохимический трансмембранный потенциал ионов водорода является источником энергии для синтеза АТФ за счет обратного тока протонов через канал мембранной АТФ-синтетазы (Скулачев, 1989).

Таким образом, большая часть кислорода в митохондриях восстанавливается цитохромоксидазой в митохондриальной электронно-транспортной системе с образованием воды. Митохондрии растений имеют дополнительный сайт восстановления кислорода на альтернативной оксидазе, отличающейся от цитохром оксидазы ее резистентностью к цианиду. Считалось, что ни один из этих сайтов не образует значительное количество супероксида (Rich, Bonner, 1978). Действительно, в нормально функционирующих митохондриях освобождение АФК во время восстановления кислорода цитохром *c* оксидазой не происходит в связи с его высоким сродством с цитохромом *c* (Turrens, 1997). Ввиду этого образование супероксида путем моноэлектронного восстановления кислорода на уровне цитохром *c* оксидазы незначительно. Однако в последнее время получено значительное количество данных, свидетельствующих о том, что митохондрии постоянно генерируют супероксид и перекись водорода (1-2% от общего потребления кислорода

дыхательной цепи митохондрий) (Скулачев, 1998; Richter et al., 1995; Turrens, 1997; Liu, 1997; Kowaltowski, Vercesi, 1999). Генерация этой активной формы кислорода происходит при участии НАДН-дегидрогеназы (Turrens, Boveris, 1980), флавопротеина (комплекс I) и частично убихинона и цитохрома *b* (комплекс III) (Cadenas et al., 1977) (рис. 10). В нормально функционирующей дыхательной цепи электроны переносятся от НАДН к окисленной форме убихинона, при этом получают восстановленные формы убихинона. Эта форма затем передает электроны на цитохром *c* оксидазу и превращается обратно в окисленную форму, проходя через форму свободного радикала - аниона семихинона ($UQ^{\bullet-}$). Этот процесс вначале происходит на цитоплазматической поверхности внутренней митохондриальной мембраны, а затем повторяется на матриксной поверхности мембраны. Антимитин А, который блокирует электронный поток после убихинона, усиливает восстановление кислорода (Rustin et al., 1984). При этом антимитин А блокирует образование $UQ^{\bullet-}$ на матриксной поверхности мембраны, что вызывает аккумуляцию $UQ^{\bullet-}$ на ее цитоплазматической поверхности. Вероятно, другие условия, которые увеличивают восстановление убихинона, также благоприятствуют восстановлению кислорода в районе цепи убихинон - цитохром *b* (Rich, Bonner, 1978). Имеются данные, что образование митохондриями АФК в присутствии ротенона, который переводит НАДН-дегидрогеназу в постоянно восстановленное состояние, значительно стимулируется при добавлении сукцината, восстанавливающего убихинон (Kowaltowski et al., 1995). Разные Fe-S белки и НАДН- дегидрогеназа также вовлечены как возможные сайты образования супероксида и перекиси водорода (Turrens, Boveris, 1980; Turrens et al., 1982). В митохондриях, обладающих высокой интенсивностью цианид-резистентного дыхания, эффективность образования $O_2^{\bullet-}$ может достигать значительных величин (10% от общего потребления кислорода у аронника пятнистого) (Rustin et al., 1984).

Таким образом, в митохондриях имеется все необходимое для протекания процессов ПОЛ: источники активного кислорода, субстраты перекисного окисления - ненасыщенные жирные кислоты митохондриальных мембран. В митохондриях присутствует железо в геминной и негеминной форме. Следовательно, в условиях, когда генерация супероксида митохондриями возрастает, либо когда ослаблены

антиоксидантные системы, в органеллах может накапливаться H_2O_2 , и это приведет к возникновению окислительного стресса. В данной ситуации H_2O_2 может реагировать с митохондриальным Fe^{2+} , образуя высокоактивный радикал гидроксида (HO^\bullet) путем реакции Фентона (Sutton, Winterbourn, 1989; Halliwell, Gutteridge, 1989).

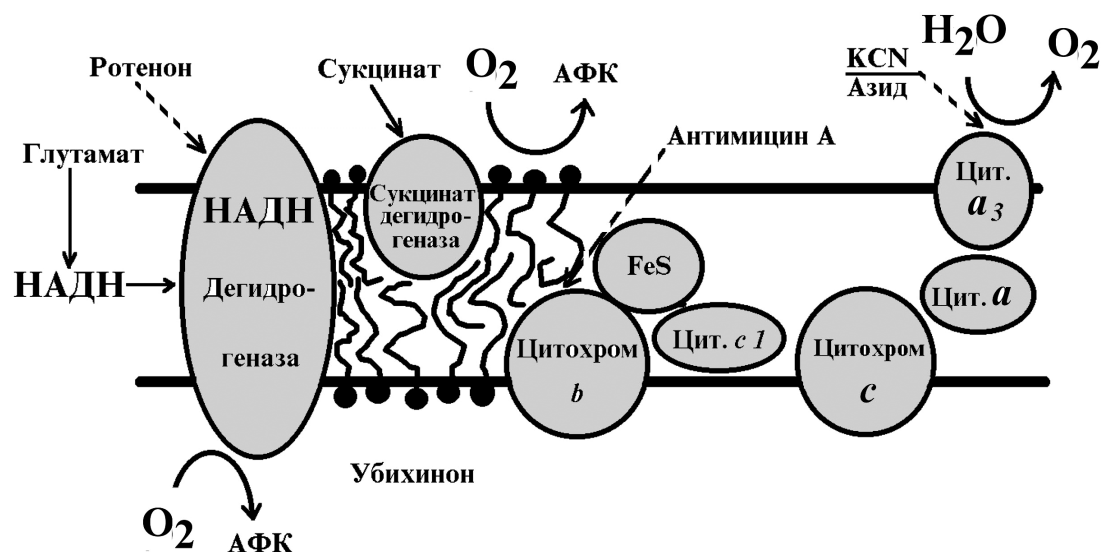


Рис. 10 Генерация активных форм кислорода митохондриями. Основной источник АФК в митохондриях – электронтранспортная цепь, локализованная во внутренней митохондриальной мембране (по Chakraborti et al., 1999).

При физиологических условиях, кроме геминового железа и железа в форме FeS-белков, в митохондриях содержится еще приблизительно 1.7 нмоль Fe на 1 мг митохондриального белка. Это железо хелатировано такими веществами, как АТФ, АДФ, ГТФ и цитрат (Tangeras et al., 1980). Эти низкомолекулярные комплексы железа способны инициировать процесс ПОЛ в митохондриальной мембране и, как предполагается, принимают участие в механизмах повреждения клетки во время различных стрессовых и болезненных состояний (Bacon, Britton, 1990). В последнее

время изучение этих низкомолекулярных комплексов железа, особенно Fe(II)-цитрата и Fe(II)-АТФ привлекают значительное внимание исследователей, поскольку установлено их присутствие в матриксе в различных физиологических, стрессовых и болезненных состояниях (Bacon, Britton, 1990; Minotti, Aust, 1987; Halliwell, Gutteridge, 1990). Установлено, что механизм, при помощи которого происходит индукция ПОЛ этими низкомолекулярными комплексами железа, требует наличия микромолярных концентраций Ca^{2+} (Hermes-Lima et al., 1995; Halliwell, Gutteridge, 1989; Castilho et al., 1994; Castilho et al., 1995b). В то же время имеются данные, свидетельствующие о том, что генерация АФК в данном случае не зависит от функционирования дыхательной цепи митохондрий (Castilho et al., 1995a). Процессы ПОЛ в митохондриях, индуцированные низкомолекулярными комплексами железа, вызывают изменения в спектрах мембранных белков, в частности, исчезновение белков с мол. массами 65 и 116 кДа и образование ряда дополнительных полос, по-видимому, из-за образования шиффовых оснований между продуктами ПОЛ и аминными группами белков (Castilho et al., 1994).

Свободнорадикальные продукты ПОЛ и карбонильные соединения, например, малоновый диальдегид, обладают сильным повреждающим действием на митохондриальный геном. С эффектом именно этих соединений связывают нарушения структуры и экспрессии митохондриального генома растений в условиях *in vivo* (Константинов и др., 1989а,б).

Продукты ПОЛ способны вызывать увеличение неспецифической протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий. Их относят к эффективным природным разобщителям (Владимиров, Арчаков, 1972). Активация процессов ПОЛ в митохондриях может вызвать нарушение окислительного фосфорилирования, поскольку эффект процесса синтеза АТФ зависит от структурной целостности внутренней мембраны (Kowaltowski, Vercesi, 1999).

Длительное протекание ПОЛ при стимуляции железом в митохондриях приводит к образованию так называемых «митохондриальных теней». Такие частицы не имеют дыхательного контроля и не способны к окислительному фосфорилированию (McKnight et al., 1965). Поврежденные митохондрии теряют барьерную функцию и

способность накапливать ионы кальция. Ионы Ca^{2+} активируют многие внутриклеточные процессы, например, повышают активность мембранных фосфолипаз (Kowaltowski et al., 1999; Grijalba et al., 1999; Kavanagh et al., 2000). Это приводит к накоплению свободных жирных кислот и лизофосфатидов, нарушающих структурную организацию липидных и белковых комплексов в мембранах, что в свою очередь увеличивает интенсивность ПОЛ. В результате недостатка энергии может наступить гибель клетки.

В митохондриях высших растений, так же, как и в митохондриях животных, выделяют три системы ПОЛ: неферментативные реакции, активируемые аскорбатом, ферментативные НАДН- и НАДФН-зависимые реакции (Константинов и др., 1989а). Максимальная скорость накопления МДА в растительных митохондриях наблюдалась при концентрации ионов железа Fe^{3+} 20 мкМ. В экспериментах с изолированными митохондриями проростков кукурузы было показано, что прооксидантное действие Fe^{3+} усиливается при добавлении их к суспензии митохондрий в комплексе с аденозиндифосфатом (Константинов и др., 1989б).

При изучении зависимости скорости перекисного окисления от концентраций аскорбата, НАДН, НАДФН установлено, что при одинаковых концентрациях восстановителей (1 мМ) скорость реакций пиридиннуклеотид-зависимого ПОЛ в 3-4 раза превышала таковую для аскорбат-зависимого процесса. Системы ПОЛ митохондрий растений отличаются также отношением к ингибиторам. Неферментативная система ПОЛ проявляет высокую чувствительность к ЭДТА и ионолу. НАДН-зависимое ПОЛ чувствительно к цианиду; ионол в этой системе вызывал значительное ингибирование процесса при более низких концентрациях, чем в опытах с ферментативной системой (Константинов и др., 1989б).

В связи с тем, что в митохондриях в физиологических условиях постоянно происходит генерация супероксида, митохондрии обладают эффективной собственной антиоксидантной системой, имеющей в своем составе супероксид дисмутазу, глутатион пероксидазу, глутатион редуктазу, глутатион, НАД(Ф)Н-трансгидрогеназу, НАД(Ф)Н, витамин Е и С (Sutton, Winterbourn, 1989; Halliwell, Gutteridge, 1989), тиол пероксидазы, такие как SP-22 (Watabe et al., 1997), и собственно митохондриальное дыхание (Guidot et al., 1995).

Уровень генерации митохондриями супероксида изменяется в зависимости от многих физиологических или стрессовых условий (Turrens, 1997). Как отмечалось выше, образование АФК усиливается при восстановлении убихинона в присутствии антимицина А (Turrens et al., 1985; Kowaltowski et al., 1995; Korshunov et al., 1997). Быстрое изменение редокс-состояния убихинона также стимулирует образование АФК митохондриями (Korshunov et al., 1997). Хотя разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях обычно уменьшает образование ими АФК, при некоторых специфических условиях оно может возрасти. Например, протонофоры усиливают генерацию АФК при ингибировании дыхательной цепи антимицином А (Boveris, Chance, 1973; Cadenas, Boveris, 1980) или в том случае, когда в митохондриях заингибирован Ca^{2+} унипортер и блокированы потоки кальция (Kowaltowski et al., 1996a,b). С другой стороны, протонофоры и такие разобщающие белки как UCP млекопитающих, PUMP растений и альтернативная оксидаза растений способны при своем функционировании уменьшать образование АФК митохондриями (Boveris, Chance, 1973; Korshunov et al., 1997; Negre-Salvayre et al., 1997; Popov et al., 1997; Kowaltowski et al., 1998). Этот факт может быть объяснен тем, что разобщение окисления и фосфорилирования усиливает митохондриальное дыхание, уменьшает время жизни радикала семихинона и, следовательно, вероятность образования супероксида за счет передачи электрона от радикала семихинона на кислород (Skulachev, 1996).

Поскольку внутренняя мембрана митохондрий содержит большое количество (до 75% от общего содержания) белков, то считается, что они являются одной из первичных мишеней АФК в митохондриях (Kowaltowski, Vercesi, 1999). Действительно, тиоловые группы мембранных белков подвержены сильному окислению в условиях Ca^{2+} индуцированного митохондриального окислительного стресса (Castilho et al., 1995a,b; Kowaltowski et al., 1996a,b).

В присутствии ионов Ca^{2+} окислительные повреждения в белках внутренней митохондриальной мембраны вызывают явление неспецифической проницаемости внутренней митохондриальной мембраны вследствие открытия пор (англ. транскрипция: “mitochondrial permeability transition” - MPT) (Gunter et al., 1994; Zoratti, Szabo, 1995;

Vercesi et al., 1997). Это явление характеризуется прогрессирующим увеличением проницаемости внутренней митохондриальной мембраны, которая последовательно становится проницаемой для протонов, ионов, осмотиков и даже небольших белков (Zoratti, Szabo, 1995; Vercesi et al., 1997). Убедительное доказательство тому, что МРТ может быть прямой причиной апоптоза, представлено Р. Petit с соавторами (1996). Они показали, что индукция МРТ приводит к высвобождению из межмембранного пространства находящегося там белка, «фактора индукции апоптоза». Этот белок вызывает при добавлении апоптотические изменения в изолированных ядрах и также, в свою очередь, способен вызывать МРТ (Susin et al., 1997). Таким образом, индуцированный МРТ апоптозис может быть одним из механизмов защиты клетки от выработки избыточных количеств АФК (Скулачев, 1998; Negre-Salvayre et al., 1997; Skulachev, 1998).

Таким образом, на основании имеющихся к настоящему времени данных можно считать, что, прежде всего, митохондрии растений во время низкотемпературного стресса являются одним из основных источников АФК, вызывающих окислительные повреждения мембранных липидов, белков и нуклеиновых кислот. При этом во время низкотемпературного стресса генерируемые митохондриями АФК могут принимать участие в апоптозе. В то же время в митохондриях имеются мощные антиокислительные системы, позволяющие растительной клетке регулировать образование АФК и, вследствие этого, контролировать интенсивность процессов ПОЛ. Одной из этих систем являются недавно открытые в растениях митохондриальные разобщающие белки.

9 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, за прошедшие с открытия стрессовых белков растений годы достигнут несомненный прогресс. К настоящему времени точно установлено, что, как ответ растительного организма на низкотемпературный стресс, так и формирование закаленного состояния растения начинается непосредственно с момента начала охлаждения и протекает при участии определенных белков. Кроме значительного числа вовлеченных в эти процессы ферментов, к настоящему времени выделено несколько семейств белков, специфически связанных с этими процессами. Это шапероны и дегидрины, антифризные белки, многофункциональные белки, регулирующие процессы трансляции и транскрипции и белки, разобщающие во время низкотемпературного стресса окисление и фосфорилирование.

Установлено, что синтез этих белков контролируется в большинстве случаев ядерными генами, экспрессия которых индуцируется во время низкотемпературного стресса и закаливания и определяется его условиями. Большинство изученных к настоящему времени стрессовых белков являются водорастворимыми и локализованы в цитоплазме, ядерном, митохондриальном и хлоропластном матриксах. Несколько меньше имеется данных о синтезе в этих условиях мембранных белков, хотя большая роль мембран в развитии холодостойкости растительных клеток очевидна и позволяет предполагать значительные изменения в мембранных белках при гипотермии. Имеющиеся в литературе данные о влиянии низкотемпературного стресса на мембраны касаются, в основном, липидной фазы мембран. Белок-липидные взаимодействия в мембранах во время низкотемпературного стресса также относительно слабо изучены.

