

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ им. Н.Г. ХОЛОДНОГО

И.В. Косаковская

***СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ
РАСТЕНИЙ***

КИЕВ 2008

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	6
Глава 1. История открытия	9
Глава 2. Классификация и локализация	16
Глава 3. Функции.....	25
Глава 4. Низкомолекулярные БТШ растений.....	38
Глава 5. Влияние гамма-радиации на биосинтез стрессовых белков	53
Глава 6. Рубиско и стрессовые белки	79
Глава 7. Влияние фитогормонов – АБК, ИУК и цитокининов на биосинтез стрессовых белков	94
Заключение.....	108
Литература	111

Введение

Многоуровневая и сложная структурно-функциональная организация высших растений, в свою очередь, обуславливает существование многоуровневой системы, способной обеспечить ответ и адаптацию к стрессовым нагрузкам каждого иерархического структурно-функционального уровня, а именно: растения в целом, его отдельных органов, тканей, клеток, их структурных и молекулярных компонентов.

Общим в ответе всех живых организмов на стрессовые воздействия является экспрессия стресс-зависимых генов и белков, активность которых направлена на защиту клеток и поддержку гомеостаза. Такая реакция наблюдается под влиянием экстремальных температур, ультрафиолетового и радиоактивного облучения, токсичных веществ, изменений водного режима, фармакологически активных молекул, мутагенов и т.д. Выделяют несколько главных этапов в ответе клеток на стресс: образование сигналов, которые передаются в ядро и взаимодействуют с генами, изменения их экспрессию; индукция или репрессия синтеза специфических мРНК и их трансляции; образование стрессовых белков (Войников, Иванова, 1988; Косаківська, Гудкова, 2002а; Kimpel, Key, 1985; Vierling, 1991). Исследование характера ответа растений на температурные стрессы выявило, что реакция клеток является быстрой и транзитной, а функция стрессовых белков реализуется в первые часы действия экстремальных факторов до момента включения системы специализированной адаптации (Кузнецов и др., 1987).

Известно, что продуктивность растений зависит от их способности к быстрому ответу и приспособлению к действию стресса (Rassow et al., 1997). Белки, синтезируемые высшими растениями в ответ на стрессовые воздействия, достаточно детально охарактеризованы (Cooper, Но, 1987; Key et al., 1985; Sachs, Но, 1986). Стressовые белки синтезируются в количестве до 2 % от белков, образующихся в нормальных условиях, причем их синтез носит временный характер. Обычно он происходит в течение нескольких часов от момента стресса и чаще всего в две фазы: синтез так называемых “ранних” и “поздних” белков (Блемхман, 1988).

Особенностью растительных клеток, отличающей их от других организмов — прокариот и эукариот, является синтез низкомолекулярных полипептидов с мол. массой 15–18 кД (Basha et al., 2004). Реакция растений на стресс, на фоне общей тенденции угнетения синтеза нормальных белков и усиления — стрессовых, зависит от параметров негативного воздействия, а именно: его продолжительности, диапазона, интенсивности и т.п. Кроме того, характер синтеза стрессовых полипептидов определяется самой природой неблагоприятного фактора. Так, среди стрессовых белков, синтезируемых в растительной клетке в ответ на температурный и водный шок, есть как общие, так и специфические. Образование стрессовых полипептидов ассоциируется с развитием устойчивости растений, т.е. рассматривается в ракурсе адаптационных изменений на макромолекулярном уровне. На сегодня наиболее глубоко исследована реакция растительной клетки на тепловой стресс.

Сравнительное изучение реакции белоксинтезирующей системы на стрессы у различных живых организмов выявило универсальность и консерватизм этого явления. Изменения в функционировании генетической системы очень сходны у различных эукариот, а в некоторых случаях идентифицированы и у прокариот. Эволюционный консерватизм в реакции белоксинтезирующей системы живых организмов на стресс четко свидетельствует, что биосинтез стрессовых белков является фундаментальным и жизненно необходимым процессом, способствующим приспособлению и выживанию организмов в экстремальных условиях.

В настоящей монографии предпринята попытка проанализировать современные представления о биосинтезе и функциях стрессовых белков растений, их взаимосвязи с процессом фотосинтеза, фитогормональным балансом, роли в формировании адаптационного синдрома, обеспечении репарационных процессов, развитии устойчивости.

ГЛАВА 1

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ

Способность растительных клеток и организмов в целом реагировать соответствующим образом на внешние воздействия является необходимым компонентом существования и приспособления к условиям окружающей среды. Метаболизм растений — это сложная система физиолого-биохимических процессов, связанных между собой и зависящих от внешних факторов. Скорость и направленность всех метаболических реакций точно скоординированы и обеспечивают присущие обмену веществ устойчивость и подвижность.

Естественно было предположить, что негативный фактор, воздействуя на четко организованную систему, способен дезорганизовать и даже разрушить ее. Однако в стрессовых условиях (гипертермия, аноксия, действие отравляющих веществ и пр.) живые организмы проявляют удивительную способность приспособливаться к негативным воздействиям. Стресс растительного организма может быть вызван биологическими раздражителями (возбудители болезней, микрорганизмы и др.), физическими (недостаточное либо чрезмерное увлажнение, избыточное освещение, экстремальная температура, облучение), химическими (действие солей, газов, гербицидов, инсектицидов, фунгицидов), механическими и другими факторами. Термин “стресс” (англ. *stress* — давление, напряжение) ввел в биологическую науку Г. Селье в 1936 году для харак-

теристики однотипной реакции, возникающей в организме под влиянием различных раздражителей. Состояние, в котором находится организм при подобных обстоятельствах, рассматривается как стрессовое и продолжается от начала до конца действия стрессора (Селье, 1960, 1972). К стрессорам относятся сильные кратковременные воздействия факторов окружающей среды, вызывающие изменения в последовательности стадий и реакций, заканчивающиеся либо приспособлением живой системы к повреждающему воздействию, либо истощением резервных сил организма и его гибелью. Как правило, адаптационные перестройки метаболических процессов являются движущей силой эволюции организмов и основой выживания в окружающей среде (Селье, 1982; Steponkus, 1981).

Для понимания механизмов адаптации живых организмов к неблагоприятным воздействиям исследуются ответные реакции на различных иерархичных уровнях, начиная от популяционного и заканчивая молекулярным. Особое внимание уделяется изучению особенностей биосинтеза белков в стрессовых условиях.

Первые сведения об обратимых изменениях в белковой системе живых клеток под действием высоких температур (до 45 °C) появились в 60-х годах XX ст. Итальянский исследователь Ф. Ритоза обнаружил, что под влиянием температуры 37 °C образуются гигантские пуфы хромосом дрозофилы (Ritossa, 1962). В дальнейшем было установлено, что это явление связано с синтезом *de novo* специфической группы белков, которые получили название “белки теплового шока”

(БТШ) (Ashburner, Bonner, 1979). На сегодня синтез БТШ в ответ на тепловой стресс идентифицирован у широкого спектра организмов — от бактерии до человека (Schlesinger et al., 1982).

Очевидно, что температура внешней среды является детерминирующим фактором распространения растений в природе. Реакцию белковой системы высших растений на тепловой шок начали изучать в начале 80-х годов XX ст. (Войников и др. 1984, 1986; Altschuler, Mascarenhas, 1982; Kimpel, Key, 1985; Tanguay, 1983; и др.). В результате исследований, проведенных в ряде лабораторий мира, детально изучен спектр БТШ различных высших растений, в частности сои, кукурузы, табака, моркови, лилии, хлопчатника, традесканции и др. Синтез БТШ начинается уже через 15 мин после действия теплового шока и длится 6–8 часов. Максимальный синтез БТШ происходит в течение первых 2,5 часов. В результате теплового шока образуются высоко- и низкомолекулярные белки. Большинство БТШ, синтезированных в растениях, в отличие от других живых организмов, относятся к разряду низкомолекулярных (мол. масса 15–18 кД). Высокомолекулярные БТШ растений менее разнообразны по сравнению с БТШ насекомых, млекопитающих и дрожжей. В процессе биосинтеза БТШ задействованы ядерная и цитоплазматическая генетические системы, сами же белки локализованы преимущественно в цитоплазме, образуя гранулы теплового шока (Kloppstech et al., 1985; Nover, Scharf, 1984; Vierling et al., 1986). Гранулы теплового шока позволяют растению сохранять

мРНК, необходимые для быстрого перехода к репарационным процессам.