Только в последние десятилетия начинают интенсивно изучаться механизмы индукции экспрессии генов при гипотермии и специфичность этих генов и кодируемых ими белков. Исследования в данной области в настоящее время интенсивно проводятся во всем мире. Особенно интенсивно эти исследования проводятся в связи с проводимым в настоящее время полным сиквенсом генома арабидопсиса и некоторых других растений. В то же время необходимо отметить, что исследования

экспрессии генов во время низкотемпературного стресса проводятся несистематически, в основном они заключаются в установлении факта индукции экспрессии отдельного гена или семейства генов либо увеличении содержания отдельного стрессового белка. Практически не исследуется взаимосвязь между индукцией отдельных генов или их семейств, в проводимых исследованиях отсутствует комплексный подход к изучаемому явлению. Только в самое последнее время начинают создаваться «генные сети», связывающие воедино описание экспрессии различных генов в определенных условиях. Данный подход к исследованиям чрезвычайно перспективен и позволяет надеяться на создание в дальнейшем генной сети, описывающей комплексный ответ генома растения на низкотемпературный стресс.

Необходимо отметить, что, хотя и имеются отдельные гипотезы о биохимических механизмах участия индуцируемых низкой температурой белков в процессах развития холодоустойчивости растений, о роли конкретных белков, за исключением представителей нескольких семейств белков, таких, как дегидрины, антифризные белки и некоторые другие, в этих процессах мало что известно. Только в самые последние годы становится понятно, что у растений существуют такие биохимические механизмы защиты от низкотемпературного стресса, которые, как считалось раньше, имеются только у животных. В частности, такими механизмами являются синтез в ответ на низкотемпературный стресс у злаков антифризных белков, выполняющих функцию сходную с той, которую, как было установлено еще в 60-е годы, эти белки выполняют у антарктических рыб. В самые последние годы установлено также наличие в растениях разобщающих белков, вызывающих термогенез в растительных митохондриях, хотя ранее такой механизм защиты от низкотемпературного стресса считался прерогативой теплокровных животных.

В связи с этим необходимо отметить, что обнаружение у растений белков, разобщающих окисление и фосфорилирование в митохондриях, объясняет ранее установленный факт термогенеза в холодоустойчивых озимых злаках во время низкотемпературного стресса (Vojnikov et al.,

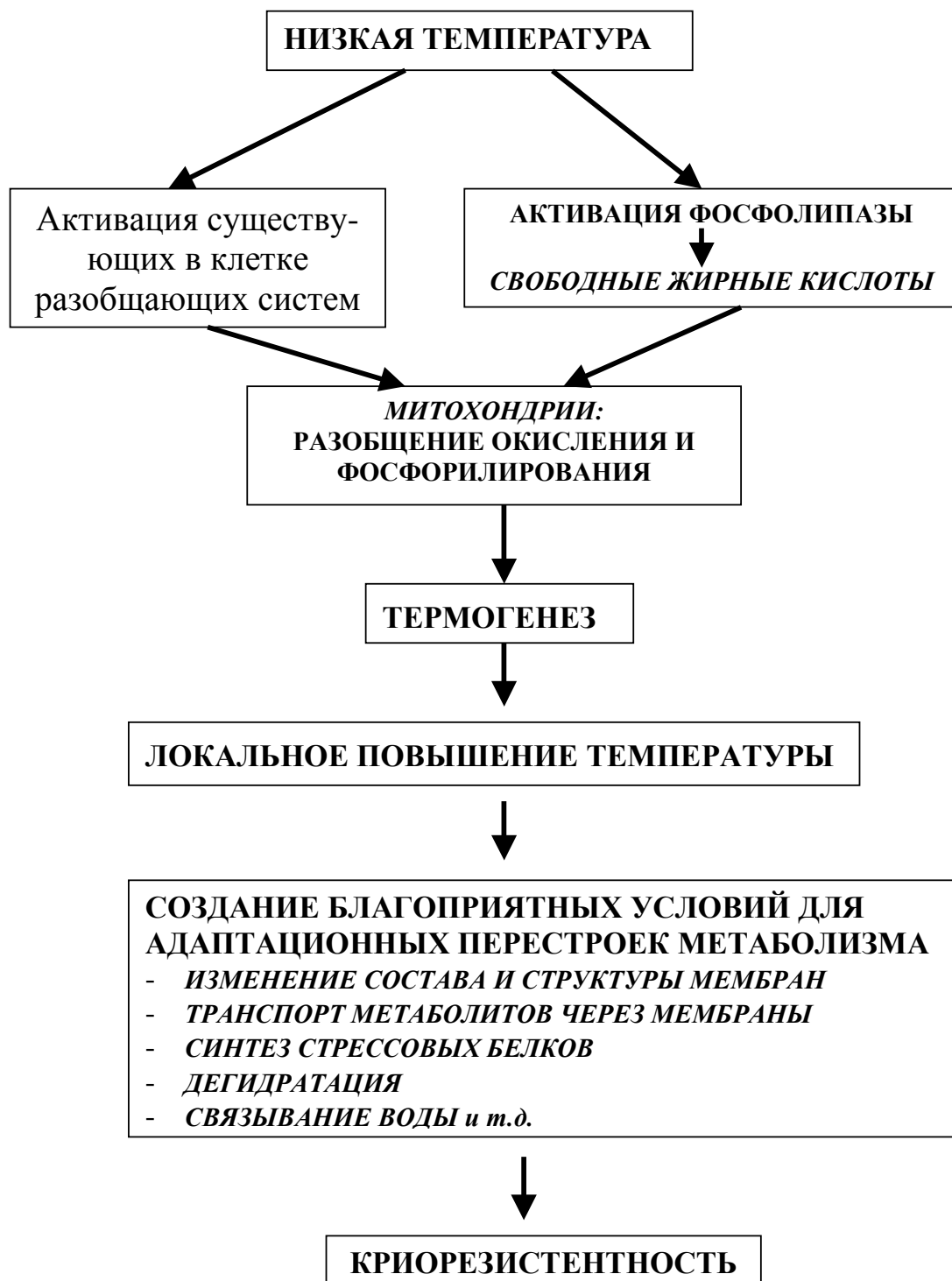


Рис. 11. Схема реакции незакаленного растения на быстрое снижение температуры.

1983). Наличие у злаков трех термогенных систем, связанных с разобщением окисления и фосфорилирования в митохондриях, в проростках холодоустойчивых озимых злаков, по-видимому, связано с особенностями их жизненного цикла, поскольку они вынуждены переживать осенние и весенние заморозки, когда температура в течение короткого промежутка времени падает до 0 °С и даже ниже. Озимые злаки имеют многочисленные защитные системы, которые позволяют им во время холодового шока эффективно выкачивать воду из цитоплазмы в апопласт и, следовательно, избегать образования кристаллов льда внутри их клеток, а также много других защитных систем, связанных с синтезом различных классов стрессовых белков. Тем не менее, для активации всех этих систем во время низкотемпературного стресса необходимо определенное время. В этом случае быстрое разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях и связанный с этим процессом термогенез позволяет растению выиграть время, необходимое для активации этих систем. В связи с этим присутствие трех термогенных систем у озимых злаков является приспособлением к озимому образу жизни и способом защиты от заморозков и переохлаждения.

В целом, имеющиеся к настоящему времени результаты позволяют утверждать, что митохондриальные разобщающие белки принимают участие в защите незакаленных растений от холодового шока – быстрого снижения температуры (Рис. 11). При этом происходит в первую очередь активация существующих систем (альтернативной оксидазы, митохондриального разобщающего белка PUMP за счет увеличения количества свободных жирных кислот и стрессового белка БХШ 310 за счет перехода из неактивной в активную форму), вызывающих термогенез и локальное повышение температуры. Это повышение температуры позволяет растениям выиграть время для адаптационной перестройки метаболизма – изменению состава и структуры мембран, транспорту необходимых метаболитов через мембраны, синтезу стрессовых белков (в том числе разобщающих белков), дегидратации клетки и т.д., что позволяет растению адаптироваться к воздействию низкой температуры. В то же время у закаленных к действию низкой температуры растений адаптационная перестройка метаболизма уже проведена, в связи с чем им

нет необходимости тратить энергетические ресурсы организма на повышение температуры растения.

Таким образом, к настоящему времени выделены и охарактеризованы три новых типа стрессовых белков растений – антифризные белки, предохраняющие клетки растений от повреждения кристаллами льда, молекулярные шапероны и дегидрины, предохраняющие макромолекулы от повреждения во время низкотемпературного стресса, и стрессовые разобщающие белки, позволяющие растениям поддерживать во время низкотемпературного стресса в течение некоторого времени положительную температуру, что позволяет растению подготовиться к последующему действию отрицательной температуры. Изучение разобщающих растительных белков представляет также значительный интерес в связи с теоретической возможностью использования их в качестве медицинских препаратов для регуляции энергетического обмена.

Монография подготовлена при поддержке грантов РФФИ 00-04-48093; 01-04-48953 и 02-04-06096.

10 ЛИТЕРАТУРА

Авхадиева Г.И., Карасев Г.С., Хохлова Л.П. Влияние холодового закаливания и криостресса на полипептидный состав митохондрий озимой пшеницы // Казан. ун-т.- Казань, 1993. 14 С.:ил. Библиогр.: 11 назв. Рус. ДЕП. в ВИНТИ 27.01.93, N181-B93

Авхадиева Г.И., Хохлова Л.П., Карасев Г.С. Состав полипептидов митохондрий озимой пшеницы при адаптации к низким температурам // Физиология растений. 1995. Т. 42, N1. С. 100-106.

Азарашвили Т.С., Кудин А.П., Полтева Н.А., Кудзина Л.Ю., Евтодиенко Ю.В. Полипептидный состав субмитохондриальных фракций нормальной ткани печени и гепатомы Зейделя // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 833 - 841.

Акимова Г.П., Родченко О.П. Изменение активности пероксидазы в клетках корня кукурузы в условиях низкой температуры // Физиолого-биохимические аспекты устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды. Иркутск, 1976. С. 4-5.

Бабенко В.И., Нигрецкая М.Л. Электрофоретические спектры белков озимой пшеницы при закаливании и промораживании //Докл. ВАСХНИЛ. 1971. N 5. С.7-9.

Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи современной биологии, 1991. Т.111. Вып. 6. С. 66-78.

Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992. 148 с.

Барашкова Э.А. Изменение электрофоретического спектра растворимых белков озимой пшеницы в период перезимовки // Бюл. Всесоюз. ин-та растениеводства. 1971. Вып.20. С. 21-23.

Барашкова Э.А. Динамика компонентного состава легкорастворимых белков и изоферментов некоторых ферментов озимой пшеницы после промораживания // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. 1979. Т.64, N3. С.147-153.

Белерадек Я. Межмолекулярные аспекты структурной стабильности протоплазмы при экстремальных температурах.// В кн.: Клетка и температура среды. Тр. Междунар. симпозиума по цитоэкологии: "Роль

клеточных реакций в приспособлении многоклеточных организмов к температуре среды" (Ленинград, 31 мая-5 июня 1963 г.) / М.-Л. 1964. С. 289-295.

Беличенко Н.И., Грязина Т.И. Некоторые стороны метаболизма белков зимостойких и слабозимостойких пшениц // Изв. Сев.-Кавк. науч. центра высш. шк. Естеств. науки. 1980. N4. С. 86-88.

Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. Киев, 1982. 255 с.

Боровский Г.Б., Войников В.К. Локализация низкомолекулярных белков теплового шока на поверхности и внутри митохондрий кукурузы // Физиология растений. 1993. Т. 40. N4. С. 596-598.

Браун Г.Н. Механизм белкового синтеза в связи с морозостойкостью растений // Холодостойкость растений. М.: Колос, 1983. С. 124-131.

Буколова Т.П., Воловик Н.В., Кравцова Л.И. Изменение жирнокислотного состава фосфолипидов узлов кущения озимых злаков в процессе закаливания // Физиол. и биохим. культ. раст. 1992. Т. 24, №1. С. 69 – 73.

Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии, 1985. Т. LIV. Вып. 9. С. 1540-1558.

Васильев И.М. Как зимуют растения. М.: Колос, 1970. 156 с.

Веселовский В.А. О роли биоантиоксидантов в устойчивости растений к неблагоприятным условиям существования // Биоантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии. М.: Наука, 1982. С. 150-162.

Веселовский В.А., Веселова Т.В. Люминесценция растений. М.: Наука, 1990. 201 с.

Винтер А.К. Содержание стерина, жирных кислот и токоферолов в зерне яровой пшеницы в зависимости от действия заморозков в ранние фазы онтогенеза // Физиология устойчивости растений к низким температурам и заморозкам. Иркутск, 1980. С. 142-147.

Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в растительных мембранах // М., 1972. 252 с.

Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В., Осипов А.Н., Рошупкин Д.И. Свободные радикалы в живых системах. // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика / ВИНТИ, 1991. Т. 29. С. 1-252.

Вовчук С.В., Макаренко О.А., Мусич В.Н., Левицкий А.П. Возможные механизмы активации пептид-гидролаз проростков озимой пшеницы при закаливании // Физиология растений. 1994. Т.41, № 4. С. 494 - 499.

Войников В.К. Последствие охлаждения на функциональную активность митохондрий пшеницы, пырея и пшенично-пырейных гибридов // Физиология растений. 1978. Т. 25, N 4. С. 761-766.

Войников В.К. Участие свободных жирных кислот в регуляции митохондриальной активности у озимой ржи при охлаждении // Физиол. и биохим. культ. раст. 1980. Т. 12, № 5. С. 474-479.

Войников В.К. Температурный стресс и митохондрии растений. Н.: Наука. Сиб. Отд-ние, 1987. 136 с.

Войников В.К. Стрессовые белки растений при действии высокой и низкой температуры // Стрессовые белки растений. Новосибирск: Наука. 1989. С 5-20.

Войников В.К., Бурбанова Р.С. Синтез белка в проростках озимой ржи при низкой температуре // Изв. Сиб. отд-ния АН СССР. Сер. Биолог. 1981. Т. 2, N 10. С. 38-41.

Войников В.К., Грабельных О.И., Колесниченко А.В., Побежимова Т.П. Белок холодового шока 310 кД разобщает окислительное фосфорилирование в растительных митохондриях// Физиология растений, 2001а, Т. 48, № 1, С. 89-94.

Войников В.К., Грабельных О.И., Побежимова Т.П., Корзун А.М., Сумина О.Н., Турчанинова В.В., Колесниченко А.В. Стрессовый разобщающий растительный белок БХШ 310 индуцирует термогенез в митохондриях пшеницы при гипотермии in vitro // ДАН, 2001б, Т. 377, N 4, с. 565-567.

Войников В.К., Грабельных О.И., Побежимова Т.П., Корзун А.М., Турчанинова В.В., Колесниченко А.В. Влияние различных термогенных систем митохондрий на температуру проростков озимой пшеницы во время холодового шока// ДАН, 2001в, Т. 378, N 5, с.700 -702.

Войников В.К., Корзун А.М. Температура тканей побегов озимой пшеницы при холодовом шоке // Известия СО АН СССР, Сер. биол. 1984. № 2. С. 22 – 25.

Войников В.К., Колесниченко А.В., Побежимова Т.П., Варакина Н.Н. Первая и шестая хромосомы D-генома озимой мягкой пшеницы контролируют экспрессию белка холодового шока с молекулярной массой 310 кД // Физиология растений. 1998. Т. 45, № 5. С. 688 – 692.

Войников В.К., Константинов Ю.М., Негрук В.И. Генетические функции митохондрий растений. Новосибирск: Наука, 1991. 183 с.

Войников В.К., Корытов М.В. Синтез стрессовых белков в проростках озимой пшеницы при закаливании к холоду // Физиология растений. 1991. Т. 38, N 5. С. 960 - 969.

Войников В.К., Корытов М.В. Низкотемпературная индукция синтеза стрессовых белков в клетках озимой пшеницы // 3 съезд Всерос. об-ва физиологов растений (24-29 июня, 1993 г., Санкт-Петербург): Тез. докл. СПб, 1993. С. 518.

Войников В.К., Лузова Г.Б., Кравец В.С. Разобщающее действие свободных жирных кислот при «старении» изолированных митохондрий пшеницы // Известия СО АН СССР. 1983. №5. С. 81-85.

Войников В.К., Побежимова Т.П., Варакина Н.Н., Жиров Е.Г. Влияние отдельных хромосом морозоустойчивой мягкой пшеницы на морозоустойчивость растений и энергетическую активность митохондрий при гипотермии // Генетика. 1987. Т. 23, N2. С 287-294.