Образованию БТШ предшествует синтез *de novo* мРНК теплового шока, который наступает в первые 3–5 мин стрессового воздействия и продолжается от 1 до 4-х часов, после чего постепенно снижается. Уменьшение уровня мРНК регулируется интенсивностью синтеза БТШ (Key et al., 1985; Kimpel, Key, 1985). В целом синтез БТШ предваряется рядом последовательных процессов: снижением матричной активности хроматина, угнетением активности РНК-полимераз, изменением скорости процессинга всех видов РНК (при этом ингибитируется синтез рРНК, что приводит к накоплению в ядрышках большого количества пре-рРНК), транспортом и переходом в состояние трансляции мРНК (Блехман, Шеламова, 1992; Neumann et al., 1989; Nover et al., 1984).

Наиболее чувствительна к стрессу стадия инициации транскрипции. Свидетельством того, что образование БТШ всегда определяется изменениями, имеющими место на уровне транскрипции, являются результаты ингибиторного анализа трансляции *in vivo* изолированной мРНК и ее последующее фракционирование (Cooper, Ho, 1987). Эксперименты выявили действие ингибитора транскрипции кордицепина, который, угнетая образование БТШ при воздействии повышенных температур (40 °C), не вызывал при этом заметных сдвигов в синтезе белков в норме. Из растений выделяли популяцию суммарной мРНК, синтезированной при 25 и 40 °C. После трансляции в бесклеточной системе рибосом зародышей пшеницы уста-

новили, что в реакционной смеси, содержащей мРНК проростков кукурузы, подвергшихся воздействию высокой температуры, образовалось 10 БТШ, аналогичных синтезированным при 40 °C *in vivo* (Cooper, Ho, 1987).

При неблагоприятных воздействиях часть мРНК сохраняется в виде стрессовых гранул, впервые обнаруженных у высших растений в условиях теплового шока (40 °C) и названных гранулами теплового шока (ГТШ) (Nover et al., 1989). ГТШ представляют собой рибонуклеопротеидные частицы размером 30–40 нм, белковая фракция которых состоит преимущественно из БТШ с мол. массой 17 (50–80 %) и 70 кД (5–10 %). Стressовые гранулы локализованы в цитоплазме, пластидах (Порфирова и др., 1992) и ядрах, причем последние содержат гетерогенные фракции полигидениловых РНК (Neumann et al., 1987; Nover et al., 1989). ГТШ образуются в результате засоления, обезвоживания и других факторов, что свидетельствует о неспецифичности такого ответа на стресс (Khokhlova, Porfirova, 1990).

Реакция растений на тепловой шок аналогична таковой у животных, насекомых и дрожжей и характеризуется такими ключевыми моментами (рис. 1):

- повышение температуры на 8–10 °C приводит к затуханию синтеза нормальных белков и интенсивному образованию БТШ;
- синтез БТШ запускается транскрипцией генов БТШ — некоторые из них секвенированы;
- после возвращения к нормальному температурному режиму прекращается синтез БТШ и вос-

становится образование других белков на фоне быстрого распада мРНК БТШ (полупериод до 2-х часов).

**Схема последовательных ответных реакций
растений на действие теплового шока**

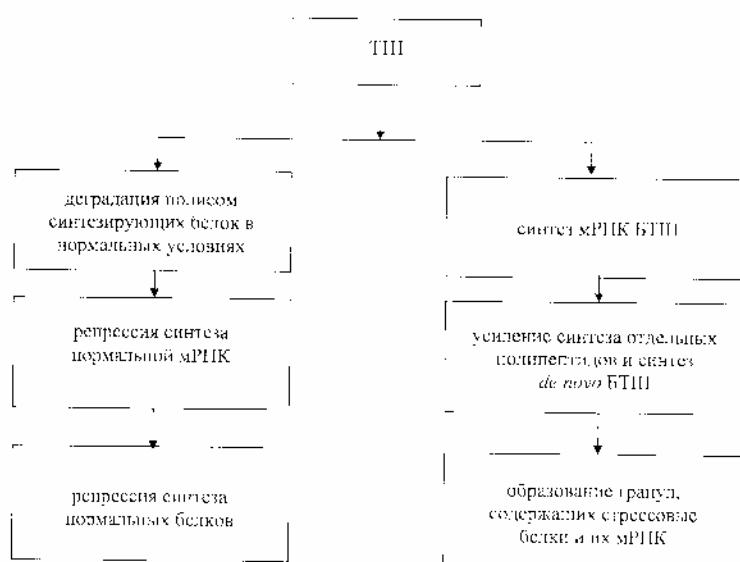


Рис. 1. Схема последовательных ответных реакций белок-синтезирующей системы растений на действие теплового шока

Период повышенной синтетической активности (6–10 часов от начала теплового шока (ТШ)) сменяется ее быстрым снижением до начального уровня. Кинетические параметры синтеза и накопления БТШ зависят

сят от семейства стрессовых белков. Первыми образуются “ранние” БТШ (70 и 90), затем — “поздние” — низкомолекулярные БТШ (Войников, Боровский, 1994; Lindquist, Craig, 1988). При различных неблагоприятных воздействиях у разных видов растений синтезируются идентичные “ранние” стрессовые белки, в частности БТШ 70 (Guy, Li, 1998; Vierling, 1991; Lee, Vierling, 2000). Такой феномен свидетельствует о неспецифичности данной составляющей ответной реакции на стресс и ее роли в формировании защитного барьера для первичных повреждений. Синтез “поздних” белков характеризуется специфичностью и их вероятным участием в восстановительных реакциях (Войников, Боровский, 1994).

Следовательно, за последние 25 лет удалось установить, что в стрессовых условиях растения изменяют характер биосинтеза белков, прекращая образование типичных для нормальных условий полипептидов, и начинают синтез новых стрессовых белков. Такое явление универсально для всех живых организмов, что свидетельствует о его возможной роли в эволюционном процессе.

ГЛАВА 2

КЛАССИФИКАЦИЯ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ

Стрессовые белки выявлены практически во всех компартментах растительной клетки (Sachs, Ho, 1986; Vierling, 1991; Waters et al., 1996, Banzet et al., 1998). Применение молекулярно-биологических методов позволило установить, что стрессовые белки растений гомологичны стрессовым белкам других эукариот. Их локализация в различных компартментах — ядрах, пластидах, митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, рибосомах, цитоплазме — свидетельствует об их существенной роли в важнейших биохимических процессах.

Наиболее досконально на сегодня исследованы БТШ. Как известно, под действием высоких температур, помимо гранул теплового шока синтезируются новые растворимые белки. Классификация БТШ основана на особенностях кинетики синтеза и пространственного распределения белков, образующихся под действием теплового шока (Nover, Scharf, 1984). Была предложена классификация, согласно которой класс А включает только растворимые белки с молекулярной массой основных полипептидов 95 и 80 кД, класс В — белки, связанные с гранулами на 5–10 % (70 и 68 кД), класс С — на 30–80 % (21, 17 и 15 кД), класс Д — минорные БТШ, идентифицированные исключительно в связанном состоянии. БТШ способны формировать

класс-специфичные додекамеры с мол. массой 210–280 кД, которые образуют гранулы теплового шока (ГТШ) (Kirshner et al., 2000). Последующие исследования, согласно которым основные классы БТШ различают по величине их молекулярных масс, а именно семейства БТШ 100, 90, 70, 60 и низкомолекулярные БТШ (от 17 до 30 кД), дополнили предложенную ранее систему (Sachs, Ho, 1986; Vierling, 1991; Waters et al., 1996).