Войников В.К., Рудиковский А.В., Побежимова Т.П., Варакина Н.Н. Влияние белков, выделенных из проростков кукурузы после теплового шока, на энергетическую активность митохондрий кукурузы // Физиология растений. 1988. Т. 35, № 5. С. 837-840.

Войников В.К., Федотова В.Д., Усова Т.К. Влияние отдельных хромосом генома X пырея на активность митохондрий дополнительных линий пшенично-пырейных гибридов // Генетика. 1979. Т. 15, N1. С. 103-108.

Гималов Ф.Р., Вахитов В.А., Чемерис А.В. Индукция белков холодового шока у пшеницы // Генет. механизмы устойчивости раст. к неблагоприят. факторам среды: Тез. сообщ., Иркутск. 8-12 июля, 1991. Новосибирск, 1991. С. 90.

Гималов Ф.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Специфичность синтеза белков холодого шока в проростках отдельных представителей трибы *Triticeae* семейства злаковых // Физиология растений. 1996. Т. 43, N 2. С.262-266.

Гриф В.Г. О возможности синтеза нуклеиновых кислот и белка при низких температурах // Цитология. 1966. Т.8, N5. С.659 -661.

Джанумов Д.А., Кузаян Р.С. Электрофоретический спектр белков мембран хлоропластов контрастных по морозоустойчивости сортов озимой пшеницы // Физиология растений. 1987. Т. 34, N. 2. С.365-372.

Дроздов С.Н., Сычева З.Ф., Будыкина Н.П., Курец В.К. Эколого-физиологические аспекты устойчивости растений к заморозкам. Ленинград: Наука.- 1977.- 228 с.

Дунаева М.В., Бочарова М.А., Клячко Н.Л. Белковый состав и трансляционная активность полисом, выделенных из проростков пшеницы и ржи в условиях холодого стресса // 3 съезд Всерос. об-ва физиологов растений (24-29 июня, 1993 г., Санкт-Петербург): Тез. докл. СПб, 1993а. С. 20.

Дунаева М.В., Бочарова М.А., Клячко Н.Л. Влияние холодого стресса и закаливания на полисомы проростков озимых злаков // Физиология растений. 1993б. Т. 40, №4. С. 599 - 606.

Жибоедов П.М., Руденко С.М., Писаренко Г.Г. Электрофоретические спектры малатдегидрогеназы многолетних злаковых растений // Физиол. адаптогенеза раст. на Крайнем Севере / РАН. Кол. науч. центр. Поляр.-альп. ботан. сад-ин-т. Апатиты, 1994, С. 45-54.

Жигалова Т.В., Тукеева М.И., Чивкунова О.Б., Мерзляк М.Н. Влияние водного дефицита на липиды и жирные кислоты хлоропластов проростков пшеницы сортов Саратовская 55 и Лютесценс 1848 // Вестник МГУ. 1989. №1. С. 29-35.

Жиров В. К., Мерзляк М. Н., Кузнецов Л. В. Перекисное окисление мембранных липидов холодостойких растений при повреждении отрицательными температурами. // Физиология растений. 1982. Т. 29. N 6. С. 1045-1053.

Зыкова В.В., Грабельных О.И., Владимирова С.В., Королева Н.А., Колесниченко А.В., Войников В.К. Стрессовый разобщающий белок БХШ

310 индуцирует перекисное окисление липидов в митохондриях пшеницы при гипотермии // Доклады РАН. 2000. Т. 372. № 4. С. 562-564.

Иванов И.И., Мерзляк М.Н., Тарусов Б.Н. Витамин Е, биологическая роль в связи с антиоксидантными свойствами // В сб. «Биоантиокислители». Труды МОИП, Т. 52. М.: Наука. 1975. С. 30-52.

Карасев Г.С., Красавцев О.А., Трунова Т.И. Роль белков в адаптации растений к морозу // 3 съезд Всерос. об-ва физиологов растений (24-29 июня, 1993 г., Санкт-Петербург): Тез.докл..6.СПб, 1993. С. 601.

Карасев Г.С., Нарлева Г.И., Яценко И.А., Трунова Т.И. Биосинтез белка при адаптации озимых злаков в связи с их морозостойкостью // Влияние внеш. факторов на устойчивость, рост и развитие раст./ Кар. науч. центр РАН. Ин-т биол. Петрозаводск, 1992. С. 32-51.

Карасев Г.С., Нарлева Г.И., Боруах К.К., Трунова Т.И. Изменение состава и содержания полипептидов в процессе адаптации озимой пшеницы к низким отрицательным температурам // Физиол. и биохим. культ. раст. 1991. Т. 23, N 5. С. 480-486.

Касперска-Палач А. Механизм закаливания травянистых растений // Холодостойкость растений. М.: Колос, 1983. С.112-123.

Климов С.В., Давыденко С.В., Новицкая Г.В., Астахова Н.В., Карасев Г.С., Суворова Т.А., Трунова Т.И. О причинах различий в морозостойкости озимой ржи и пшеницы. 2. Влияние холодового закаливания на ультраструктуру хлоропластов, фотосинтез, белковый, липидный и жирнокислотный состав первого листа // Физиология растений. 1993. Т. 40, № 4. С. 627-635.

Козлов Ю.П. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. М., 1973. 174 с.

Колесниченко А.В., Боровский Г.Б., Войников В.К., Мишарин С.И., Антипина А.И. Характеристика белка из озимой ржи, накапливающегося при гипотермии // Физиология растений. 1996. Т. 43, № 6. С. 894 – 899.

Колесниченко А.В., Боровский Г.Б., Войников В.К. Изменения в содержании белка 310 кД при холодовом закаливании проростков озимой пшеницы // Физиол. и биохим. культ. раст. 1997. Т. 29, №2. С. 383-391.

Колесниченко А.В., Войников В.К., Боровский Г.Б., Дорофеев Н.В. Содержание стрессового белка 310 кД в проростках озимой пшеницы при

гипотермии и водном дефиците // Физиол. и биохим. культ. раст. 1999. Т. 31, №2. С.145 – 149.

Колесниченко А.В., Грабельных О.И., Побежимова Т.П., Войников В.К. Влияние стрессового белка БХШ 310 на активность цианидрезистентной альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы // Вестник Башкирского университета, 2001, №2 (1), С. 26-28.

Колесниченко А.В., Остроумова Е.А., Зыкова В.В., Войников В.К. Белки четырех видов злаков, иммунохимически родственные стрессовому белку 310 кД // Физиология растений. 2000а. Т.47. № 2. С. 199-202.

Колесниченко А.В., Побежимова Т.П., Войников В.К. Характеристика белков низкотемпературного стресса растений// Физиология растений, 2000б, Т. 47, № 4, С. 624-630.

Колоша О.И., Черепенчук Г.С. Особенности азотного обмена и другие физиологические показатели у различных по морозостойкости сортов озимой пшеницы // Рост и устойчивость растений. 1968, Вып.1. С. 197-201.

Колоша О.И., Костенко И.И. Морозостойкость озимых зерновых культур в связи с водным режимом и ходом метаболических процессов // Устойчивость растений к неблагоприятным температурным условиям среды. Киев: Наук. думка, 1976. С. 5-19.

Колоша О.И., Петрова О.В., Мишустина П.С. Синтез белка при отрицательных температурах у различных по морозостойкости сортов озимой пшеницы // Докл. АН УССР. Сер. Б. 1978. N 10. С.938-941.

Колоша О.И. Кримофизиология: проблемы и перспективы развития // Физиология и биохимия культ. растений. 1979. Т. 11, №6. С. 537 – 546.

Колупаев Ю.Е., Борисенко Л.Р., Рябчун Н.И. Особенности проявления активности инвертазы в условиях гипотермии в связи с морозостойкостью озимых злаков // Физиол. и биохим. культ. раст. 1993. Т. 25, № 4. С. 378-393.

Константинов Ю.М., Луценко Г.Н., Подсосонный В.А., Зыкова В.В. Исследование перекисного окисления липидов в растительных митохондриях в связи с проблемой температурного стресса // Стрессовые белки растений. Н.: Наука, 1989а. С. 88-113.

Константинов Ю.М., Луценко Г.Н., Подсосонный В.А., Зыкова В.В. Возможный механизм нарушения транскрипции ДНК в митохондриях

кукурузы при перекисном окислении мембранных липидов // Физиология и биохимия культурных растений, 1989б. Т. 21, № 5. С. 484- 486.

Кравец В.С. Развитие представлений об адаптации растений к низким температурам // Физиол. и биохим. культ. раст. 1996. Т. 28, № 3. С. 167 – 182.

Кузнецов В.В., Сарават М., Кулаева О.Н. Увеличение содержания транскриптов генов хлоропластных белков в проростках пшеницы с повышенной картолином-2 терморезистентностью // Докл. АН. 1992. Т. 327, № 2. С. 281-283.

Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова Л.И. Перекисное окисление липидов и холодовой фактор // Новосибирск: Наука, 1988. 192 с.

Лебедев С.И., Комарницкий П.А. Физиолого-биохимические изменения в почках черешни в онтогенезе и их зимостойкость // Физиология растений. 1971. Т. 18, №1. С. 184 – 191.

Левитт Дж. Повреждения и выживание после замораживания и связь с другими повреждающими воздействиями.// Холодостойкость растений. Москва: Колос. 1983. С. 10-22.

Манойленко К.В. Развитие эволюционного направления в физиологии растений. Исторические очерки. Ленинград: Наука. 1974. 256 с.

Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Акименко В.К. Регуляция и физиологическая роль цианидрезистентной оксидазы у грибов и растений // Биохимия. 1999. Т. 64, № 11. С. 1457-1472.

Меерсон Ф.З. Общий механизм адаптации и роль в нем стресс-реакции, основные стадии процесса // Физиология адаптационного процесса. М.: Наука, 1986. С. 77-123.

Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки. // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений / ВИНТИ, 1989. Т. 6. С. 1-168.

Мишарин С.И., Колесниченко А.В., Антипина А.И., Войников В.К. Влияние низких температур на синтез белков озимой ржи и пшеницы // 2 Съезд Всерос. о-ва физиологов раст., Минск, 24-29 сент., 1990: Тез. докл. Ч.2. М. 1992. С 139.

Мишарин С.И., Антипина А.И., Войников В.К. Влияние холодового шока на антигенный состав озимой ржи и пшеницы // Физиол. и биохим. культ. раст. 1997. Т. 29, № 3. С. 215-219.

Мусич В.Н. Азотный обмен корневой системы озимой пшеницы в процессе перезимовки // Рост и устойчивость растений. 1968. Вып.4. С. 237-242.

Новицкая Г.В., Зверкова О.А. Влияние закаливания к морозу на липидный состав листьев и мембран хлоропластов озимой пшеницы и ржи // В кн. Повышение устойчивости растений к низким температурам. Киев: Наук. думка, 1982. С. 28 – 29.

Новицкая Г.В., Карасев Г.С., Суворова Т.А., Трунова Т.И. Влияние циклогексимида на содержание липидов и растворимых белков при адаптации растений озимой пшеницы к морозу // Физиология растений. 1995. Т. 42, N 3. С. 385-392.

Новожилова О.А., Арефьева Л.П., Кириченко Е.Б., Прусаков А.Н., Семихов В.Ф. Изменение полипептидного состава белков узла кущения пшеницы в процессе зимовки // Бюл. гл. ботан. сада РАН. 1994. N 169. С. 36-40.

Нюпиева К.А., Дроздов С.Н., Маркова Л.В., Варанова В.В. Влияние температуры и освещенности на содержание липидов в листьях и их субклеточных структурах овсяницы луговой // Физиологические аспекты формирования терморезистентности и продуктивности сельскохозяйственных растений. Петрозаводск: Карел. Филиал АН СССР, 1980. С. 59 – 72.

Оканенко А.А., Проценко Д.Ф. Влияние охлаждения проростков пшеницы на содержание липидов // Физиол. и биохим. культ. раст. 1977. Т. 9, №5. С. 467 – 469.

Петрова О.В. Изменения в белковой системе озимой пшеницы в процессе низкотемпературной адаптации и криострессе // Устойчивость растений к действию отрицательных температур. Киев: Наук. думка, 1984. С. 90-109.

Петрова О.В. Адаптация к низкотемпературному стрессу и белковый комплекс озимой пшеницы // 2 Съезд Всерос. о-ва физиологов раст., Минск, 24-29 сент., 1990: Тез. докл. Ч.2. М. 1992. С. 161.

Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Войников В.К., Варакина Н.Н., Боровский Г.Б. Стрессовый белок 310 кД при гипотермии влияет на энергетическую активность растительных митохондрий // Доклады РАН.- 1996.- Т. 350.- С. 715 - 718.

Побежимова Т.П., Войников В.К. Биохимические и физиологические аспекты функционирования убихинона // Биологические мембраны. 1999. Т. 16, № 5. С. 485-491.

Побежимова Т.П., Грабельных О.И., Сумина О.Н., Колесниченко А.В., Войников В.К. Локализация белков, иммунохимически родственных субъединицам стрессового белка 310 кД, в митохондриях озимой пшеницы // Физиология растений, 2001, Т. 48, № 2, С. 204-209.

Пушкарь Н.Е., Белоус А.М. Введение в криобиологию. Киев.1975. с. 149-165.

Родионов В.С. Влияние низких температур на липидный обмен в растениях и фазовые переходы в мембранах // Эколого-физиологические механизмы устойчивости растений к действию экстремальных температур. Петрозаводск, 1978. С. 37-51.

Родченко О.П. Адаптация корня к действию низких температур как показатель экологической устойчивости сорта // Условия среды и продуктивность растений. Иркутск, 1985. С. 19-27.

Родченко О.П. Рост и реакции адаптации к низким температурам // Рост и устойчивость растений. Новосибирск: Наука, 1988а. С. 144-154.

Родченко О.П., Маричева Э.А., Акимова Г.П. Адаптация растущих клеток корня к пониженным температурам.- Новосибирск: Наука, 1988б.- 150 с.

Савин В.Н., Никитина Л.И. Молекулярно-генетические особенности адаптивных реакций у разных по морозоустойчивости растений к низким температурам // Журн. Общ. Биол. 1983. Т. 44, №5. С. 627 – 635.

Савич И.М., Тажигаева Т.Л. Влияние холодового стресса на изопероксидазы проростков кукурузы и пшеницы, различающиеся по изоэлектрическим точкам // Физиология растений. 1988. Т.35, № 5. С.841-847.

Савич И.М. Аминокислотный состав щелочных изопероксидаз кукурузы при действии низкотемпературного стресса // Прикл. биохимия и микробиология. 1989а. Т. 25, N 5. С.634-643.

Савич И.М. Изопероксидазы проростков сорго при холодовом стрессе // Физиол. и биохим. культ. раст. 1989б. Т. 20, N 6. С. 566-572.

Савич И.М. Изменение антигенной структуры основных изопероксидаз проростков кукурузы при криострессе // Физиология растений. 1990. Т. 37, N 4. С.766-773.

Салеев Р.К., Кефели В.И. От редакторов // Рост и устойчивость растений. Новосибирск: Наука, 1988. С. 144-154.

Самыгин Г.А. О причинах гибели растительных клеток от мороза // В кн. Физиология приспособления и устойчивости растений при интродукции /Новосибирск: Наука. 1969. С.71-85.

Самыгин Г.А. Причины вымерзания растений. М.. 1974. 191 с.

Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 1989. 564 с.

Скулачев В.П. Возможная роль активных форм кислорода в защите от вирусных инфекций // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 1691-1694.

Стаценко А.П. О криозащитной роли аминокислот в растениях // Физиол. и биох. культ. растений. 1992. Т. 24, № 6. С. 560-564.

Тарусов Б.Н., Веселовский В.А. Сверхслабые свечения растений и их прикладное значение. М.: МГУ, 1978. 149 с.

Титов А.Ф., Критенко С.П. Влияние хлорамфеникола на холодовое и тепловое закаливание растений на свету и в темноте // Физиол. и биохим. культ. раст. 1983. Т. 15, N 3. С.246- 249.

Титов А.Ф., Акимова Т.В., Крупнова И.В. Формирование устойчивости в начальный период закаливания растений при действии ингибиторов белкового синтеза и цитокинина // Физиол. и биохим. культ. раст. 1992. Т. 24, № 4. С. 367-372.

Трунова Т.И., Зверева Г.Н. Влияние ингибиторов белкового синтеза на морозостойкость озимой пшеницы // Физиология растений. 1977. Т. 24, N.2. С.395-401.

Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. М.: Наука, 1979. 352 с.

Усова Е.К., Федотова В.Д. Влияние отдельных хромосом Х-генома пырея на скорость адаптации к низким температурам дополненных линий пшеницы ($2n=44$) // Генетика. 1979. Т. 15, № 6. С.1061-1066.

Файзулин А.Д., Лукманова Р.С. Изменения изоферментного состава пероксидазы в узлах кущения озимой ржи в периоды осеннего закаливания и перезимовки // Физиол. и биохим. культ. раст. 1987. Т.19, N5. С. 444-448.

Хатано С. Изучение морозостойкости *Chlorella ellipsoidea*: влияние антиметаболитов, детергентов, гормонов и сахаров на процесс закаливания на свету и в темноте // Холодостойкость растений. М.: Колос. 1983. С.141-157.

Шугаев А.Г. Некоторые особенности структурной организации и окислительной активности дыхательной цепи митохондрий растений // Успехи современной биологии, 1991. Т. 111, № 2. С. 178-191.

Шумская И.А. Физиолого-генетические аспекты термоустойчивости у растений // Успехи современной биологии. 1987. Т. 103, N 2. С.287-297.

Abromeit M., Askman P., Sarnighausen E., Dorffling K. Accumulation of high-molecular-weight proteins in response to cold hardening and abscisic acid treatment in two winter wheat varieties with different frost tolerance // J. Plant Physiol. 1992. V. 140, N 5. P. 617 - 622.

Adnan S., Lurie S., Weiss D. Isolation and characterization of a heat-induced gene, *hcit2*, encoding a novel 16.5 kDa protein: expression coincides with heat-induced tolerance to chilling stress // Plant Molecular Biology. 1998. V. 36, N 6. P. 935 - 939.

Albert F.G., Bennet L.W, Anderson A.J. Peroxidase associated with the root surface of *Phaseolus vulgaris* // Canad. J. Bot. 1986. V. 64. P. 573-578.

Almeida A.M., Jarmuszkiewicz W., Khomsi H., Arruda P., Vercesi A.E., Sluse F.E. Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling protein sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit // Plant Physiology. 1999. V. 119. P. 1323-1329.

Anderson J.V., Li Qin-Bao, Haskel D.W., Guy C.L. Spinach BiP and an HSP 70 are differentially regulated during cold acclimation: Jt. Annu. meet. Amer. Soc. Plant Physiol., Can. Soc. Plant Physiol., Minneapolis, Minn., July 31 Aug.

4, 1993: Sci. program; Abstr. Pap.// Plant Physiol. 1993. V. 102, N 1. Suppl. P. 149.

Anderson M.D., Prasad T.K., Martin B.A. Stewart C.R. Differential gene expression in chilling-acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance // Plant Physiol. 1994. V. 105. P. 331-339.

Anderson M.D., Prasad T.K., Stewart C. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings // Plant Physiology. 1995. V. 109, N 4. P. 1247-1257.

Antikainen M., Griffith M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals // Physiologia Plantarum. 1997. V. 99, N 3. P. 423-432.

Antikainen M. Griffith M. Zhang J. Hon WC. Yang DSC. Pihakaskimaunsbach K. Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns, and roots by tissue printing // Plant Physiology. 1996. V. 110, N 3. P. 845-857.

Arora R., Wisniewski M.E., Davis G. 60 kD Polypeptide in cold acclimated bark tissue of peach is heatstable and related to dehydrin family of proteins: In. Annu.meet. Amer. Soc. Plant Physiol., Can. Soc. Plant Physiol., Minneapolis, Minn., July 31 - Aug. 4, 1993: Sci. program; Abstr. Pap.// Plant Physiol.. 1993. V. 102, N1. Suppl.. P. 84.

Arora R, Rowland L.J, Panta G.R. Chill-responsive dehydrins in blueberry: Are they associated with cold hardiness or dormancy transitions? // Physiologia Plantarum. 1997. V. 101, N 1. P 8 - 16.

Artlip T.S., Callahan A.M., Bassett C.L., Wisniewski M.E. Seasonal expression of a dehydrin gene in sibling deciduous and evergreen genotypes of peach (*Prunus persica* [L] Batsch) // Plant Molecular Biology. 1997. V 33, N 1. P. 61-70.

Ashburner M., Bonner J.J. The induction of gene activity in Drosophila by heat shock // Cell. 1979. V. 17, N 3. P. 241 – 254.

Bacon B.R., Britton R.S. The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? // Hepatology, 1990. V. 11. P. 127-133.

Baldwin B.D., Bandara M.S., Tanino K.K. Is tissue culture a viable system with which to examine environmental and hormonal regulation of cold

acclimation in woody plants? // *Physiologia Plantarum*, 1998. V. 102, N 2. P. 201-209.

Bayles D.O., Annous B.A., Wilkinson B.J. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures // *Applied & Environmental Microbiology*. 1996. V. 62, N 3. P. 1116-1119.

Berberich T., Sugawara K., Harada M., Kusano T. Molecular cloning, characterization and expression of an elongation factor 1-alpha gene in maize // *Plant molecular biology*. 1995. V 29, N 3. P. 611-615.

Berberich T., Kusano T. Cycloheximide induces a subset of low temperature-inducible genes in maize // *Molecular & General Genetics*. 1997. V. 254, N 3. P. 275-283

Bernstam V.A. Heat effects of protein biosynthesis // *Ann. Rev. Plant Physiol*. 1978. V.29. P. 2925-2946.

Bin Lu, Ke-Hui Tan, Bing Lin, Hua-Liang Huang. Регулируемые низкой температурой и связанные с цветением синтез мРНК и белков во время яровизации озимой пшеницы // *Zhiwu shengli xuebao = Acta Phyto-Physiol. Sin.* 1992. V. 18, N 2. P. 113-120.

Bixby J.A., Brown G.N. Ribosomal changes during induction of cold hardiness in black locust seedlings // *Plant Physiol*. 1975. V. 56. P. 617 – 621.

Bohnert H., Sheveleva E. Plant stress adaptations - making metabolism move // *Plant Biologi*, 1998. V. 1. P. 267-274.

Boothe J.G., Sonnichsen F.D., deBeus M.D., JohnsonFlanagan A.M. Purification, characterization, and structural analysis of a plant low-temperature-induced protein // *Plant Physiology*. 1997. V 113, N 2. P. 367-376.

Boss W.F. Phosphoinositide metabolism: its relation to signal transduction in plants // *Second messengers in plant growth and development*. New York: Alan R. Liss Inc., 1989. P. 29 – 56.

Boss O., Samec S., Paoloni-Giacobino A., Rossier C., Dulloo A., Seydoux J., Muzzin P., Giacobino J.P. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression // *FEBS Letters*. 1997. V. 412. P. 111-114.

Bouillaud F., Coulpan E., Pecqueur C., Ricquier D. Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4 // *BBA*. 2001. V. 1504. P. 107-119.

Boveris A., Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxid. General properties and effect of hyperbaric oxygen // *Biochem. J.* 1973. V. 134. P. 707-716.

Brauer D., Otto J., Tu S.I. Nucleotide binding is insufficient to induce cold inactivation of the vacuolar-type ATPase from maize roots // *Plant Physiology & Biochemistry*. 1995. V. 33, N 5. P. 555-559.

Bredemeijer G.M.M., Esselink G. Phosphofructokinase in relation to sugar accumulation in cold-hardened *Lolium* L. cultivars // *J. Plant Physiol.* 1994. V. 143, N 1. P. 112 - 118.

Brown G.N., Bixby J.A. Soluble and insoluble protein patterns during induction of freezing tolerance in black locust seedlings // *Physiol. Plant.* 1975. V.34, N3. P.187-191.

Brunner M., Kocsy G., Rueeggsegger A., Schmutz D., Brunold C. Effect of chilling on assimilatory sulfate reduction and glutathione synthesis in maize // *J. Plant Physiology*. 1995. V. 146. P. 743-747.

Cadenas E., Boveris A., Ragan C.I., Stoppani A.O.M. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome *c* reductase from beef-heart mitochondria // *Arch. Biochem. Biophys.* 1977. V. 180. P. 248-257.

Cadenas E., Boveris A. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protonophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria // *Biochem. J.* 1980. V. 188. P. 31-37.

Cai Q.Y., Moore G.A., Guy C.L. An unusual group 2 LEA gene family in citrus responsive to low temperature // *Plant Molecular Biology*. 1995. V 29, N 1. P. 11-23.

Capel J., Jarillo J.A., Salinas J., MartinezZapater J.M. Two homologous low-temperature-inducible genes from *Arabidopsis* encode highly hydrophobic proteins // *Plant Physiology*. 1997. V. 115, N 2. P. 569-576.

Casolo V., Braidot E., Chiandussi E., Macri F., Vianello A. The role of mild uncoupling and non-coupled respiration in the regulation of hydrogen peroxide generation by plant mitochondria // *FEBS Lett.* 2000. V. 474. P. 53-57.

Castilho R.F., Kowaltowski A.J., Meinicke A.R., Bechara E.J.H., Vercesi A.E. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species // *Free Radic. Biol. Med.* 1995a. V. 18. P. 479-486.

Castilho R.F., Kowaltowski A.J., Meinicke A.R., Vercesi A.E. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate or t-butyl hydroperoxide in the presence of Ca^{2+} : effect of coenzyme Q redox state // *Free Radic. Biol. Med.* 1995b. V. 18. P. 55-59.

Castilho R.F., Meinicke A.R., Almeida A.M., Hermes-Lima M., Vercesi A.E. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate is potentiated by Ca^{2+} and induces lipid peroxidation and alterations in membrane proteins // *Arch. Biochem. Biophys.* 1994. V. 308. P. 158-163.

Cattivelli L., Bartels D. Cold-induced mRNAs accumulate with different kinetics in barley coleoptiles // *Planta*. 1989. V. 178, N 2. P. 184 - 188.

ChapotChartier M.P., Schouler C., Lepeuple A.S., Gripon J.C., Chopin M.C. Characterization of cspB, a cold-shock-inducible gene from *Lactococcus lactis*, and evidence for a family of genes homologous to the *Escherichia coli* cspA major cold shock gene // *Journal of Bacteriology*. 1997. V. 179, N 17. P. 5589 - 5593.

Chakraborti T., Das S., Mondal M., Roychoudhury S., Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview // *Cell. Signal.* 1999. V. 11. P. 77-85.

Chen P.M., Li P.H. Induction of frost hardiness in stemcortical tissues of *Cornus stolonifera* Michx. by water stress // *Plant Physiol.* 1977. V.59, N2. P. 240 - 243.

Chen H.H., Li P.H., Brenner M.L. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation // *Plant Physiol.* 1983. V. 71, N 2. P. 362 – 365.

Cholley F., Edery P., Ricquier D., Peudenier S., Slama A., Tardieu M. Mitochondrial respiratory chain deficiency revealed by hypothermia // *Neuropediatrics* 2001. V. 32. P. 104-106.

Choo D.W., Kurihara T., Suzuki T., Soda K., Esaki N. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: Gene cloning and enzyme purification and characterization // *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. V. 64, N 2. P. 486-491.

Chou M., Chen Y.-M., Lin C.-Y. Thermotolerance of isolated mitochondria associated with heat shock proteins // *Plant Physiol.* 1989. V. 89, N 2. P. 617-621.

Clarkson D.T., Hall K.C., Roberts J.K. Phospholipid composition and fatty acid desaturation in the roots of rye during acclimatization to low temperature. Positional analysis of fatty acids // *Planta.* 1980. V. 149, N 5. P. 464 – 471.

Close T.J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins // *Physiologia Plantarum.* 1996. V. 97, N 5. P 795-803.

Close T.J. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature // *Physiologia Plantarum.* 1997. V. 100, N 2. P 291-296.

Considine M.J., Daley D.O., Whelan J. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. N. 4. P. 1619-1629.

Costa A.D.T., Nantes I.L., Jezek P., Leite A., Arruda P., Vercesi A.E. Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening // *J. of Bioenergetics & Biomembranes.* 1999. V. 31. N 5. P. 527-533.

Craig J.E., Boyle D., Francis K.P., Gallagher M.P. Expression of the cold-shock gene *cspB* in *Salmonella typhimurium* occurs below a threshold temperature // *Microbiology.* 1998. V. 144, N 3. P. 697-704.

Crespi M.D., Zabaleta E.J., Pontis H.G., Salerno G.L. Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat // *Plant Physiol.* 1991. V.96, N3. P. 887-891.

Crosatti C., Rizza F., Cattivelli L. Accumulation and characterisation of the 75 kDa protein induced by low temperature in barley // *Plant Sci.* 1994. V. 97, N 1. P. 39 - 46.

Crowley V., Vidal-Puig A.J. Mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) and obesity // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2001. V. 11. N. 1. P.70-75.

Dalgaard L.T., Pedersen O. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes // *Diabetologia.* 2001. V. 44. N 8. P. 946-965.

Day D.A., Millar A.H., Wiskich J.T., Whelan J. Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria // *Plant Physiol.* 1994. V. 106. P. 1421-1426.

De Santis A., Landi P., Genchi G. Changes of mitochondrial properties in maize seedlings associated with selection for germination at low temperature. Fatty acid composition, cytochrom c oxidase and adenine nucleotide translocase activities // *Plant Physiol.* 1999. V. 119. P. 743-754.

Didierjean L., Frendo P., Nasser W., Genot G., Marivet J., Burkard G. Heavy-metal-responsive genes in maize - identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress // *Planta.* 1996. V 199, N 1. P. 1-8.

Diehl A.M., Hoek J.B. Mitochondrial Uncoupling: Role of Uncoupling Protein Anion Carriers and Relationship to Thermogenesis and Weight Control "The Benefits of Losing Control" // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999. V. 31. N. 5. P. 493- 506.

Dong C.N., Ouellet F., Houde M., Sarhan F. Gene expression during cold acclimation in strawberry // *Plant and Cell Physiology.* 1997. V. 38, N 7. P. 863-870.

Douce R. Mitochondria in Higher Plants: Structure, Functions and Biogenesis.// Academic Press, New York 1985.

Downs C.A., Heckathorn S.A. The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants // *FEBS Letters.* 1998. V. 430. P. 246-250.

Dulloo A.G., Samec S., Seydoux J. Uncoupling protein 3 and fatty acid metabolism // *Biochemical Society Transactions.* 2001. V. 29. PT 6. P. 785-790.

El-Wadawi R., Bowler K. The effect of *in vivo* heat treatment on blowfly flight muscle mitochondrial function: effects on partial reactions of the respiratory chain // *J. of Thermal Biology.* 1996. V. 21. P. 403 - 408.

Fang L., Jiang W.N., Bae W.H., Inouye M. Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37 degrees C by mRNA stabilization // *Molecular Microbiology.* 1997. V. 23, N 2. P. 355-364.

Ferullo J.M., Vezina L.P., Rail J., Laberge S., Nadeau P., Castonguay Y. Differential accumulation of two glycine-rich proteins during cold-acclimation alfalfa // *Plant Molecular Biology.* 1997. V 33, N 4. P. 625-633.

Fleury Ch., Neverova M., Collins S., Raimbault S., Champigny O., Levi-Meyrueis C., Bouillaud F., Seldin M.F., Surwit R.S., Ricquier D., Warden C.H. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia // *Nat. Genet.* 1997. V. 15, N 3. P. 269-272.

Fleury Ch., Sanchis D. The mitochondrial uncoupling protein-2: current status // *The Int. J. of Biochem. & Cell Biology.* 1999. V. 31. P. 1261-1278.

Fontaine E., Eriksson O., Ichas F., Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. // *J Biol Chem.* 1998. V. 273. P. 12662-12668.

Frankenberg N., Welker Ch., Jaenicke R. Does the elimination of ion pairs affect the thermal stability of cold shock protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*? // *FEBS Letters.* 1999. V. 454. P. 299-302.

Franco G.R., Garratt R.C., Tanaka M., Simpson A.J.G., Pena S.D.J. Characterization of a *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of the Y-box binding protein // *Gene.* 1997. V.198, N 1-2. P. 5-16.