Внутриклеточный механизм включения генома клетки в формирование реакции на стрессовое воздействие до конца не исследован, однако уже сегодня известно, что основными инициаторами синтеза БТШ являются неправильно модифицированные или денатурированные полипептиды и белковые агрегаты, возникающие вследствие негативной нагрузки (Baler et al., 1996; Morimoto et al., 1997; Perhman, 1986). В основе экспрессии генов, кодирующих синтез стрессовых белков эукариот, лежит взаимодействие специфического белка-фактора ТШ (ФТШ) с определенной консервативной последовательностью — 5'-aGAAg-3' в промоторе этих генов, получившей наименование элемента ТШ (ЭТШ) (Barros et al., 1992; Charnecka-Verner et al., 1998; Hubel, Schoffl, 1994; Hubel et al., 1995; Nover et al., 1996). На нетранскриптированных участках генов БТШ находится большое количество различных ЭТШ, соединенных по типу “голова к голове”, либо “хвост к хвосту” (Sorger, 1991). Установлено, что для усиления транскрипции мРНК стрессовых белков недостаточно связывания ФТШ с ЭТШ — необходима активизация ФТШ, представляющего собой в неактивном состоянии

мономерные (ФТШ 1) и димерные (ФТШ 2) молекулы с мол. массой около 70 кД. На их N-концевом участке находится домен связывания ДНК длиной в 100 аминокислотных остатков, а рядом с ним отрезок, определяющий взаимодействие между отдельными мономерами. Аналогичный участок расположен и на С-конце молекулы. В состав белковой молекулы также входят две короткие последовательности, негативно влияющие на активность самого ФТШ. На С-конце находится активный домен длиной более 100 аминокислотных остатков (Morimoto et al., 1997). Механизм активизации ФТШ окончательно неизвестен. Установлено, что ключевым моментом является тримеризация ФТШ, и только тримеры способны эффективно распознавать и связывать последовательности ЭТШ (Curley, Key, 1991; Morimoto et al., 1997). Исследования, проведенные в бесклеточной системе, продемонстрировали, что БТШ 90 и 70 угнетают активность ФТШ, негативно влияя на процесс тримеризации (Duina et al., 1998; Shi et al., 1998).

Каждое семейство БТШ является продуктом деятельности группы родственных генов, поэтому степень гомологии между отдельными членами семейства может быть достаточно высокой (Vierling, 1991; Waters et al., 1996). Вероятно, консерватизм в структуре БТШ свидетельствует об их особой роли в реализации механизмов адаптации и формировании ответа клетки на стрессовые воздействия. Ниже представлено разделение стрессовых белков на следующие семейства:

Семейство БТШ 70 включает наиболее распространенные стрессовые белки (Vierling, 1991). В клетках эукариот идентифицированы несколько таких бел-

ков: стресс-индуцируемый БТШ 70 (Derocher, Vierling, 1995); конститутивно синтезируемый БТШ 70к (HSC 70) (Perdue et al., 1998); регулируемый глюкозой ГРБ78 (Feige, Polla, 1994; Haas, 1999), а также белок, локализованный в митохондриях (Amir-Shapira, 1990; Brodsky et al., 1998). Полипептиды семейства БТШ 70 обнаружены во всех клеточных компартментах, ГРБ78 и p75 (mtp 70) — лишь в эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях, соответственно. Индуцибелльный БТШ 70 и конститутивный БТШ 70 выявлены в цитоплазме. При действии высоких температур они быстро перемещаются в ядро, концентрируясь в ядрашке, а затем, по окончании стресса, возвращаются в цитоплазму (Lindquist, 1986; Neumann et al., 1987). Повторная гипертермия сопровождается возобновлением транспорта БТШ 70 в ядро. Известно, что структура белков этого семейства достаточно консервативна и гомология последовательностей его членов составляет 50 %, а на отдельных участках, включая центр связывания АТФ, — до 80 % (Bardwell, Craig, 1984; Brown et al., 1993; Vierling, 1991).

Применение метода рентгеноструктурного анализа позволило установить, что молекула БТШ 70 состоит из двух доменов: N-концевого консервативного, насчитывающего до 450 аминокислот (McKay, 1991), и вариабельного С-концевого участка (до 200 аминокислот), выполняющего роль идентификатора субстрата (Boorstein et al., 1994). Эти два домена разделяет короткая аминокислотная последовательность, содержащая сайт идентификации белков, происходящий при помощи протеолитических ферментов

(Flaherty et al., 1990). У некоторых членов семейства в начале N-концевого участка выявлена сигнальная последовательность, необходимая для проникновения в митохондрии и эндоплазматический ретикулум. БТШ 70 и 70к содержат так называемую NLS-последовательность (nuclear leader sequence), позволяющую им самостоятельно либо вместе с другими молекулами мигрировать в ядро (Feige et al., 1996). Установлено, что молекулы БТШ 70 имеют два центра связывания кальция: один из них вместе с сайтами узнавания АДФ и неорганического фосфата находится на каталитической части молекулы, а другой — на поверхности, на участке 227–231 аминокислот (Sriram et al., 1997).

Семейство БТШ 90. Экспрессия генов БТШ 90 происходит конститутивно, причем во время стресса темпы синтеза этих белков ускоряются. Структура белков консервативна. Так, для полипептидной цепи различных БТШ 90 характерно более 40 % идентичности (Milioni, Hatzopoulos, 1997; Vierling, 1991; Pareek et al., 1997; Reddy et al., 1998). Полипептиды семейства синтезируются преимущественно в цитоплазме, однако обнаружены и в пластидах, эндоплазматическом ретикулуме, митохондриях (Boston et al., 1996; Mogelsvang, Simpson, 1998). Установлено, что в митохондриях гороха под действием ТШ синтезируются 86 кД БТШ, а также нуклеозиддифосфаткиназа, выполняющая, по-видимому, роль модулятора этого полипептида (Escobar et al., 2001).

Семейство БТШ 110 представлено белками, существенно отличающимися от БТШ 70. Их гомология составляет лишь 30–33 %, причем большая часть

гомологичных последовательностей приходится на домен связывания АТФ (Lee-Yoon et al., 1995). Следует отметить, что продолжительность синтеза БТШ 110 в растениях значительно короче по сравнению с другими семействами, причем наиболее интенсивно он происходит в первый час ТШ (Nagao et al., 1986). Белки семейства БТШ 110 локализованы в цитоплазме, пластидах и митохондриях. Установлена взаимосвязь между интенсивностью синтеза БТШ 110, фазой роста, местом образования белков и видом стресса (Schirmer et al., 1994).

Семейство БТШ 60 представлено выделенным в гомогенном состоянии из клеток *E. coli* Gro-El-белком, (эубактериальный шаперон) первым получившим название “шаперон” (Ellis, 1987). Гомологи БТШ 60, кодирование и синтез которых происходит в ядре, найдены также в митохондриях и хлоропластах (Cloney et al., 1994; Hallberg, 1990; Hemmingsen et al., 1988). Удалось выделить Gro-El-образный белок Rubisco large-subunit-binding protein (RBP), участвующий в укладке молекулы ключевого фермента процессов фотосинтеза и фотодыхания — рибулозидифосфаткарбоксиазы / оксигеназы. Выделенный полипептид характеризуется низким уровнем АТФ-азной активности и классифицирован как шаперонин (Roy, 1998). Митохондриальный БТШ 60, иммуноподобный Gro-El и RBP, обнаружены в различных организмах (McMullin, Hellberg, 1988; Prasad et al., 1990). Установлено, что под действием ТШ уровень БТШ 60 увеличивается в 2-3 раза (Prasad, Hellberg, 1989).

Низкомолекулярные БТШ. Особенностью растительной клетки является ее способность к образованию в ответ на широкий спектр стрессовых воздействий группы низкомолекулярных полипептидов, синтез которых кодируется шестью семействами генов (Waters et al., 1996). Низкомолекулярные БТШ обнаружены в цитоплазме, хлоропластах, эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях. На их долю приходится до 1 % от общего содержания белков в цитоплазме и 0,02 % — в хлоропластах (Waters et al., 1996). Экспрессия отдельных низкомолекулярных БТШ наблюдается на различных этапах реализации эндогенной программы развития растений (Boston et al., 1996). Установлено, что низкомолекулярные БТШ входят в состав высокомолекулярных комплексов (200–400 кД) и гранул ТШ (Nover et al., 1989; Vierling, 1991).