Fu Ping, Robertson A.I., Weninget A., Wilen R.W., O'Connor B.J., Gusta L.W. Differential expression of dehydrins in spring and winter cereals during cold acclimation: Abstr. Pap. Annu. Meet. Amer. Soc. Plant Physiologists, Portland, Ore., July 30 - Aug. 3, 1994 // *Plant Physiol.* 1994. V. 105, N 1. Suppl. P. 169.

Galling G. Use (and misuse) of inhibitors in gene expression. - *Nucleic acid and protein in plants.* 2. Berlin, 1982. P.663-677.

Gana J.A., Sutton F., Kenefick D.G. cDNA structure and expression patterns of a low-temperature-specific wheat gene *tacr7* // *Plant Molecular Biology.* 1997. V. 34, N 4. P. 643-650.

Garcia-Martinez C., Sibille B., Solanes G., Darimont C., Mace K., Villarroya F., Gomez-Foix A.M. Overexpression of UCP3 in cultured human muscle lowers mitochondrial membrane potential, raises ATP/ADP ratio, and favors fatty acid vs. glucose oxidation. // *FASEB J.* 2001. V. 15. N 11. P. 2033-2035.

Garlid K.D., Jaburek M., Jezek P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins // *FEBS Letters.* 1998. V. 438. P. 10-14.

Garlid K. D., Jaburek M., Jezek P. Mechanism of uncoupling protein action // *Biochemical Society Transactions.* 2001. V. 29. PT 6. P. 803-805.

Garlid K.D., Jaburek M., Jezek P., Varecha M. How do uncoupling proteins uncouple? // BBA. 2000. V. 1459. P. 383-389.

Gatenby A.A., Viitanen P.V. Structural and functional aspects of chaperonin-mediated protein folding // Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1994. V. 45. P. 469-491.

Gatschet M.J., Taliaferro C.M., Porter D.R., Anderson M.P., Anderson J.A., Jackson K.W. A cold-regulated protein from Bermudagrass crowns is a chitinase // Crop Science. 1996. V 36, N 3. P. 712-718.

Giacobino J.P. Uncoupling protein 3 biological activity // Biochemical Society Transactions. 2001. V. 29. PT 6. P. 774-776.

Gilmour S.J., Lin C.T., Thomashow M.F. Purification and properties of *Arabidopsis thaliana* COR (cold-regulated) gene polypeptides COR15AM and COR6.6 expressed in *Escherichia coli* // Plant Physiology. 1996. V. 111, N 1. P. 293-299.

Gilmour S.J., Thomashow M.F. Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana* // Plant and Mol. Biol. 1991. V. 17, N 1. P. 1233 – 1240.

Gimeno R.E., Dembski M., Weng X., Deng N., Shyjan A.W., Gimeno C.J., Iris F., Ellis S.J., Woolf E.A., Tartaglia L.A. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog // Diabetes. 1997. V. 46. P. 900-906.

Goodwin W. Pallas J.A., Jenkins G.I. Transcripts of a gene encoding a putative cell wall plasma membrane linker protein are specifically cold-induced in *Brassica napus*. // Plant Molecular Biology. 1996. V 31, N 4. P. 771-781.

Grabelnych O., Pobezhimova T., Kolesnichenko A. Voinikov V. Complex I of winter wheat mitochondria respiratory chain is the most sensitive to uncoupling action of plant stress-related uncoupling protein CSP 310// J. Therm. Biol., 2001a. V. 26, N 1, P. 47-53.

Grabelnych O.I., Pobezhimova T.P., Kolesnichenko A.V., Voinikov V.K. The study of cold shock protein CSP 310 function in maize mitochondria // Maize Genet. Coop. Newsletters, 2001b, V.75. P 10.

Grabelnych O.I., Pobezhimova T.P., Kolesnichenko A.V., Voinikov V.K. Stress protein CSP 310 cause oxidation and phosphorylation uncoupling during low-temperature stress only in cereal but not in dycotyledone mitochondria// J. Immunoassay & Immunochemistry, 2001c, V. 22, N 3, pp. 275-287.

Grabelnych O.I., Kolesnichenko A.V., Misharin S.I., Antipina A.I., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K. The influence of antisera toward some cytoplasmic proteins on the energetic activity of mitochondria in the shoots of winter wheat. // Annual Wheat Newsletters, 2001d, V. 47, pp.163-164.

Grabelnych O.I., Pobezhimova T.P., Kolesnichenko A.V., Voinikov V.K. The function of stress protein CSP 310 in winter wheat mitochondria. // Annual Wheat Newsletters, 2001e, V. 47, pp.166-167.

Graham D., Patterson B.D. Responses of plants to low, non-freezing temperatures: proteins, metabolism and acclimation// Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1982. V.33. P.347-372.

Graumann P., Marahiel M.A. Some like it cold: Response of microorganisms to cold shock //Archives of Microbiology. 1996. V 166, N 5. P. 293-300.

Graumann P., Marahiel M.A. Effects of heterologous expression of CspB, the major cold shock protein of *Bacillus subtilis*, on protein synthesis in *Escherichia coli* // Molecular & General Genetics. 1997. V. 253, N 6. P. 745 - 752.

Graumann P., Marahiel M.A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain // TIBS. 1998. V. 23. P. 286-290.

Graumann P., Wendrich T.M., Weber M.H.W., Schroder K., Marahiel M.A. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures // Molecular Microbiology. 1997. V. 25, N 4. P. 741-756.

Grenier G., Tremolieres A., Therrien H.P., Willemot C. Changements dans les lipides de la luzerne en conditions menant a l'endurcissement au froid.// Can. J. Bot.. 1972. V.50, N.8. P. 1681-1689.

Grenier G., Willemot C. Lipid changes in roots of frost hardy and less hardy alfalfa varieties under hardening conditions.// Cryobiology. 1974. V.11, N.4. P. 324-331.

Griffith M., Ala P., Yang D.S.C., HonWai-Ching, Moffatt B.A. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves // Plant Physiol. 1992. V.100, N 2. P. 593 - 596.

Griffith M., Marentes E., Mlynerz A., Brush R.A., Knight C.A. The role of apoplastic protein sin frost tolerance of winter rye: Jt. Annu. meet. Amer. Soc. Plant Physiol., Can. Soc. Plant Physiol., Minneapolis, Minn., July 31 - Aug. 4, 1993: Sci. program; Abstr. Pap.// Plant Physiol. 1993. V. 102, N 1. Suppl.. P. 9.

Griffith M., Antikainen M., Hon W.C., PihakaskiMaunsbach K., Yu X.M., Chun J.U., Yang D.S.C. Antifreeze proteins in winter rye // *Physiologia Plantarum*. 1997. V. 100, N 2. P. 327-332.

Grijalba M.T., Vercesi A.E., Schreier Sh. Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 13279-13287.

Gueta-Dahan Y., Yaniv Z., Zilinskas B., Gozal B. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus // *Planta*, 1997. V. 203. P. 460-469.

Guidot D.M., Repine J.E., Kitlowski A.D., Flores S.C., Nelson S.K., Wright R.M., McCord J.M. Mitochondrial respiration scavenges extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism // *J. Clin. Invest.* 1995. V. 96. P. 1131-1136.

Guillot-Salomon T., Remy R., Cantrel C., Demandre C., Moreau F. Phospholipids and polypeptides in the outer membrane of maize mitochondria // *Phytochemistry*. 1997. V. 44. P.29-43.

Gunter T.E., Gunter K.K., Sheu S.-S., Gavin C.E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance // *Am. J. Physiol.* 1994. V. 36. P. C313-C339.

Gusta L.V., Weiser C.J. Nucleic acid and protein changes in relation to cold acclimation and freezing injury of Korean boxwood leaves // *Plant Physiol.* 1972. V.49, P.91-96.

Guy C. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1990. V. 41. P. 187 – 223.

Guy C., Niemi K.J., Brambl R. Altered gene expression during cold acclimation of spinach // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1985. V.82, N 5. P.3673 – 3677.

Guy C., Haskell D., Neven L., Klein P., Smelser C. Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach.// *Planta*. 1992a. V. 188. P. 265 - 270.

Guy C., Huber J.L.A., Huber S.C. Sucrosephosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature // Plant Physiol.. 1992. V. 100, N 1. P. 502 - 508.

Hahn M., Walbot V. Effects of cold-treatment on protein synthesis and mRNA levels in rice leaves // Plant Physiol. 1989. V. 91, N 3. P. 930 - 938.

Hakam N., Simon J.P. Effect of low temperatures on the activity of oxygen-scavenging enzymes in two populations of the C-4 grass *Echinochloa crusgalli* // Physiologia Plantarum. 1996. V 97, N 2. P. 209-216.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. - Oxford: Claredon Press, 1989. P. 215.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview // Meth. Enzymol. 1990. V. 186. P. 1-85.

Hammouda O. Borbely G. Temperature shift induced synthesis of specific C-¹⁴-labeled proteins and alterations in light absorption spectrum and photosynthetic activity in *Synechococcus* sp. // Microbiological Research. 1996. V 151, N 2. P. 121-126.

Hanson P.L., Schulman H. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases // Annu. Rev. Biochem. 1992. V. 61. P. 559 – 601.

Hayashi H., Alia, Mustardy L., Deshniun P., Ida M., Murata N. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the codA gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress // Plant Journal. 1997. V 12, N 1. P. 133-142.

Heber U. Freezing injury and uncoupling of phosphorylation from electron transport in chloroplasts. // Plant Physiol. 1967. V. 42, N 10. P. 1343-1350.

Hebraud M., Guzzo J. The main cold shock protein of *Listeria monocytogenes* belongs to the family of ferritin-like proteins // FEMS Microbiology Letters. 2000. V. 190. P. 29-34.

Heino P., Sandman G., Lang V. Abscissic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Theor. and Appl. Genet. 1990. V. 79. P. 801 – 806.

Hendrick J.P., Hartl F.-U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins // Annu. Rev. Biochem. 1993. V. 62. P. 349-384.

Herendeen S.L., Van Bogelev R.A., Neidhardt F.C. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures // J. Bacteriol. 1979. V.139, N1. P.185-194.

Hermes-Lima M., Castilho R.F., Meinicke A.R., Vercesi A.E. Characteristics of Fe(II)ATP complex-induced damage to the rat liver mitochondrial membrane // Mol. Cell. Biochem. 1995. P. 53-60.

Herouart D., Montagu M.V., Inze D., Van Montagu M. Developmental and environmental regulation of the *Nicotiana plumganifolia* cytosolic Cu/Zn - superoxide dismutase promoter in transgenic tobacco // Plant Physiology, 1994. V. 104. P. 873-880.

Hesse H., Willmitzer L. Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Plant Molecular Biology. 1996. V 30, N 5. P. 863-872.

Himms-Hagen J., Harper M.E. Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis // Exp. Biol. Med. 2001. V. 226. N 2. P. 78-84.

Hincha D.K., Pfuller U., Schmitt J.M. The concentration of cryoprotective lectins in mistletoe (*Viscum albam* L.) leaves is correlated with leaf frost hardiness // Planta. 1997. V. 203, N 2. P. 140-144.

Hinz W., Gruninger S., De Pover A., Chiesi M. Properties of the human long and short isoforms of the uncoupling protein-3 expressed in yeast cells // FEBS Letters. 1999. V. 462. P. 411-415.

Hodges D.M., Andrews C.J., Johnson D.A., Hamilton R.I. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines // Journal of Experimental Botany. 1997. V. 48, N 310. P. 1105-1113.

Hon W.C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y.C., Yang D.S.C. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins // Plant Physiology. 1995. V 109. N 3. P. 879-889.

Hong S.W., Jon J.H., Kwak J.M., Nam H.G. Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiology. 1997. V. 113, N 4. P. 1203-1212.

Honjoh K., Yoshimoto M., Joh T., Kajiwarra T., Miyamoto T., Hatano S. Isolation and characterization of hardening-induced proteins in *Chlorella vulgaris* C-27 -

identification of late embryogenesis abundant proteins // Plant & Cell Physiology. 1995. V 36, N 8. P. 1421-1430.

Horvath J., Vigh L., Belea A., Farhas T. Hardiness dependent accumulation of phospholipids in leaves of wheat cultivars // Physiol. plant. 1980. V. 49, N 1. P. 57 – 62.

Houde M., Danyluk J., Laliberte J.F., Passart E., Dhundsa R.S., Sarhan F. Cloning, characterization and expression of cDNA encoding a 50 kD protein specifically induced by cold acclimation in wheat.// Plant Physiol. 1992. V. 99, N 4. P.1381-1387.

Houde M., Daniel C., Lachapelle M., Allard F., Laliberte S., Sarhan F. Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues // Plant Journal. 1995. V 8, N 4. P. 583-593.

Hu K.H., Liu E., Dean K., Gingras M., Degraff W., Trun N.J. Overproduction of three genes leads to camphor resistance and chromosome condensation in *Escherichia coli* // Genetics. 1996. V 143, N 4. P. 1521-1532.

Huq S., Palmer J.M. Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria // FEBS Letters. 1978. V. 95. P. 217-220.

Huner N., Macdowall F. Cold hardening induced changes among wheat and rye chloroplastic proteins // Plant Physiol.(Suppl.). 1975. V. 56, N 2. P.80.

Iida H., Yahara I. A heat shock-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows constitutive synthesis of two heat shock proteins and altered growth // J. Cell Biol. 1984. V. 99, N 4. P. 1441-1450.

Ito K. Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*) // Plant Science. 1999. V. 149. P. 167-173.

Jaglo-otowski K.R., Gilmour S.J., Zarka D.G., Schabenberger O., Thomashow M.F. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance // Science. 1998. V. 280, N 5360. P. 104-106.

Jarmuszkiewicz W. Uncoupling proteins in mitochondria of some plants and some microorganisms // Acta Biochim. Pol. 2001. V. 48. N. 1. P. 145-155.

Jarmuszkiewicz W., Miyasaka A.A., Sluse-Goffart C.M., Sluse F.E., Vercesi A.E. Linoleic acid-induced activity of plant uncoupling mitochondrial protein in

purified tomato fruit mitochondria during resting, phosphorylating, and progressively uncoupled respiration // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 34882 - 34886.

Jarmuszkiewicz W, Milani G, Fortes F, Schreiber A.Z, Sluse F.E, Vercesi A.E. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis* // FEBS Lett. 2000. V. 467, N 2-3. P. 145-149.

Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart C.M., Hryniewiecka L., Sluse F.E. Identification and Characterisation of a protozoan Uncoupling Protein in *Acanthamoeba castellanii* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274, N. 33. P. 23198-23202.

Jansch L., Krufft V., Schmitz U.K., Braun H.P. New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria // Plant Journal. 1996. V. 9. P. 357 – 368.

Jezek P. Fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling proteins // J. of Bioenergetics & Biomembranes. 1999. V. 31. P. 457-465.

Jezek P., Borecky J., Zackova M., Costa A.D., Arruda P. Possible basic and specific functions of plant uncoupling proteins (pUCP) // Biosci. Rep. 2001. V. 21. N. 2. P. 237-245.

Jezek P., Costa A.D.T., Vercesi A.E. Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism // The J. of Biological Chemistry. 1997. V. 272, N 39. P. 24272-24278.

Jezek P., Engstova H., Zackova M., Vercesi A.E., Costa A.D.T., Arruda P., Garlid K.D. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1365. P.319-327.

Jezek P., Garlid K.D. Mammalian mitochondrial uncoupling proteins // Int. J. of Biochemistry & Cell Biology. 1998. V. 30. P. 1163-1168.

Jezek P., Zackova M., Rehakova Z., Ruzicka M., Borecky J., Skobisova E., Brucknerova J., Garlid K.D., Gimeno R.E., Tartaglia L.A. Existence of uncoupling protein-2 antigen in isolated mitochondria from various tissues // FEBS Letters. 1999. V. 455. P. 79-82.

Jezek P., Zackova M., Kosarova J., Rodrigues E.T.S., Madeira V.C.M., Vicente J.A.F. Occurrence of Plant-Uncoupling Mitochondrial protein (PUMP)

in Diverse Organs and Tissues of Several Plants // J. Bioenerg. Biomembr. 2000. V. 32. N. 6. P. 549-561.

Jian Ling-Cheng, Sun Long-Hua, Shi Gou-Shun Цитохимическое изучение гликопротеинов на клеточных мембранах сортов озимой пшеницы, различающихся по морозоустойчивости, во время холодового закаливания // Шиянь Шэн'у сюэбао = Acta Biol. Exp. Sin. 1991. V. 24, N3. P. 249-257.