С помощью электрофореза с последующим вестерн-блотингом было установлено, что на внутренней мемbrane митохондрий локализованы стрессовые белки с мол. массой 66, 60, 55 и 23 кД, на наружной мемbrane — 60 и 58 кД и в матриксе митохондрий — 66 и 55 кД (Побежимова и др., 2001). После тепловой обработки пшеницы и ржи как внутри митохондрий, так и на их поверхности обнаружено по одному низкомолекулярному БТШ с мол. массой 20 кД, у кукурузы — два низкомолекулярных БТШ (28 и 23 кД), локализованных внутри митохондрий, и три (22, 20 и 19 кД) — на их поверхности. Предполагается, что низкомолекулярные БТШ играют существенную роль в защите митохондрий от повреждений при гипертермии (Коротаева и др., 2001).

Таблица 1. Локализация основных семейств БТШ

Семейство БТШ	Компартмент
БТШ 70: стресс-индуцируемый конститутивный митохондриальный 70 кД ядерный	цитоплазма цитоплазма митохондрии ядро
БТШ 90: Синтез 90 кД полипептидов 86 кД локализация 90 кД полипептидов	цитоплазма митохондрии митохондрии пластиды, эндоплазматический ретикулум
БТШ 110	цитоплазма пластиды митохондрии
БТШ 60: стресс-зависимый стресс-независимый	митохондрии хлоропласти
Низкомолекулярные БТШ:	цитоплазма хлоропласти митохондрии эндоплазматический ретикулум

Таким образом, классификация БТШ, основанная на величине молекулярной массы, позволяет выделить основные семейства этих полипептидов. БТШ обнаружены в большинстве компартментов растительной клетки. Особенностью растительной клетки является ее способность к образованию низкомолекулярных БТШ.

ГЛАВА 3

ФУНКЦИИ СТРЕССОВЫХ БЕЛКОВ

Большая часть стрессовых белков — это шапероны, синтезированные *de novo*, количество которых резко возрастает под действием стрессовых факторов (Ellis, Van der Vies, 1991; Morimoto et al., 1997). Многочисленные функции белков этого семейства определяются их шаперонной активностью (Boston et al., 1996; Meirnyk, 1997). В частности, они задействованы в процессах правильной нековалентной укладки полипептидов или структур, содержащих полипептиды, не являясь при этом составляющими новообразованных структур (Boston et al., 1996, Morimoto et al., 1997, Евстигнеева и др., 2001). Полагают, что, помимо связывания и стабилизации неустойчивых в определенных условиях конформаций других белков, молекулярные шапероны способствуют приобретению устойчивости клеток, принимая участие в сопровождении, олигомерной сборке, транспорте в отдельные субклеточные компартменты белков, либо освобождают их путем денатурации (Ellis, Van der Vies, 1991; Косаківська, Гудкова, 2002).

Молекулярными шаперонами являются шаперонины, белки, содержащие цилиндрические комплексы, в состав которых входит две конфигурации колец, каждая из которых включает от семи до девяти субъединиц. Основной определенной на сегодня функцией

шаперонинов является сопровождение и сборка белков. Так, белок, обеспечивающий связывание субъединиц Рубиско, принадлежит к шаперонинам (Lorimer, 2001). Несмотря на то, что хлоропласти и митохондрии содержат собственные белоксинтезирующие системы, значительное количество белков транспортируется в них извне. Импорт белков в митохондрии и хлоропласти осуществляется при участии шаперонинов, которые сопровождают полипептиды в цитозоль, причем рецепторы и каналы в мембранах органелл и АТФ-зависимый импорт-мотор локализованы внутри органелл (Haucke, Schatz, 1997). Особенности молекулярных шаперонов находятся в центре внимания исследователей в связи с анализом их функций в формировании защитных реакций клеток. Многочисленные биологические и генетические исследования сконцентрированы преимущественно на изучении БТШ 70 и Gro-El (эубактериальный шаперон), а также БТШ 60 — гомологе Gro-El в митохондриях (Rassow et al., 1997).

Белки семейства БТШ 70 взаимодействуют с полипептидной цепью, которая синтезируется на рибосомах, присоединяются к другим белкам, вызывая их развертывание, и, таким образом, препятствуют преждевременному свертыванию незрелой полипептидной цепи. Они способствуют формированию нативной структуры белка, необходимой для его функциональной активности (Кулаева, 1997; Кулаева и др., 1991; Панасенко и др., 2003); участвуют в процессе проникновения развернутых полипептидных цепей через мембранны хлоропластов, митохондрий и эндоплазматического ретикулума; защищают белки от необрати-

мых повреждений. Взаимодействие БТШ 70 с другими белками носит АТФ/АДФ-зависимый характер: в комплексе с АДФ они удерживают на себе расплетенный белок, а замена АДФ на АТФ приводит к освобождению белка от БТШ 70. Замена связанной с БТШ 70 АТФ на АДФ является следствием АТФ-азной активности. АТФ-зависимое проникновение белков через мембрану обеспечивается благодаря изменению конформации БТШ 70, зависящей от связи с АТФ или АДФ (Кулаева, 1997; Smykal et al., 2000). БТШ 70 присутствуют во всех компартментах клетки. Их идентификация при всех видах стрессов у широкого спектра организмов свидетельствует о том, что это неспецифические стрессовые белки, синтез которых является составляющей общего адаптационного синдрома (Веселов и др., 2002).

Известно, что БТШ 70 обеспечивают сопровождение белков и выступают в качестве медиатора белковой транслокации через мембранны митохондрий, хлоропластов и эндоплазматического ретикулума, являются компонентом стероидного гормонального рецепторного комплекса (Rassow et al., 1997). Интенсивный синтез БТШ 70 ассоциируется с развитием холдоустойчивости (Guy et al., 1998).

Белки семейства БТШ 70 предотвращают нагромождение денатурированных полипептидов, образующихся вследствие теплового или иных видов стресса, вступают в кратковременное взаимодействие с новоиспеченными цитоплазматическими белками, способствуют укладке последних в нативную конформацию (Beckman et al., 1990; Wu, Laidman, 1997). Цито-

зольные БТШ 70 участвуют в транспорте белков через мембранны органелл, предотвращают мезосомную деградацию белков (Rapoport et al., 1996; Hachiya et al., 1995; Terlecky et al., 1992). Находящиеся в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме шапероны семейства БТШ 70 участвуют в укладке полипептидов и связанном с гидролизом АТФ их переносе через мембранны этих органелл (Satyanarayana, Horst, 1998). Хлоропластные БТШ 70 на внутренней поверхности внешней мембранны обеспечивают транспорт белков через эту мембрану (Marshal et al., 1990; Schnell et al., 1994).

Белки семейства БТШ 90 образуют сложный комплекс со вспомогательными белками (ко-шаперонами), который взаимодействует с рецепторами стероидных гормонов и обеспечивает эффективное связывание и последующий перенос гормон-рецепторного комплекса к ядру. Они участвуют в переносе отдельных протеинкиназ к участкам функционирования, контролируя их активность (Кулаева, 1997; Кулаева и др., 1991; Панасенко и др., 2003; Vierling, 1991).

БТШ 90 регулируют активность белков, участвующих в передаче сигнала, и обеспечивают нековалентную укладку полипептидов (Bose et al., 1996); образуют шаперонные цитоплазматические гетерокомплексы, способные активировать глюкокортикоидные рецепторы *in vitro* (Reddy et al., 1998), а также являются компонентом рецептора диоксина (Haucke, Schatz, 1997). Определяющим в величине шаперонной активности БТШ 90 является баланс АТФ/АДФ (Prodromou et al., 1997).

Высокая степень экспрессии БТШ 90 в созревающих и прорастающих семенах *Brassica napus* L. в отсутствие стресса указывает на их участие в процессах развития и прорастания семян (Reddy et al., 1998). Предполагают, что митохондриальные БТШ 70 и БТШ 90, интенсификация синтеза которых наблюдается при холодовом стрессе, являются молекулярными шаперонами, необходимыми для адаптации растений кукурузы к низким температурам (Половинкин и др., 1999).