Jiang C. Iu B. Singh J. Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter *Brassica napus* // Plant Molecular Biology. 1996. V. 30, N3. P. 679-684.

Jiang W.N., Hou Y., Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone // Journal of Biological Chemistry. 1997. V 272, N 1. P. 196-202.

Jones D.P. Mitochondrial dysfunction during anoxia and cell injury // BBA. 1995. V. 1271. P. 29 – 33.

Jones A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? // Trends in Plant Science. 2000. V. 5. P. 225-230.

Jung G.A., Shih S.C., Shelton D.C. Influence of purines and pyrimidines on cold hardiness of plants. 3. associated changes in soluble protein and nucleic acid content and tissue pH // Plant Physiol. 1967. V. 42, N 12. P. 1653 – 1657.

Kandror O., Goldberg A.L. Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997. V. 94, N 10. P. 4978-4981.

Kasperska-Palacz A., Dlugokecka E., Breitenwald J., Weinslinska B. Physiological mechanisms of frost tolerance: possible role of protein in plant adaptation to cold // Biol. plant. 1977a. V. 19, N1. P. 10-17.

Kasperska-Palacz A., Jasinska M., Sobczyc E.A., Weinslinska B. Physiological mechanisms of frost tolerance: subcellular localisation and some physical-chemical properties of protein fractions accumulated under cold treatment // Biol. plant. 1977b. V. 19, N1. P. 18-26.

Kasperska-Palacz A., Weinslinska B. Electrophoretic pattern of soluble proteins in the rape leaves in relation to frost hardiness. // Physiol. veget.. 1972a. V. 10, N1. P. 19-25.

Kasperska-Palacz A., Wcislinska B. The effect of CCC on the nitrogen compounds content in rape plants and their frost hardiness. Relation to the conditions of day length and temperature // *Biol. plant.* 19726. V.14, N1. P.39-47.

Kavanagh N.I., Ainscow E.K., Brand M.D. Calcium regulation of oxidative phosphorylation in rat skeletal muscle mitochondria // *BBA.* 2000. V. 1457. P. 57-70.

Kawczynski W., Dhindsa R.S. Alfalfa nuclei contain cold-responsive phosphoproteins and accumulate heat-stable proteins during cold treatment of seedlings // *Plant and Cell Physiology.* 1996. V 37, N 8. P. 1204-1210.

Kendall E.J., McKersie B.D. Free radical and freezing injury to cell membranes of winter wheat // *Physiol. Plant.* 1989. V. 76. P. 86 - 94.

Kikkawa U., Nishizuka Y. The role of protein kinase C in transmembrane signaling // *Annu. Rev. Cell Biol.* 1986. V. 2. P. 149 – 178.

Kim W.S., Dunn N.W. Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance // *Current Microbiology.* 1997, V. 35., N 1. P. 59-63.

Kirch H.H., van Berkel J., Glaczinski H., Salamini F., Gebhardt C. Structural organization, expression and promoter activity of a cold-stress-inducible gene of potato (*Solanum tuberosum* L.) // *Plant Molecular Biology.* 1997. V. 33, N 5. P. 897-909.

Khight M.R., Campbell A.K., Smith S.M., Trewavs A.J. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium // *Nature.* 1991. V. 352, N 2. P. 524 – 526.

Khight M.R., Smith S.M., Trewavs A.J. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 4967 – 4971.

Klingenberg M. Uncoupling protein – a useful energy dissipator // *J. of Bioenergetics & Biomembranes.* 1999. V. 31, N 5. P. 419-430.

Klingenberg M., Huang S.-G. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue // *BBA.* 1999. V. 1415. P. 271-296.

Klingenberg M., Winkler E., Echtay K. Uncoupling protein, H⁺ transport and regulation // *Biochemical Society Transactions.* 2001. V. 29. PT 6. P. 806-811.

Kocsy G., Brunner M., Ruegsegger A., Stamp P., Brunold C. Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivities to chilling // *Planta*. 1996. V. 198. P. 365-370.

Koga-Ban Y., Abe M., Kitagawa Y. Alteration in gene expression during cold treatment of rice plant // *Plant and Cell Physiology*. 1991. V. 32, N 6. P. 901 - 905.

Koike M., Takezawa D., Arakawa K., Yoshida S. Accumulation of 19-kDa plasma membrane polypeptide during induction of freezing tolerance in wheat suspension-cultured cells by abscisic acid // *Plant and Cell Physiology*. 1997. V. 38, N 6. P. 707-716.

Kolesnichenko A., Ostroumova E., Zykova V., Voinikov V. The comparison of proteins with immunochemical affinity to stress protein 310 kD in cytoplasmic proteins of winter rye, winter wheat, Elymus, and maize // *J. Therm. Biol.*, 1999. V. 24, N 4, P. 211-215.

Kolesnichenko A.V., Zykova V.V., Voinikov V.K. A comparison of the immunochemical affinity of cytoplasmic, mitochondrial and nuclear proteins of winter rye (*Secale cereale* L.) to a 310 kD stress protein in control plants and during exposure to cold stress // *J. Therm. Biol.* 2000a. V. 25, N 3. P. 203-209.

Kolesnichenko A.V., Zykova V.V., Grabelnych O.I., Sumina O.N., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K. Screening of mitochondrial proteins in winter rye, winter wheat, elymus and maize with an immunochemical affinity to the stress protein 310 kD and their intramitochondrial localization in winter wheat // *J. Therm. Biol.* 2000b. V. 25, N 3. P. 245-249.

Kolesnichenko A., Grabelnych O., Pobezhimova T., Voinikov V. The association of plant stress uncoupling protein CSP 310 with winter wheat mitochondria in vitro during exposure to low temperature // *Journal of Plant Physiology*, 2000c, V. 156, N 5-6, P. 805-807

Kolesnichenko A.V., Zykova V.V., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Voinikov V.K. The study of an influence of cold stress on lipid peroxidation at different mitochondrial respiratory chain complexes function in maize mitochondria // *Maize Genet. Coop. Newsletter* 2001a. V. 75. P. 25.

Kolesnichenko A.V., Pobezhimova T.P., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Voinikov V.K. An influence of cold stress on temperature of maize shoots. // *Maize Genetic Cooperation Newsletter*, 2001b, V.75. P. 24

Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Sumina O.N., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K. An influence of antiserum against winter wheat stress uncoupling protein CSP 310 on energetic activity of some plant species mitochondria. // J. Immunoassay & Immunochemistry, 2001c, V. 22, N 1, P. 75-83.

Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Zykova V.V., Koroleva N.A., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K. An influence of stress protein CSP 310 and antiserum against this protein on lipid peroxidation in cereal mitochondria // J. Immunoassay & Immunochemistry, 2001d, V. 22, N 2, P. 113-126.

Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Koroleva N.A., Pobezhimova T.P., Korzun A.M., Voinikov V.K. A difference between temperatures of hardened and non-hardened winter wheat seedlings shoots during cold stress // Annual Wheat Newsletters, 2001e, V. 47, P.158-159.

Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Koroleva N.A., Pobezhimova T.P., Korzun A.M., Zykova V.V., Voinikov V.K. The influence of different plant thermogenic systems on heat generation in shoots of winter wheat seedlings during cold stress // Annual Wheat Newsletters, 2001f, V. 47, P.169-170.

Kolesnichenko A.V., Zykova V.V., Voinikov V.K. Regulation of plant uncoupling protein CSP 310 activity in winter wheat seedlings shoots during cold stress. // Annual Wheat Newsletters, 2001g, V. 47, P.156-158.

Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Zykova V.V., Tourchaninova V.V., Koroleva N.A., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K. An influence of known plant uncoupling proteins function on lipid peroxidation in winter wheat seedlings shoots during cold stress. // Annual Wheat Newsletters, 2001h, V. 47, P.160-163.

Kolesnichenko A., Grabelnych O., Zykova V., Koroleva N., Pobezhimova T., Konstantinov Yu., Voinikov V. Influence of CSP 310 and CSP 310-like proteins from cereals on mitochondrial energetic activity and lipid peroxidation in vitro and in vivo.// BMC Plant Biology 2001i, V.1, N1, P. 1-6

Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K. An influence of Ca^{2+} on energetic activity of winter wheat mitochondria and cytochrome c release during cold stress // International

symposium “Signalling systems of plant cells”. Abstracts (Moscow, Russia, 2001, June 5-7). / ONTI, Pushchino, 2001j, P. 25.

Komatsu S., Kato A. Varietal differences in protein phosphorylation during cold treatment of rice leaves // *Phytochemistry*. 1997. V 45, N 7. P. 1329-1335.

Koornneef M., Hanhart C.J., Hilhorst H.W.M., Karssen C.M. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* 1989. V. 90, N 2. P. 463 – 469.

Koornneef M., LeonKloosterziel K.M., Schwartz S.H., Zeevaart J.A.D. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis* // *Plant Physiology and Biochemistry*. 1998. V 36, N 1-2. P. 83-89.

Korshunov S.S., Korkina O.V., Ruuge E.K., Skulachev V.P., Starkov A.A. Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O_2^- and H_2O_2 by mitochondria in the resting state // *FEBS Letters*. 1999. V. 435. P. 215 – 218.

Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // *FEBS Letters*. 1997. V. 416. P. 15-18.

Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. Ca^{2+} -induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state // *Am. J. Physiol.* 1995. V. 269. P. 141-147.

Kowaltowski A. J., Castilho R.F., Vercesi A.E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species // *FEBS Letters*. 1996a. V. 378. P. 150-152.

Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Bechara E.J.H., Vercesi A.E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations induced by Ca^{2+} ions: a proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation // *J. Biol. Chem.* 1996b. V. 271. P. 2929-2934.

Kowaltowski A.J., Costa A.D.T., Vercesi A.E. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain // *FEBS Letters*. 1999. V. 425. P. 213 - 216.

Kowaltowski A.J., Netto L.E.S., Vercesi A.E. The Thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition: evidence for the

involvement of reactive oxygen species in this mechanism // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 12766-12769.

Kowaltowski A.J., Vercesi A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress // *Free Radical Biology & Medicine*. 1999. V. 26. P. 463-471.

Kuiper P.J.C. Lipids in alfalfa in relation to cold hardiness // *Plant Physiol.* 1970. V. 45, N 6. P. 684 – 686.

Kuiper P.J.C. Role of lipids in water and ion transport. Recent advances in chemistry and biochemistry of plant lipids // *Proc. Phytochem. Soc.* 1974. V. 12, N 1. P.359 – 386.

Kugler M., Jansch L., Kruft V., Schmitz U.K., Braun H.P. Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) // *Photosynthesis Research*. 1997. V. 53. P. 35 - 44.

Kumar S., Patil B.C., Sinha S.K. Cyanide resistant respiration is involved in temperature rise in ripening mangoes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. V. 168. P. 818-822.

Kunclova D., Liska V., Svoboda P., Svobodova J. Cold-shock response of protein, RNA, DNA and phospholipid synthesis in *Bacillus subtilis* // *Folia Microbiologica*. 1995. V. 40, N 6. P. 627-632.

Labhilili M., Joudrier P., Gautier M.F. Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance // *Plant Science*. 1995. V. 112, N 2. P. 219-230.

Ladomery M. Multifunctional proteins suggest connections between transcriptional and post-transcriptional processes // *Bioessays*. 1997. V. 19, N 10. P. 903-909.

Laloi M., Klein M., Riesmeier J.W., Muller-Rober B., Fleury C., Bouilland F., Ricquier D. A plant cold-induced uncoupling protein // *Nature*. 1997. V. 389. P.135-136.

Landry J., Berner D., Ghretien P., Nicole L.M., Tanguay R.M., Marceau N. Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance // *Carder Res.* 1982. V. 42. P. 2457-2461.

Leach G.R., Krab K., Whitehouse D.G., Moore A.L. Kinetic analysis of the mitochondrial quinol-oxidizing enzymes during development of thermogenesis in *Arum maculatum* L. // *Biochem. J.* 1996. V. 317. P. 313-319.

Lee C.P. Biochemical studies of isolated mitochondria from normal and diseased tissues // *BBA*. 1995. V. 1271. P. 21 - 28.

Leenders H.J., Berendes H.D., Helmsing P.J. Nuclear-mitochondrial interactions in the control of mitochondrial respiratory metabolism // *Sub.- Cell. Biochem.* 1974. V. 3. P.119-147.

Li W.W., Hsiung Y.C., Wong V., Galvin K., Zhou Y.H., Shi Y., Lee A.S. Suppression of *grp78* core promoter element-mediated stress induction by the *dbpA* and *dbpB* (YB-1) cold shock domain proteins // *Molecular and Cellular Biology*. 1997. V. 17, N 1. P. 61-68.

Ligin A., Gordon L., Alyabyev A., Rakhmatullina D., Loseva N., Nikolayev B. Heat production and oxygen consumption of root cells with blocked fatty-acids synthesis. // *Thermochimica Acta*. 1998. V. 316. P. 155-158.

Limin A.E., Danyluk J., Chauvin L.P., Fowler D.B., Sarhan F. Chromosome mapping of low-temperature induced *Wcs120* family genes and regulation of cold-tolerance expression in wheat // *Molecular & General Genetics*. 1997. V 253, N 6. P. 720-727.

Lin C.-S., Klingenberg M. Characteristics of the isolated purine nucleotide binding protein from brown fat mitochondria // *Biochemistry*. 1982. V. 21. P. 2950-2956.

Lindquist S. The heat shock response // *Ann. Rev. Biochem.* 1986. V.55. P. 1151-1191.

Liu H., Jones T.L., Ort D.R.H. Dark chilling induces delays in the expression pattern of a 35 kD chloroplast protein: Abstr. Pap. Annu. Meet. Amer. Soc. Plant Physiologists, Portland, Ore., July 30 - Aug. 3, 1994 // *Plant Physiol.* 1994. V. 105, N 1. Suppl. P. 171.

Liu S.S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria // *Biosc. Rep.* 1997. V. 17. P. 259-272.

Los D.A., Ray M.K., Murata N. Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes for desaturases in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Molecular Microbiology*. 1997. V. 25, N 6. P. 1167 - 1175.

Loubaresse M., Paulin A. Dereuddre J. Effects of Freezing on Membrane Lipid Peroxidation of *Rhododendron* Roots (*Rhododendron* cv. Demontague, Jean-Marie) // *Compt. Rend. Acad. Sci. III*. 1991. V. 313. P. 453-459.

Lopez M.M., Makhatadze G.I. Major cold shock proteins, CspA from *Escherichia coli* and CspB from *Bacillus subtilis*, interact differently with single-stranded DNA templates // BBA. 2000. V. 1479. P. 196-202.

Lu G.H., Paul A.L., Mccarty D.R., Ferl R.J. Transcription factor veracity - is GBF3 responsible for ABA-regulated expression of *Arabidopsis* ADH // Plant Cell. 1996. V. 8, N 5. P. 847-857.

Luo J., Reed B.M. Absciscic acid-responsive protein, bovine serum albumin, and proline pretreatments improve recovery of in vitro currant shoot-tip meristems and callus cryopreserved by vitrification // Cryobiology. 1997. V. 34, N 3. P. 240 - 250.

Maia I.G., Benedetti C.E., Leite A., Turcinelli S.R., Vercesi A.E., Arruda P. AtPUMP: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein // FEBS Letters. 1998. V. 429. P. 403-406.

Makinen A., Stegemann H. Effects of low temperature on wheat leaf proteins // Phytochemistry. 1981. V. 20, N 3. P. 379-382.

Mao W., Yu X.-X., Zhong A., Li W., Brush J., Sherwood S.W., Adams S.H., Pan G. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells // FEBS letters. 1999. V. 443. P. 326-330.

Mayo B., Derzelle S., Fernandez M., Leonard C., Ferain T., Hols P., Suarez J.E., Delcour J. Cloning and characterization of cspL and cspP, two cold-inducible genes from *Lactobacillus plantarum* // Journal of Bacteriology. 1997. V. 179, N 9. P. 3039-3042.

McKersie B.D., Senaratna T., Walter M.A., Kendal E.J., Hetherington P.R. Deterioration of membranes during aging in plants: Evidence of free radical mediation // Senescence and Aging in Plants / Eds. L.D. Nooden, A.C. Leopold. Academic Press. 1988. P. 441-464.

McKersie B.D. The role of oxygen free radicals in mediating freezing and desiccation stress in plants / Active Oxygen / Oxidative Stress and Plant Metabolism. // Eds. E. Pell, K. Steffen. Am. Soc. of Plant Physiol. 1991. P. 107-118.

McKersie B.D. Plant environment interaction and stress Physiology // University of Guelph, 1996.

McKnight R.C., Hunter F.E., Oehlert W.H. Mitochondrial membrane ghosts produced by lipid peroxidation induced by ferrous iron. I. Production and general morphology // J. Biol. Chem. 1965. V. 240. P. 3439-3446.

McKown R., Kuroki G., Warren G. Cold responses of *Arabidopsis* mutants impaired in freezing tolerance // Journal of Experimental Botany. 1996. V. 47, N 305. P. 1919-1925.

Meeuse B.J.D. Thermogenic respiration in aroids // Annu. Rev. Plant Physiol. 1975. V. 26. P. 117-126.

Meeuse B.J.D., Buggeln R.G. Time, space, light and darkness in the metabolic flare-up of the *Sauromatum* appendix // Acta Bot. Neerl. 1969. V. 18. P. 159-172.

Millar A.H., Wiskich J.T., Whelan J., Day D.A. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria // FEBS Letters. 1993. V. 329. P. 259-262.

Minotti G., Aust S.D. An investigation into the mechanism of citrate-Fe²⁺-dependent lipid peroxidation // Free Radic. Biol. & Med. 1987. V. 3. P. 379-387.

Miroux M., Frossard V., Raimbault S., Ricquier D., Bouillaud F. The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins // EMBO J. 1993. V. 12, N 10. P. 3739-3745.

Mohapatra S.S., Poole R.J., Dhindsa R.S. Changes in protein patterns and translatable mRNA populations during cold acclimation of alfalfa // Plant Physiol. 1987. V. 38, N 195. P. 1607 – 1703.

Molina A., Mena M., Carbonero P., GarciaOlmedo F. Differential expression of pathogen-responsive genes encoding two types of glycine-rich proteins in barley // Plant Molecular Biology. 1997. V. 33, N 5. P. 803-810.

Moller I.M., Johnston S.P., Palmer J.M. A specific role for Ca in the oxidation of exogenous NADH by Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) mitochondria // J. Biol. Chem. 1981. V. 194. P. 487-495.

Monroy A.F., Sarhan F., Dhindsa R.S. Cold induces changes in freezing tolerance, protein phosphorylation and gene expression // Plant Physiol. 1993. V. 102, N 4. P. 1227 – 1235.

Monroy A.F., Labbe E., Dhindsa R.S. Low temperature perception in plants: Effects of cold on protein phosphorylation in cell-free extracts // FEBS Letters. 1997. V. 410, N 2-3. P. 206-209.

Monroy A.F., Sangwan V., Dhindsa R.S. Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation // Plant Journal. 1998. V. 13, N 5. P. 653-660.

Moore A.L., Proudlove M.O. Mitochondria and sub-mitochondrial particles // Isolation of membranes and organelles from plant cells / Eds. Hall T.L., Moore A.L. London: Acad. Press. 1983. P.153-184.

Moore A.L., Siedow J.N. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria // BBA. 1991. V. 1059. P. 121 – 140.

Moynihan M.R., Ordentlich A., Raskin I. Chilling-induced heat evolution in plants // Plant Physiol. 1995. V. 108. P. 995-999.

Murata N., Los D.A. Membrane Fluidity and Temperature Perception // Plant Physiology. 1997. V. 115. P. 875-879.

Muzzin P., Boss O., Giacobino J.-P. Uncoupling protein 3: its possible biological role and mode of regulation in rodents and humans // J. of Bioenergetics & Biomembranes. 1999. V. 31, N 5. P. 467-473.

Nantes I.L., Fagian M.M., Catisti R., Arruda P., Maia I.G., Vercesi A.E. Low temperature and aging-promoted expression of PUMP in potato tuber mitochondria // FEBS Letters. 1999. V. 457. P. 103-106.

Negre-Salvayre A., Hirtz C., Carrera G. Cazenave R., Trolly M., Salvayre R., Penicaud L., Casteilla L. A role for the uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial peroxide generation // FASEB J. 1997. V. 11. P. 809-815.

Neppe BB, Bachofen R Induction of stress proteins in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*// FEMS Microbiology Letters, 1997, V 153, N 1, P 173-180.

Nicholls D.G., Rial E. A history of the first uncoupling protein, UCP1 // J. of Bioenergetics & Biomembranes. 1999. V. 31, N 5. P. 399-406.

Nover L., Hellmund D., Neuman D., Scharf K.-D., Serfling E. Heat shock response of eucaryotic cells // Biol. Zentrablatt. Band. 1984. V.103. P.357-435.

Ohta S., Usami S., Ueki J., Kumashiro T., Komari T., Burnell J.N. Identification of the amino acid residues responsible for cold tolerance in

Flaveria brownii pyruvate,orthophosphate dikinase // FEBS Letters. 1997. V 403, N 1. P. 5-9.

Ordentlich A., Linzer R.A., Raskin I. Alternative respiration and heat evolution in plants // Plant Physiol. 1991. V. 97. P. 1545-1550.

Orr W., White T.C., Iu B., Robert L., Singh J. Characterization of a low-temperature-induced cDNA from winter *Brassica napus* encoding the 70 kDa subunit of tonoplast ATPase // Plant Molecular Biology. 1995. V. 28, N 5. P. 943-948.

Oslung C.R., Li P.H. Nucleotide rations and quantitative RNA changes in potato plants elicited by photoperiod and temperature // Plant & Cell Physiol. 1972. V. 13, N 1. P. 201 – 205.

Paldi E., Racz I., Lasztity D. Effect of low temperature on the rRNA processing in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Journal of Plant Physiology. 1996. V 148, N 3-4. P. 374-377.

Palmer J.M., Ward J.A. Encyclopedia of plant physiology, V. 18 / Eds Douce R., Day D.A. Berlin: Springer-Verlad, 1985. P. 173.

Palou A., Pico C., Bonet M. L., Oliver P. The uncoupling protein, thermogenin // Int. J. Biochem.and Cell Biology. 1998. V. 30. P.7-11.

Panoff J.M, Corroler D, Thammavongs B, Boutibonnes P Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in a mesophilic gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2 // Journal of Bacteriology. 1997. V 179, N 13. P 4451-4454.

Parkin K.L., Marangoni A., Jackman R., Yada R., Stanley D. Chilling injury. A review of possible mechanisms // J. Food Biochem. 1989. V. 13. P. 127 - 153.

Pastore D., Fratianni A., Di Pede S., Passarella S. Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. // FEBS Letters. 2000. V. 470. P. 88-92.

Patterson B.D., Payne L.A., Chen Y., Gracham D. An inhibitor of catalase induced by cold in chilling-sensitive plans // Plant Physiol. 1984. V. 76, N 4. P. 1014-1018.

Pearce R.S. Dunn M.A. Rixon J.E. Harrison P. Hughes M.A. Expression of cold-inducible genes and frost hardiness in the crown meristem of young barley

(*Hordeum vulgare* L. cv. Igri) plants grown in different environments // Plant Cell & Environment. 1996. V 19, N3. P.275-290.

Perl D., Welker C., Schindler T., Schroder K., Marahiel M.A., Jaenicke R., Schmid F.X. Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins // Nature Structural Biology. 1998. V. 5, N 3. P. 229-235.

Perras M., Sarhan F. Synthesis of freezing tolerance proteins in leaves, crown, and roots during cold acclimation of wheat // Plant Physiol. 1989. V.89, N 2. P. 577 - 585.

Petit P.X., Susin S.A., Zamzami N., Mignotte B., Kroemer G. Mitochondria and programmed cell death: back to the future // FEBS Letters. 1996. V. 369. P. 7-13.

Pihakaskimaunsbach K., Griffith M., Antikainen M., Maunsbach A.B. Immunogold localization of glucanase-like antifreeze protein in cold acclimated winter rye // Protoplasma. 1996. V. 191, N 3-4. P. 115-125.

Pfanner N., Craig E.A., Honlinger A. Mitochondrial preprotein translocase // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1997. V. 13. P. 25 – 51.

Pobezhimova T.P., Voinikov V.K., Varakina N.N. Inactivation of complex I of the respiratory chain of maize mitochondria incubated *in vitro* by elevated temperature // J. of Thermal Biology. 1996. V. 21. P. 283 - 288.

Pobezhimova T., Grabelnykh O., Kolesnichenko A., Voinikov V. The comparison of uncoupling activity of constitutively synthesized and stress-induced forms of winter rye stress uncoupling protein CSP 310 // J. Therm. Biol. 2001. V. 26, N 2. P. 95-101.

Polisensky D.H., Braam J. Cold-shock regulation of the *Arabidopsis* TCH genes and the effects of modulating intracellular calcium levels // Plant Physiology. 1996. V 111, N 4. P. 1271-1279.

Popov V.N., Simonian R.A., Skulachev V.P., Starkov A.A. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria // FEBS Letters. 1997. V. 415. P. 87-90.

Porter R.K. Mitochondrial proton leak: a role for uncoupling proteins 2 and 3? // BBA. 2001. V. 1504. P. 120-127.

Poysa V.W. The genetic control of low temperature ice encasement, and flooding tolerances by chromosome 5A, 5B and 5 D in wheat // Cereal Res. Comm. 1984. V.12. P.135-141.

Pruvot G., Massimino J., Peltier G., Rey P. Effects of low temperature, high salinity and exogenous ABA on the synthesis of two chloroplastic drought-induced proteins in *Solanum tuberosum* // Physiologia Plantarum. 1996. V 97, N 1. P. 123-131.

Purvis A.C., Shewfelt R.L., Gegogine J.W. Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit // Physiol. Plant. 1995. V. 94. P. 743 - 749

Racz I., Kovacs M., Lasztity D., Veisz O., Szalai G., Paldi E. Effect of short-term and long-term low temperature stress on polyamine biosynthesis in wheat genotypes with varying degrees of frost tolerance // Journal of Plant Physiology. 1996. V 148, N 3-4. P. 368-373.

Raimbault S., Dridi S., Denjean F., Lachuer J., Couplan E., Bouillaud F., Bordas A., Duchamp C., Taouis M., Ricquier D. An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds // Biochem. J. 2001 V. 353. P. 441-444.

Raison J.K., Lyons J.M. Chilling injury: a plea for uniform terminology // Plant Cell Environ. 1986. V. 9. P. 685.

Reed J.C. Cytochrome c: can't live with it – can't live without it // Cell. 1997. V. 91. P.559-562.

Rhoads D.M., McIntosh L. Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 1131-1139.

Rhoads D.M., McIntosh L. The salicylic acid-inducible alternative oxidase gene *aox1* and genes encoding pathogenesis-related proteins share regions of sequence similarity in their promoters // Plant Mol. Biol. 1993. V. 21. P. 615-624.

Rich P. Quinol oxidation in *Arum maculatum* mitochondria and its application to the assay, solubilization and partial purification of the alternative oxidase // FEBS Letters. 1978. V. 96. P. 252-256.

Rich P.R., Bonner W.D. Jr. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria // Arch. Biochem. Biophys. 1978. V. 188. P. 206-213.

Richter C., Gogvadze V., Laffranchi R., Schlapbach R., Schweizer M., Suter M., Walter P., Yaffee M. Oxidants in mitochondria: from physiology to disease // BBA. 1995. V. 1271. P. 67 - 74.

Ricquier D., Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP // Biochem. J. 2000. V. 345. P.161-179.

Ricquier D., Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance // J. Physiol. 2000b. V. 529. P. 3-10.

Roberts D.W.A. Chromosomes in "Cadet" and "Rescue" wheats caring loci for cold hardiness and vernalization response // Canad. J. Genet. Cytol. 1986. V. 28, N 6. P.991-997.

Robertson A.J., Gusta L.V., Reaney M.J.T., Ishikawa M. Identification of proteins correlated with increased freezing tolerance in brome grass (*Bromus inermis* Leyss. cv. Manchar) cell cultures.// Plant Physiol. 1988. V. 86, N 2. P. 344-347.

Robertson A.J., Weninger A., Wilen R.W., Fu Ping, Gusta L.V. Comparison of dehydrin gene expression and freezing tolerance in *Bromus inermis* and *Secale cereale* grown in controlled environments, hydroponics, and the field.// Plant Physiol. 1994. V. 106, N3. P. 1213-1216.

Rochat E., Therrien H.P. Etude des proteines des bles resistant, Kharkov, et sensible, Selkirk, au cours de l'endurcissement au froid. 2. Proteines solubles et proteines des chloroplastes et des membranes // Can. J. Bot. 1975. V. 53, N 21. P.2417-2424.

de la Roche I.A., Andrews C.J., Pomeroy M.K., Weinberger P., Kates M. Lipid changes in winter wheat seedlings (*T. aestivum*) at temperatures inducing cold hardiness.// Can. J.Bot. 1972. V.50, N 12. P. 2401-2409.

de la Roche I.A., Pomeroy M.K., Andrews C.J. Changes in fatty acid composition in wheat cultivars of contrasting hardiness // Cryobiology. 1975. V. 12, N 5. P. 506 – 512.

Rorat T., Irzykowski W. Changes in mRNA population during cold acclimation in two potato lines of *Solanum tuberosum* differing by their cold hardiness // Acta Physiologiae Plantarum. 1996. V 18, N 1. P. 25-32.

Rorat T., Irzykowski W., Grygorowicz W.J. Identification and expression of novel cold induced genes in potato (*Solanum soganandinum*) // Plant Science. 1997. V. 124, N 1. P. 69-78.

Rougvie A.E., Lis J.T. The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D.melanogaster* is transcriptionally engaged // Cell. 1988. V.54. P.795-804.

Ruggeri B., Gray R., Watkins T., Tomlins R. Effects of low-temperature acclimation and oxiden stress on tocoferol production in *Euglena gracilis* Z // App. And Environ. Microbiol. 1985. V. 50. P. 1404-1408.

Rustin P., Dupont J., Lance C. Involvement of lipid peroxy radicals in the cyanide-resistant electron transport pathway // Physiol. Veg., 1984. V.22, N 5. P. 643-663.

Ryu S.B., Costa A., Xin Z.G., Li P.H. Induction of cold hardiness by salt stress involves synthesis of cold- and abscisic acid-responsive proteins in Potato (*Solanum commersonii* Dun.) // Plant & Cell Physiology. 1995. V 36, N 7. P. 1245-1251.

Ryynanen L. Effect of abscisic acid, cold hardening, and photoperiod on recovery of cryopreserved in vitro shoot tips of silver birch // Cryobiology. 1998. V. 36, N 1. P. 32-39.

Saezvasquez J., Raynal M., Delseny M. A rapseed cold-inducible transcript encodes a phosphoenolpyruvate carboxykinase. // Plant Physiology. 1995. V. 109, N 2. P. 611-618.

Salzman R.A., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Ashworth E.N., Bordelon B.P. Programmed accumulation of LEA-like proteins during desiccation and cold acclimation of overwintering grape buds // Plant Cell & Environment. 1996. V 19, N6. P. 713-720.

Samec S., Seydoux J., Dulloo A.G. Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: Mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate? // The FASEB Jornal. 1998. V. 12. P. 715-724.

Santarius K.A., Heber U. Das Verhalten von Hill-Reaction und Photophosphorylierung isolierten Chloroplasten in Abhandigkeit vom Wassergehalt.// Planta. 1967. Bd.73, H.2. S.109-137.

Sarhan F., D'Aoust M.J. RNA synthesis in spring and winter wheat during cold acclimation // Physiol. Plant. 1975. V.35, N1. P. 62 – 65.

Sarhan F., Chevrier N. Regulation of RNA synthesis by DNA-dependent RNA polymerases and RNases during cold acclimation in winter and spring wheat // *Plant Physiol.* 1985. V. 78, N 2. P. 250 – 255.

Sarhan F., Perras M. Accumulation of a high molecular weight protein during cold hardening of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Cell Physiol.* 1987. V.28, N 7. P. 1173 - 1179.

Sarhan F., Ouellet F., VazquezTello A. The wheat wcs120 gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals // *Physiologia Plantarum.* 1997. V. 101, N 2. P. 439-445.