Белки семейства БТШ 110 выполняют защитную функцию, предотвращают агрегацию белков в цитозоле и митохондриях, а также взаимодействуют с протеазами (Haucke, Schatz, 1997). Они играют ключевую роль в защите клетки от действия высоких температур и участвуют в формировании терморезистентности (Queitsch et al., 2000). Эти белки характеризуются шаперонной активностью, защищают клетки от теплового шока, избирательно связывая и восстанавливая структуры денатурированных белков (Oh et al., 1997), разрушая нерастворимые агрегаты, образующиеся в результате стресса, и в дальнейшем освобождая входящие в них белки (Glover, Lindquist, 1998). БТШ 110 осуществляют свои функции посредством гидролиза АТФ и образования олигомеров, преимущественно гексамеров (Schirmer et al., 2000).

Белки семейства БТШ 60 обеспечивают правильную сборку четвертичной структуры сложных многодоменных белков (таких как актин или тубулин). Они образуют комплекс из двух колец, расположенных друг на друге, в каждом из которых — семь субъединиц.

Такая сложная структура обеспечивает правильную упаковку клеточных белков при формировании четвертичной структуры. БТШ 60 участвуют в АТФ-зависимом процессе исправления ошибок в структуре частично денатурированных белков (Кулаева, 1997; Кулаева и др., 1991; Панасенко и др., 2003).

БТШ 60, обладающие шаперонинной активностью, проявляют сродство к молекулам АТФ и, аналогично БТШ 70, задействованы в связывании новосинтезированных белков и обеспечении конформационных перестроек митохондриальных полипептидов, необходимых для образования мультимерных комплексов и их дальнейшей транспортировки через мембранны (Cheng et al., 1989).

К БТШ также относится убиквитин — белок, присоединение которого к N-концу превращает полипептид в мишень для протеаз. Это так называемая “метка смерти” для белков, благодаря которой происходит выбраковка поврежденных, недостроенных и функционально неактивных полипептидов (Кулаева, 1997; Lindquist, Craig, 1988; Nover et al., 1989). Ассоциированный убиквитином белок разрушается в особых мультикомпонентных комплексах — протеосомах. Появление в клетках поврежденных и недостроенных белков является сигналом к синтезу БТШ также при нормальной температуре (Кулаева, 1997).

Изучение механизмов модификации мутационного процесса выявило, что стрессовые факторы способны непосредственно либо через систему БТШ влиять на репарационные процессы генетического материала. В частности, в условиях генетического дефекта

синтеза БТШ стрессовые воздействия модифицируются в мутагенные факторы, что в итоге выражается в нарушении стабильности генетического материала (Тихомирова и др., 1994).

Синтез высокомолекулярного стрессового белка **310 кД** наблюдается при холодовом шоке, а также водном дефиците и коррелирует с ростом хладоустойчивости и снижением содержания воды в клетках. 310 кД белок влияет на энергетическую активность митохондрий растений при гипотермии (Побежимова и др., 1996; Колесниченко и др., 1999). Показано, что добавление к изолированным митохондриям одно- и двудольных растений белка холодового шока (БХШ) 310 кД сопровождается разобщением процессов окисления и фосфорилирования (Колесниченко и др., 2003). При низких концентрациях Ca^{2+} холодовой стресс и обработка БХШ 310 вызывали выход цитохрома С из митохондрий озимой пшеницы и увеличение интенсивности дыхания (Грабельных и др., 2003). Установлено, что конститутивно синтезируемый БХШ 310 в неподвергнутых действию холодового стресса озимых злаках является комплексом белка с РНК. В то же время БХШ 310 в подвергнутых стрессу растениях не образует такого комплекса.

Переход БХШ 310 в стрессовую форму сопровождается высвобождением РНК и высокой разобщающей активностью белка (Колесниченко и др., 2005, Колесниченко и др., 2006). Установлено, что 310 кД белок увеличивает интенсивность процесса дыхания в митохондриях, приводит к разобщению процессов окисления и фосфорилирования. Активация митохон-

риальных разобщающих систем линолевой кислотой и БХШ 310 в проростках озимой пшеницы во время низкотемпературного стресса сопровождалась увеличением поглощения кислорода и снижением уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Зыкова и др., 2002, Войников и др., 2001).

Предполагается, что в условиях низкотемпературного стресса конститутивно синтезируется форма БХШ 310 с низкой разобщающей активностью, высвобождает РНК и переходит в стрессовую форму с высокой разобщающей активностью (Колесниченко и др., 2005, Войников и др., 2006). К белкам низкотемпературного стресса относятся также антифризные белки, предохраняющие макромолекулы от повреждений, и белки, разобщающие окисление и фосфорилирование в митохондриях, что способствует стабилизации температурного режима в течение некоторого времени и подготовке к действию отрицательной температуры (Колесниченко и др., 2000).

Синтез большинства стрессовых белков регулируется на уровне транскрипции, но в отдельных случаях — на трансляционном или посттрансляционном уровнях (Ladomery, 1997).

Стressовые белки играют важную роль в формировании устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов, участвуя в защитных ответных реакциях. Так, одной из функций белков, образующихся при действии низких температур, является, в частности, предотвращение образования льда в клетках. Установлено, что при гипотермии в листьях озимой ржи синтезируется стрессовый белок, который

концентрируется в вакуолях и межклеточном пространстве и существенно влияет на процесс роста ледяных кристаллов, понижая температуру замерзания (Колесниченко и др., 2000). Кроме того, к стрессовым БХШ относятся шапероны и **дегидрины**, предохраняющие от повреждения макромолекулы, и стрессовые разобщающие белки, позволяющие поддерживать в течение некоторого времени положительную температуру. При обезвоживании происходит связывание дегидринов с наружной мембраной органелл, в частности, митохондрий. Предполагается, что дегидрины взаимодействуют с липидами мембран, подавляя фазовый переход липидного слоя или уменьшая перекисное окисление (Боровский и др., 2005). Высоко- и среднемолекулярные дегидрины участвуют как в стресс-реакции, так и в адаптации растений озимой пшеницы, тогда как низкомолекулярные, по-видимому, — только в процессах низкотемпературной адаптации (Ступникова и др., 2004).

При адаптации растений к обезвоживанию, в частности, имеющему место в ходе созревания семян, наблюдается активный синтез дегидринов (Боровский и др., 2005). Дегидрины — белки позднего эмбриогенеза — характеризуются наличием высококонсервативных *y*, *s* и *k*-сегментов. Их устойчивость к повышенным температурам вплоть до сохранения структуры при кипячении обусловлена своеобразным аминокислотным составом — в первичной структуре дегидринов содержится большое количество гидрофильных аминокислот (Аллагулова и др., 2003). Дегидрины локализованы в ядре, цитоплазме, элементах цитоскелета, ци-

плазматической мемbrane и митохондриях различных клеток проростков и взрослых растений (Nylander et al., 2001; Borovskii et al., 2000). Предполагается, что одним из механизмов защитного действия дегидринов при стрессе является преимущественная гидратация макромолекул, вследствие чего предовращается локальная дегидратация и денатурация белков (Close, 1996). Различные типы дегидринов способны стабилизировать одинаковые макромолекулы и мембранны и, наоборот, стабилизация различных белков и мембран осуществляется ограниченным количеством типов дегидринов, что обусловлено отсутствием прямого взаимодействия белка и его мишени (Pearce, 1999).

Другой путь защитного воздействия дегидринов предполагает наличие шаперонной детергентной активности, которая инициируется гидрофобным взаимодействием с мембранами или частично денатурированными белками (Close et al., 1993). Как и другие криопротекторы — глицин, бетатин и пролин дегидрины действуют синергично, стабилизируя жизненно важные макромолекулы и мембранны (Wisniewski et al., 1996). Отдельные дегидрины проявляют одновременно антифризную и криопротекторную активность, участвуют в процессе регуляции устойчивости клеток растений (Wisniewski et al., 1999; Bravo et al., 2003; Nylander et al., 2001). Установлено, что 63 и 52 кД дегидрины связываются с наружной мембраной митохондрий, вступают во взаимодействие с липидами, подавляют фазовый переход липидного слоя и уменьшают интенсивность перекисного окисления (Боровский и др., 2005).

Особая роль в образовании и функционировании стрессовых белков отводится ионам кальция. Установлено, что кальций является внутриклеточным регулятором синтеза БТШ 96 кД и термоустойчивости клеток растений *Beta vulgaris* L. при гипертермии.

Таблица 2. Основные семейства БТШ и их возможные функции

Семейство	Функция
Шапероны	Сопровождение и сборка белков
БТШ 70 кД	Сопровождение белков Медиаторы белковой транслокации через мембранны митохондрий, хлоропластов и эндоплазматического ретикулума Компоненты стероидного гормонального рецепторного комплекса
БТШ 90 кД	Сопровождение белков Компоненты стероидного гормонального рецепторного комплекса Компоненты рецептора диоксина
БТШ 110 кД	Предотвращение агрегации белков в цитозоле и митохондриях. Взаимодействие с протеазами
БТШ 60	Обеспечение конформационных перестроек митохондриальных полипептидов
Низкомолекулярные БТШ	Предотвращение агрегации белков, участие в сопровождении белков

Неспособность Ca^{2+} -дефицитных клеток синтезировать БТШ 96 кД сопровождалась снижением их жизнеспособности в условиях высокой температуры (Трофимова и др., 1997; Кузнецов и др., 1997).

В то же время протеинкиназы с мол. массой 48 и 40 кД, которые интенсивно синтезируются при гиперосмотическом стрессе, что обеспечивает дальнейшую адаптацию, участвуют в Ca^{2+} - и АБК-независимых путях биосинтеза (Hoyos, Zlang, 2000). Модулятором БТШ 86 кД является митохондриальная нуклеозид-дифосфаткиназа, выявлена в комплексах гексамеров, тетramerов и димеров (Galvis et al., 2001). Высказано предположение о том, что ионы Ca^{2+} и калмодулин участвуют в процессах экспрессии генов БТШ, вероятно, посредством регуляции активности транскрипционного фактора теплового шока (Медведев, 2005, Li et al., 2004).

Таким образом, концепция шаперонной активности БТШ позволяет объяснить процессы переукладки и самосборки белков, имеющие место в ходе и в результате различных стрессовых нагрузок. Предполагается, что информацию, необходимую для укладки в правильную конечную конфигурацию, содержит первичная аминокислотная последовательность, а молекулярные шапероны ассистируют в сборке других белков, подавляя непродуктивные реакции (Meirnyk, 1997).

Ответ на ТШ и другие стрессы, вероятно, представляет собой законсервированную реакцию клеток и организмов в целом. Сублетальные стрессовые нагрузки индуцируют клеточную реакцию по таким направлениям: 1) защита от повреждения; 2) восстановление

нормальной физиологической активности; 3) развитие устойчивости (Schoffl et al., 1998). Решающим для существования клеток является чувствительность белков и ферментов к инактивации и денатурации, их защита от протеинотоксических эффектов. Поскольку растения характеризуются относительно “неподвижным” образом жизни, их адаптивные защитные реакции на негативные воздействия локализованы внутри клеток и непосредственно затрагивают белковую систему. В связи с этим плодотворное исследование функций стрессовых белков, в частности их шаперонной и шаперониновой активности, видится достаточно перспективным при изучении таких процессов, как фотосинтез и азотфиксация.

ГЛАВА 4

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ БТШ РАСТЕНИЙ

Особенностью растительной клетки является синтез низкомолекулярных (нм) БТШ — большой гетерогенной группы белков, имеющих в своей структуре высококонсервативный участок, впервые найденный в α -кристалинах хрусталика глаза позвоночных и названный кристалиновым доменом (Waters et al., 1996).

Высшие растения имеют шесть семейств ядерных генов, кодирующих синтез нмБТШ (Forreiter, Nover, 1998; Scharf et al., 2001; Waters et al., 1996). Растения, помимо цитоплазматических нмБТШ, имеют белки, локализованные в органеллах. Каждое генное семейство кодирует белки, находящиеся в клеточных компартментах — цитозоле, пластидах, эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях. Эволюционный анализ показал, что разные семейства нмБТШ, хотя и возникли в результате дупликации генов, вплоть до момента расхождения главных групп покрытосеменных имели общего предшественника (Waters et al., 1996).

Два семейства генов, кодирующих синтез цитоплазматических нмБТШ, обозначают как классы СI и СII (Waters et al., 1996). Третье семейство — класс СIII — описано недавно (Scharf et al., 2001). Другие семейства включают гены, кодирующие нмБТШ, локализованные в соответствующих клеточных компартмен-

так: пластидах (P), эндоплазматическом ретикулуме (ER) и митохондриях (M). Классы СI и СII цитозольных нмБТШ кодируются мультигенными семействами. Различные представители каждого класса характеризуются высоким уровнем гомологии аминокислотных последовательностей. НмБТШ разных видов растений в пределах одного класса также сходны, однако гомология между представителями разных классов низкая (Vierling, 1991).

Молекулярная структура нмБТШ

Исходя из экзонинтронной структуры гена, у нмБТШ выделяют два домена: N-концевой, который кодируется экзоном 1, и C-концевой, кодируемый экзонами 2 и 3. С-концевой домен — консервативный (рис. 2), состоит из 90–100 аминокислотных остатков и называется α-кристиалиновым (Waters et al., 1996). Он включает два участка (1 и 2), разделенные гидрофильным отрезком. Участок 1 нмБТШ (27 аминокислот) содержит консервативную Pro — X₍₁₄₎ — Gly — Val — Leu последовательность, встречающуюся у нмБТШ эукариот (Lindquist, Craig, 1988;). Участок 2 (29 аминокислот) содержит подобную Pro — X₍₁₄₎ — X — Val/Leu/Ile — Val/Leu/Ile последовательность (Vierling, 1991; Waters et al., 1996). Неконсервативная последовательность между участками 1 и 2 является частью гидрофильного домена, имеющегося у всех нмБТШ (Czarnecka et al., 1985).

НмБТШ образуют *in vivo* и *in vitro* гомоолигомеры с молекулярной массой от 200 до 350 кДа (Lee et al., 1995), в формировании которых участвует α -кристалиновый домен. N-концевые участки необходимы для олигомеризации (Панасенко и др., 2003; Gusev et al., 2002; Lee et al., 1995; Lee et al., 1997; Lee, Vierling, 2000).

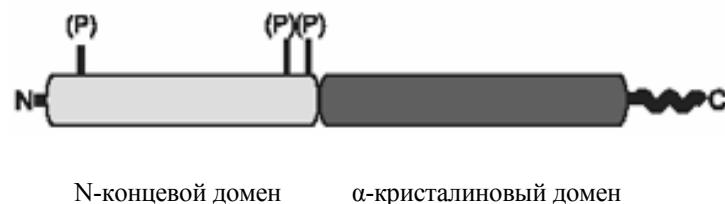


Рис. 2. Схема строения нмБТШ. Обозначены N- и C-концевой (α -кристалиновый) домены и вариабельная C-концевая последовательность, буквой Р — участки фосфорилирования.

Сведения об олигомерной структуре нмБТШ получены преимущественно благодаря использованию метода рентгеноструктурного анализа, в частности для БТШ 16,5 *Methanococcus jannaschii* и БТШ 16,9 пшеницы (Панасенко и др., 2003; Gusev et al., 2002; Kim et al., 1998). Олигомерный комплекс БТШ 16,5 *M. jannaschii* имеет молекулярную массу 400 кД, состоит из 24 субъединиц и представляет собой сферу с внешним диаметром 120 Å, внутри которой имеется полость диаметром 65 Å. Этот комплекс характеризуется октаэдрической симметрией. На его поверхности находятся

восемь треугольных и шесть квадратных отверстий (рис. 3, А) (Gusev et al., 2002; Kim et al., 1998). Олигомерный комплекс БТШ 16,9 пшеницы состоит из 12 субъединиц, организованных в 2 кольца, в каждом из которых расположен тример димеров БТШ 16,9 (рис. 3, Б) (Панасенко и др., 2003; Kim et al., 1998).