Sasaki K., Sasaki S. Low-temperature dependent ribonuclease in chromatin of winter wheat seedlings // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1976. V. 72, N 3. P. 850 - 858.

Sato N., Wada A. Disruption analysis of the gene for a cold-regulated RNA-binding protein, rbpA1, in *Anabaena*: Cold-induced initiation of the heterocyst differentiation pathway // *Plant and Cell Physiology.* 1996. V 37, N 8. P. 1150 - 1160.

Scheffler I.E. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives // *Mitochondrion.* 2000. V. 1. P. 3-31.

Scherphor G.L., Scarpa A., Toorenenbergen A. The effect of localanesthetics on the hydrolysis of free and membrane-bound phospholipids catalysed by various phospholipases. // *BBA.* 1972. V. 270. P. 226-270.

Schindler T., Perl D., Graumann P., Sieber V., Marahiel M.A., Schmid F.X. Surface-exposed phenylalanines in the RNP1/RNP2 motif stabilize the cold-shock protein CspB from *Bacillus subtilis* // *Proteins - Structure Function and Genetics.* 1998. V. 30, N 4. P. 401-406.

Schneider A., Salamini F., Gebhardt C. Expression patterns and promoter activity of the cold-regulated gene ci21A of potato // *Plant Physiology.* 1997. V 113, N 2. P. 335-345.

Scholtissek C. Nucleotide metabolism in tissue culture cells at low temperatures 1. phosphorylation of nucleosides and deoxynucleosides *in vivo* // *BBA.* 1967. V. 145, N2. P. 228 – 237.

Shakya S., A rawal V.P. Rubisco screening for cold tolerance in rice: Jt. Annu. meet. Amer. Soc. Plant Physiol., Can. Soc. Plant Physiol., Minneapolis,

Minn., July 31 - Aug. 4, 1993: Sci. program; Abstr. Pap. // Plant Physiol. 1993. V. 102, N 1. Suppl.. P. 80.

Sharp P.A., Sugden B., Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose // Biochemistry. 1973. V. 12. P. 3055 – 3059.

Shewfelt R.L., Erickson M.E. Role of lipid peroxidation in the mechanism of membrane-associated disorders in edible plant tissue // Trends in Food Sci. Technol. 1991. V. 2, P. 152 - 154.

Siedow J.N., Umbach A.L. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity // BBA. 2000. P. 432-439.

Sieg F., Schroder W., Schmitt J.M., Hinch D.K. Purification and characterization of a cryoprotective protein (cryoprotectin) from the leaves of cold-acclimated cabbage // Plant Physiology. 1996. V. 111, N 1. P. 215-221.

Siminovitch D., Rheume B., Pomeroy K., Lepage M. Phospholipid, protein and nucleic acid increases in protoplasm and membrane structures associated with development of extreme freezing resistance in black locust cells // Cryobiology. 1968. V. 5, N 1. P. 202 – 225.

Siminovitch D., Cloutier Y. Twenty-four-hour induction of freezing and drought tolerance in plumules of winter rye seedlings by desiccation stress at room temperature in the dark // Plant Physiol. 1982. V. 69, N 1. P. 250 - 255.

Simonyan R.A., Jimenez M., Ceddia R.B., Giacobino J-P., Muzzin P., Skulachev V.P. Cold-induced changes in the energy coupling and the UCP3 level in rodent skeletal muscles // BBA. 2001. V. 1505. P. 271-279.

Skriver K., Mundy J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. // Plant Cell. 1990. V. 2, N 6. P. 503 - 512.

Skulachev V.P. Why are mitochondria involved in apoptosis? // FEBS Letters. 1996. V. 397. P. 7-10.

Skulachev V.P. Lowering of the intracellular O₂ concentration as a special function of respiratory systems of the cells // Biochemistry (Moscow), 1994. V. 59. P. 1910 – 1912.

Skulachev V.P. Cytochrome *c* in the apoptotic and antioxidant cascades // FEBS Letters. 1998. V. 423. P. 275-280.

Skulachev V.P. Anion Carriers in Fatty Acid-Mediated Physiological Uncoupling // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999. V. 31. N. 5. P. 431-445.

Sluse F.E., Almeida A.M., Jarmuszkiewicz W., Vercesi A.E. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria // *FEBS Letters.* 1998. V. 433. P. 237-240.

Smallwood M., Worrall D., Byass L., Elias L., Ashford D., Doucet Ch.J., Holt Ch., Telford J., Lillford P., Bowles D.J. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*) // *Biochem. J.* 1999. V. 340. P. 385-391.

Smolenska G., Kuiper P.J. Effect of low temperature upon lipid and fatty acid composition of roots and leaves of winterrape plants.// *Physiol. Plant.* 1977. V.41, N.1. P. 29-35.

Solecka D. Kacperska A. Phenylalanin ammonia-lyase activity in leaves of winter oilseed rape plants as affected by acclimation of plants to low temperature // *Plant Physiology & Biochemistry.* 1995. V 33, N 5. P. 585-591.

Stockinger E.J., Gilmour S.J., Thomashow M.F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997. V 94, N 3. P. 1035-1040.

Stuart J.A., Brindle K.M., Harper J.A., Brand M.D. Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999. V. 31. N.5. P. 517-525.

Stuart J.A., Cadenas S., Jekabsons M.B., Roussel D., Brand M.D. Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues // *BBA.* 2001. V. 1504. P. 144-158.

Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Daugas E., Hong-Gang W., Geley S., Fassy F., Reed J.C., Kroemer G. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis // *J. Exp. Med.* 1997. V. 186. P. 25-37.

Sutka J., Kovacs G. Reciprocal monosomic analysis of frost resistance on chromosome 5A in wheat // *Euphytica.* 1985. V.34. P.367-370.

Sutton H.C., Winterbourn C.C. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions // *Free Radic. Biol. Med.* 1989. V. 6. P. 53-60.

Suzuki T., Kaneko M., Harada T. Increase in freezing resistance of excised shoot tips of *Asparagus officinalis* L by preculture on sugar-rich media // *Cryobiology*. 1997. V 34, N 3. P. 264-275

Svenning M.M., Rosnes K., Junttila O. Frost tolerance and biochemical changes during hardening and dehardening in contrasting white clover populations // *Physiologia Plantarum*. 1997. V 101, N 1. P. 31-37.

Takahashi R., Shimosaka E. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes in soybean // *Plant Science*. 1997. V 123, N 1-2. P. 93-104.

Tangeras A., Flatmark T., Bäckström D., Ehrenberg A. Mitochondrial iron content not bound in heme and iron-sulfur centers // *BBA*. 1980. V. 589. P. 162-175.

Tanguay R.M. Genetic regulation during heat shock and function heat shock proteins: a review // *Can. J. Biochem. and Cell Biol.* 1983. V.61, N 6. P. 387 – 394.

Tao R.L., Khan A.A. Increases in activities of aminoacyl-tRNA synthetases during cold treatment of dormant pear embryo // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1974. V.59, N 2. P. 764 – 770.

Testi M.G., Croce R., PolverinoDeLaureto P., Bassi R. A CK2 site is reversibly phosphorylated in the photosystem II subunit CP29 // *FEBS Letters*. 1996. V. 399, N 3. P. 245-250.

Teutonico R.A., Yandell B., Satagopan J.M., Ferreira M.E., Palta J.P., Osborn T.C. Genetic analysis and mapping of genes controlling freezing tolerance in oilseed brassica. // *Molecular Breeding*. 1995. V. 1, N 4. P. 329-339.

Thomas T., Cavicchioli R. *Archaeal* cold-adapted proteins: structural and evolutionary analysis of the elongation factor 2 proteins from psychrophilic, mesophilic and thermophilic methanogenes // *FEBS Letters*. 1998. V. 439. P. 281-286.

Tseng M.J., Li P.H. Alterations of gene expression in potato (*Solanum commersonii*) during cold acclimation // *Physiol. Plant*. 1990. V. 78. P. 538 – 547.

Turrens J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain // Biosc. Rep. 1997. V. 17. P. 3-8.

Turrens J.F., Alexandre A., Lehninger A.L. Ubisemiquinone is the donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria // Arch. Biochem. Biophys. 1985. V. 237. P. 408-414.

Turrens J.F., Boveris A. Generation of the superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria // Biochem. J. 1980. V. 191. P. 421-427.

Turrens J.F., Freeman B.A., Crapo J.D. Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes // Arch. Biochem. Biophys. 1982. V. 217. P. 411-421.

Uemura M., Yoshida S. Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedlings *Secale cereale* L. cv. Puma // Plant Physiol. 1984. V. 75. P. 818-826.

Uemura M., Gilmour S.J., Thomashov M.F., Steponkus P.L. Effects of COR 6.6 and COR 15am polypeptides encoded by COR (cold-regulated) genes of *Arabidopsis thaliana* on the freeze-induced fusion and leakage of liposomes // Plant Physiology. 1996. V. 111, N 1. P. 313-327.

Umbach A.L., Siedow J.N. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity // Plant Physiol. 1993. V. 103. P. 845-854.

Vanlerberghe G.C., McIntosh L. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. // Plant Physiol. 1992. V. 100. P. 115-119.

Vanlerberghe G.C., McIntosh L. Alternative oxidase: from gene to function // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. V. 48. P. 703-734.

Vanzee K., Baertlein D.A., Lindow S.E., Panopoulos N., Chen T.H.H. Cold requirement for maximal activity of the bacterial ice nucleation protein INAZ in transgenic plants // Plant Molecular Biology. 1996. V. 30, N 1. P. 207-211.

Vasina J.A., Baneyx F. Recombinant protein expression at low temperatures under the transcriptional control of the major *Escherichia coli* cold shock promoter *cspA* // Applied & Environmental Microbiology. 1996. V. 62, N 4. P. 1444-1447.

Vercesi A. E., Martins I. S., Silva M. A. P., Leite H. M. F., Cuccovia I.M., Chaimovich H. PUMPing Plants // *Nature*. 1995. V. 375. P.24.

Vercesi A.E., Kowaltowski A.J., Grijalba M.T., Meinicke A.R., Castilho R.F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition // *Biosci. Rep.* 1997. V. 17. P. 43-52.

Vercesi A.E. The discovery of an uncoupling mitochondrial protein in plants // *Biosci. Rep.* 2001. V. 21. N. 2. P. 195-200.

Vierling E. The role of heat shock proteins in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1991. V. 42. P. 579-620.

Vigue J., Li P.H., Oslund C.R. The effect of low temperature upon the polyribosome nucleic acid and protein content of potato leaves // *Plant and Cell Physiol.* 1974. V.15, N 6. P. 1055-1062.

Voinikov V., Pobezhimova T., Kolesnichenko A., Varakina N., Borovskii G. Stress protein 310 kD affects the energetic activity of plant mitochondria under hypothermia // *J. of Thermal Biology.* 1998. V. 23. P. 1 - 4.

Vojnikov V., Korzun A., Pobezhimova T., Varakina N. Effect of cold shock on the mitochondrial activity and on the temperature of winter wheat seedlings // *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 1984.V. 179. P. 327 – 330.

Volkova R.I., Alekseeva T.F., Drozdov S.N. Effect of retardants on the early stages of cucumber acclimation to chilling temperatures // *R. Journal of Plant Physiol.* 1996. V 43, N 4. P. 510-514.

Walker M.A., McKersie B.D. Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato // *J. Plant Physiol.* 1993. V. 141. P. 234-239.

Wallis J.G., Wang H.Y., Guerra D.J. Expression of a synthetic antifreeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures // *Plant Molecular Biology.* 1997. V. 35, N 3. P. 323-330.

Watabe S., Hiroi T., Yamamoto Y., Fujioka Y., Hasegawa H., Yago N., Takahachi S.Y. SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 249. P. 52-60.

Watanabe A., Nakazono M., Tsutsumi N., Hirai A. AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* 1999. V. 40, N 11. P. 1160-1166.

Webb MS, Gilmour SJ, Thomashow MF, Steponkus PL. Effects of COR 6.6 and COR 15am polypeptides encoded by COR (cold-regulated) genes of *Arabidopsis thaliana* on dehydration-induced phase transitions of phospholipid membranes // *Plant Physiology*, - 1996, - V 111, N 1.- P. 301-312.

Weidner M., Combrink G. Phenotypical temperature adaptation of protein synthesis in wheat seedlings. Time curves for readaptation // *Plant Physiol.* 1979. V. 64, N1. P.144-149.

Weidner M., Heuel R. Indirect evidence for conformational change in prorelin from wheat seedlings, preadapted to chilling and high temperature // *Z. Pflanzenphysiol.* 1979. V. 94, N 5. P. 387-398.

Weidner M., Mathee C., Schmitz F.K. Phenotypical temperature adaptation of protein synthesis in wheat seedlings. Qualitative aspects. Involvement of aminoacyl-tRNA-ligases // *Plant Physiol.* 1982. V. 69. P.1281-1288.

Weidner M., Ziemens C. Preadaptation of protein synthesis in wheat seedlings to high temperature // *Plant Physiol.* 1975. V. 56, N 5. P.590-594.

Welbaum G.E., Bian D., Hill D.R., Grayson R.L., Gunatilaka M.K. Freezing tolerance, protein composition, and abscisic acid localization and content of pea epicotyl, shoot, and root tissue in response to temperature and water stress // *Journal of Experimental Botany.* 1997. V 48, N 308. P 643-654

Welling A., Kaikuranta P., Rinne P. Photoperiodic induction of dormancy and freezing tolerance in *Betula pubescens*. Involvement of ABA and dehydrins // *Physiologia Plantarum.* 1997. V. 100, N 1. P. 119-125.

Welin B.V., Olson A., Palva E.T. Structure and organization of two closely related low-temperature-induced DHN/LEA/RAB-like genes in *Arabidopsis thaliana* L Heynh // *Plant Molecular Biology.* 1995. V 29, N 2. P. 391-395.

Willemot C. Stimulation of phospholipid biosynthesis during frost hardening of winter wheat.// *Plant Physiol.* 1975. V.55, N.2. P. 356-359.

Wilson, R.H., Smith B.N. Uncoupling of *Sauromatum spadix* mitochondria as a mechanism of thermogenesis // *Z. Pflanzenphysiol.* 1971. V. 65, N 2. P. 124-129.

Xu W., Campbell P., Vargheese A.K., Braam J. The *Arabidopsis* XET-related gene family - environmental and hormonal regulation of expression // *Plant Journal.* 1996. V 9, N 6. P. 879-889.

Yang J.S., Brown G.N. Isoaccepting transfer ribonucleic acids during chilling stress in soybean seedlings hypocotyls // *Plant Physiol.* 1974. V.53, N 5. P. 694 – 698.

Yaneva I., Mack G., Vunkovaradeva R., Tischner R. Changes in nitrate reductase activity and the protective effect of molybdenum during cold stress in winter wheat grown on acid soil // *Journal of Plant Physiology.* 1996. V. 149, N 1-2, P. 211-216.

Yukawa T., Kobayashi M., Watanabe Y., Yamamoto S. Studies on fructan accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Japanese Journal of Crop Science.* 1995. V. 64, N 4. P. 801-806.

Zhou B.L., Arakawa K., Fujikawa S., Yoshida S. Cold-induced alterations in plasma membrane proteins that are specifically related to the development of freezing tolerance in cold-hardy winter wheat // *Plant Cell Physiol.* 1994. V. 35. P. 175-182.

Zoratti M., Szabo I. The mitochondrial permeability transition // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1241. P. 139-176.

Zykova V.V., Grabelnych O.I., Antipina A.I., Koroleva N.A., Vladimirova S.V., Kolesnichenko A.V., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K. Plant stress-related uncoupling protein CSP 310 caused lipid peroxidation in winter wheat mitochondria under chilling stress // *J. Term. Biol.* 2000. V. 25, N 4. P. 323-327.

Zykova V.V., Grabelnych O.I., Koroleva N.A., Pobezhimova T.P., Konstantinov Yu.M., Kolesnichenko A.V., Voinikov V.K. An immunochemically related influence to plant stress uncoupling protein CSP 310 proteins in some cereal species on the energetic activity and lipid peroxidation of mitochondria in vitro // *Annual Wheat Newsletters*, 2001a, V. 47, P. 167-169.

Zykova V.V., Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Turchaninova V.V., Voinikov V.K. The influence of cold stress on the peroxidation of lipids in the respiratory chain in the mitochondria of different winter wheats // *Annual Wheat Newsletters*, 2001b, V. 47, P. 164-165.