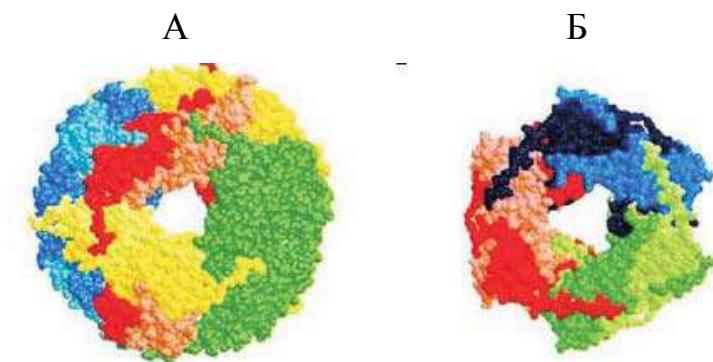


Рис. 3. Структура олигомеров нмБТШ 16,5 *Methanococcus jannaschii* (А) и БТШ 16,9 *Triticum aestivum* L. (Б)

НмБТШ растений, как правило, образуют олигомерные комплексы из 12 субъединиц, организованные в два диска, состоящие из 6 мономеров. Такие комплексы характерны для БТШ 18,1 и 17,7 (Lee et al., 1995; Lee et al., 1997), а так же БТШ 21 хлоропластов *Pisum sativum* L. (Панасенко и др., 2003; Coca et al., 1994).

Формирование больших олигомерных структур и последующие конформационные изменения обуславливают шаперонную активность нмБТШ (Basha et al., 2004a; Linder et al., 1997).

Уникальной особенностью растительных нмБТШ является образование во время длительного температурного стресса гранул теплового шока (ГТШ) диаметром до 40 нм, представляющих собой связанные с нмБТШ накопившиеся в цитоплазме денатурированные белки. При восстановлении нормального состояния комплекс “денатурированный белок—олигомер нмБТШ” распадается. ГТШ могут объединяться в большие цитозольные шапероновые комплексы, которые содержат преимущественно цитозольные нмБТШ классов СI и СII (Nover et al., 1983; Nover et al., 1989). В состав ГТШ, кроме цитозольных нмБТШ, могут входить БТШ 70 (Nover et al., 1983; Nover et al., 1989) и транскрипционный фактор ТШ ТШФ A₂ (Scharf et al., 1998). Наличие С-концевого домена у нмБТШ класса СII и формирование додекамеров является обязательным условием агрегации и последующего включения белков в состав ГТШ, индуцированного высокой температурой (Basha et al., 2004). α-Кристалиновый домен и нмБТШ под влиянием ТШ претерпевают структурные изменения, увеличивающие гидрофобность белковой поверхности (Lee et al., 1995; Lee et al., 1997).

Экспрессия растительных нмБТШ

Большинство нмБТШ в вегетативных тканях при нормальных условиях не выявлены, однако в ответ на температурный стресс наблюдается быстрый синтез этих соединений. Отклонение температуры на 10–15 °С от нормы (не выше летальной) изменяет синтез белка.

Установлено, что количество синтезированных нмБТШ зависит от температуры и продолжительности стрессовой нагрузки (Howarth, 1991). После окончания влияния отрицательных факторов и восстановления нормальных условий нмБТШ обнаружаются в клетках еще 30–50 часов (Chen et al., 1990). Они являются важным фактором процесса восстановления (Waters et al., 1996).

Тепловой стресс — не единственный фактор, стимулирующий экспрессию генов нмБТШ и последующий белковый синтез (табл. 3).

Экспрессия генов нмБТШ происходит под контролем факторов теплового шока (ФТШ) (Schoffl et al., 1998; Wu, 1995), которые распознают так называемые элементы теплового шока (ЭТШ) (Pelham, 1982) — последовательности, расположенные в участках 5'-области, которая не транскрибируется. Они содержат неоднократно повторяющийся элемент –nGAAn- (Amin et al., 1988; Xiao, Lis, 1988). Оптимальный ЭТШ растений содержит консенсусную последовательность, представленную 5'-aGAAg-3' (Barros et al., 1992).

На сегодня определены три единицы последовательности 5'-nGAAnnTTCnnGAAn-3', необходимые для эффективного связывания ФТШ (Schoffl et al., 1998). При нормальных условиях ФТШ находится в клетке в латентном состоянии. Под влиянием повышенной температуры происходит его тримеризация и последующая активация. ФТШ взаимодействует с участками ДНК, проявляющими транскрипционную активность (Wu, 1995).

Таблица 3. Экспрессия растительных генов в стрессовых условиях

Условия, фаза	Вид	Название гена и класс	Литературный источник
Нормальная температура	<i>Craterostigma plantagineum</i>	<i>НабТШ 17.6-CI</i> гомолог	(Alamillo et al., 1995)
Холод	<i>Solanum tuberosum L.</i> <i>Lycopersicon esculentum L.</i> <i>Morus bombycis L.</i> <i>Castanea sativa L.</i>	<i>CII9</i> (класс ER) <i>TOM66</i> (класс CI) <i>TOM111</i> (класс P)/Лебти 23.8-P <i>WAP20</i> (класс ER) <i>СимБТШ 17.5-CI</i>	(Berkel et al., 1994) (Sabehat et al., 1998a) " (Ukaji et al., 1999) (Soto et al., 1999)
Абсцизовая кислота	<i>Helianthus annuus L.</i> <i>Craterostigma plantagineum</i>	<i>НабТШ 17.6-CI</i> <i>НабТШ 17.6-CI</i> гомолог <i>НабТШ 17.9-CII</i> гомолог	(Almoguera, Jordans, 1992) (Alamillo et al., 1995) "
Оsmотический стресс	<i>Helianthus annuus L.</i> <i>Craterostigma plantagineum</i> <i>Quercus suber L.</i> <i>Arabidopsis thaliana L.</i>	<i>НабТШ 17.6-CI</i> <i>НабТШ 17.9-CII</i> <i>НабТШ 17.6-CI</i> гомолог <i>НабТШ 17.9-CII</i> гомолог <i>QнмБТШ 17-CI</i> <i>AtБТШ 17.7-CII</i> , <i>AtБТШ 17.6-CII</i>	(Almoguera et al., 1993) " (Alamillo et al., 1995) " (Pla et al., 1998) (Sun et al., 2001)
Окислительный стресс	<i>Quercus suber L.</i> <i>Lycopersicon esculentum L.</i> <i>Petroselinum crispum L.</i>	<i>QнмБТШ 17-CI</i> <i>БТШ 22</i> (класс M) <i>БТШ 17.9</i> (класс CI)	(Pla et al., 1998) (Banzet et al., 1998) (Eckey-Kaltenbach et al., 1997)

Окисли- тельный стресс	<i>Oryza sativa</i> L. <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	<i>ОнМБТШ26.6-P</i> <i>AtБТШ 17.7-CII</i>	(Lee, Vierling, 2000) (Sun et al., 2001)
Развитие зароды- шней	<i>Helianthus annuus</i> L. <i>Pisum sativum</i> L. <i>Arabidopsis thaliana</i> L. <i>Lycopersicon esculentum</i> L.	<i>НабТШ 17.6-CI</i> <i>НабТШ 17.6-CII</i> <i>РнмБТШ 18.1- CI</i> <i>РнмБТШ 18.1- CII</i> <i>AtБТШ 17.4-CI,</i> <i>AtБТШ 17.6-CI</i> <i>AtБТШ 17.7-CII</i> <i>LрБТШ 17.7-CI</i> <i>LрБТШ 17.3-CII</i>	(Almoguera et al., 1992) (Coca et al., 1994) (DeRocher, Vierling, 1995) " (Wehmeyer et al., 1996) (Sun et al., 2001) (Low et al., 2000) "
Про- растание семян	<i>Arabidopsis thaliana</i> L. <i>Pseudotsuga menziesii</i> L. <i>Hordeum vulgare</i> L.	<i>AtБТШ 17.4-CI,</i> <i>AtБТШ 17.6-CI</i> <i>AtБТШ 17.7-CII</i> , <i>AtБТШ17.6-CII</i> <i>cDNA DF4-5 (склас CI)</i> <i>НвБТШ 26.8-P,</i> <i>НвБТШ 26.9-P</i>	(Wehmeyer et al., 1996) (Sun et al., 2001) (Tranbargen, Misra, 1999) (Kruse et al., 1993)
Сомати- ческий эмбрио- генез	<i>Medicago sativa</i> L. <i>Nicotiana tabacum</i> L.	<i>БТШ 18.1 (class CI)</i> <i>МнмБТШ 18.2-CI</i> <i>NtБТШ 18-CI</i>	(Gyorgyey et al., 1991) " (Zarsky et al., 1995)
Развитие пыльцы	<i>Lilium</i> L. <i>Zea mays</i> L. <i>Nicotiana tabacum</i> L.	<i>cDNA</i> гомологическая <i>нмБТШ (класс CI)</i> <i>ZmБТШ 17-CII</i> <i>NtБТШ 18-CI</i>	(Bouchard, 1990) (Dietrich et al., 1991) (Zarsky et al., 1995)
Созрева- ние плодов	<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	<i>LрБТШ 17.7-CI</i> <i>LрБТШ 17.3-CII</i> <i>LeБТШ 23.8-P</i> <i>TOM111 (класс P)</i>	(Low et al., 2000) " (Lawrencee et al., 1997) "

Тяжелые металлы	<i>Medicago sativa</i> L.	<i>МнмБТШ</i> 18.1 (класс <i>C1</i>) <i>МнмБТШ 18.2-CI</i>	(Gyorgyey et al., 1991) ”
Фото-период	<i>Pharbitis nil</i> L.	<i>МнмБТШ-1</i> (класс <i>CII</i>)	(Krishna et al., 1992)

Экспрессия нмБТШ прежде всего регулируется на уровне транскрипции. Тепловая индукция транскрипции генов нмБТШ инициируется связыванием ФТШ с ЭТШ (Gurley, Key, 1991) В условиях ТШ синтез нмБТШ регулируется на уровне трансляции: при повышении температуры трансляция мРНК нмБТШ возрастает, а синтез большинства нормальных клеточных белков прекращается (Войников и др., 1984; Войников, Боровский, 1994; Косаківська, 2003).

Возможные функции нмБТШ

Биосинтез нмБТШ начинается в ответ на отрицательные воздействия и сопровождается развитием устойчивости. Однако механизм, благодаря которому нмБТШ защищают клетки растений от стрессов, до конца не изучен. Экспрессия нмБТШ сопровождается увеличением резистентности, что обусловлено стабилизацией цитоскелетных элементов, таких как актин (Lavoie et al., 1993, 1995). нмБТШ взаимодействуют с

актиновым цитоскелетом, защищая и восстанавливая клеточную структуру (Arrigo, Landry, 1994). Идентификация молекул РНК в составе гранул ТШ позволяет утверждать, что нмБТШ защищают мРНК при стрессах (Nover et al., 1989). Эксперименты, проведенные *in vitro*, продемонстрировали, что отдельные нмБТШ выполняют функции молекулярных шаперонов с участием АТФ (Kim et al., 1998; Lee et al., 1995; Vierling, 1991; Waters et al., 1996; Wehmeyer et al., 1996; Wehmeyer, Vierling, 2000). Молекулярные шапероны связывают частично денатурированные белки и таким образом препятствуют их неправильной агрегации или помогают правильному свертыванию (Евстигнеева и др., 2001; Косаківська, 2003; Vierling, 1991; Waters et al., 1996; Wehmeyer et al., 1996; Wehmeyer, Vierling, 2000).

НмБТШ взаимодействуют с денатурированными субстратами, что хорошо изучено *in vitro*, однако сами клеточные субстраты нмБТШ остаются недостаточно изученными. Для того, чтобы понять механизм шаперонной активности нмБТШ и определить, каким образом они защищают клетки в период стресса, необходимо идентифицировать полипептиды, взаимодействующие с нмБТШ *in vivo* в качестве партнеров или же субстратов. Установлено, что нмБТШ могут взаимодействовать с широким спектром субстратов, что подтверждают наблюдения на растениях, дрожжах и млекопитающих (Lee et al., 1997).

Сведения о том, что синтез нмБТШ происходит при развитии семян, способных противостоять полной

потере клеточной воды, свидетельствуют о защитной функции при обезвоживании и/или регидратации (Almoguera, Jordano, 1992; Coca et al., 1994; DeRocher, Vierling, 1995). Электрофоретический анализ белковых спектров *Phaseolus vulgaris* L. выявил отличия в биосинтезе нмБТШ как на уровне отдельных органов, так и в реакции на нелетально высокую и низкую температуру. Идентифицированы специфические и неспецифичные компоненты спектров низкомолекулярных стрессовых белков разных органов *Ph. vulgaris* на ранних этапах вегетативного развития, что подтверждает участие нмБТШ в формировании защитной реакции (Косаківська, Голов'янко, 2007).

Синтез мРНК нмБТШ и/или продуктов их трансляции происходит в ответ и на низкотемпературный стресс (Колесниченко и др., 2000; Колупаєв, 2001; Косаківська, Гудкова, 2002а; Косаківська, 2003; Berkel et al., 1994; Soto et al., 1999). НмБТШ способствуют развитию устойчивости к охлаждению, что указывает на возможную роль в защите от холодового повреждения (Sabehat et al., 1998).

Низкомолекулярные БТШ, в отличие от других классов молекулярных шаперонов, характеризуются АТФ-независимой активностью (Meirnyk, 1999). Так, БТШ 18 гороха проявляют шаперонную активность и вместе с БТШ 70 предотвращают агрегацию белков в условиях теплового шока, а также участвуют в процессах восстановления нормальной структуры белковых молекул *in vitro* (Lee, Vierling, 2000). БТШ 25, 22, 20 и 18 кД мигрируют в митохондрии, при этом БТШ 22 тесно связывается с мембраной (Боровский,

Войников, 1993). В митохондриях клеток кукурузы под действием высокой температуры происходят накопление БТШ 22, фосфорилирование и альтернативный инtronный сплайсинг этого белка (Lund et al., 2001). Низкомолекулярные БТШ и структурно родственные им α -кристаллины являются стрессовыми белками убиквитиновой природы, обладающими шаперонной активностью (Montfort et al., 1999). Их основная функция — предотвращение необратимой агрегации и последующей денатурации белков. Определение белков, ассоциированных с низкомолекулярными БТШ в условиях теплового шока *in vivo*, выявило, что они защищают от повреждений широкий спектр клеточных функций. Идентифицировано 42 полипептида, являющихся субстратом для БТШ 16,6 кД. Среди БТШ-ассоциированных белков выявлены ферменты, обладающие оксигеназной и ферредоксин-НАДФ-редуктазной активностью. Предполагается, что низкомолекулярные БТШ в комплексе с выявленными 42 полипептидами во время теплового шока предохраняют от повреждений такие ключевые процессы, как транскрипция, трансляция, а также вторичные метаболические реакции (Basha et al., 2004). Использование генетически модифицированных растений позволило установить, что БТШ пшеницы с мол. массой 16,9 и 17,8 кД обладают шаперонной активностью (Basha et al., 2004a). Низкомолекулярные БТШ томатов, индуцированные тепловым шоком, участвуют в формировании устойчивости как к высоким, так и низким температурам (Sabehat et al., 1998). Установлено, что антифризные 32, 35 и 25 кД белки способны модифицировать рост кристаллов льда

в клетках озимой ржи (*Secale cereale*), подвергшихся холодовому стрессу. Они локализуются в эпидермисе и мембранах, окружающих внутриклеточные образования, у растений, адаптированных к холodu (Antikainen et al., 1996). Исследования полиморфизма термостабильных белков проростков пшеницы позволили предположить, что разный уровень морозоустойчивости в пределах одного вида определяется количеством специфических защитных агентов, в частности высокомолекулярных термостабильных полипептидов (Ступникова и др., 2001).

Под воздействием широкого спектра биотических стрессов на уровне транскрипции активируется синтез группы так называемых PR 10 белков. Это низкомолекулярные (порядка 16 кД) внутриклеточные полипептиды, участвующие в формировании защитной реакции (Tanaka et al., 2003). Выделен PR 10 белок, который синтезируется в корнях растений риса, подвергшихся действию солевого стресса. Установлено, что синтез этого белка активизируется при участии жасмоновой кислоты (Hashimoto et al., 2004).

Взаимодействие нМБТШ с белками-субстратами детально исследовано на примере α -лактатальбумина — белка, пребывающего в нескольких конформационных состояниях, которые отличаются степенью упаковки. Нативный α -лактатальбумин содержит ионы Ca^{2+} и имеет стабильную компактную структуру. Лактатальбумин, лишенный ионов Ca^{2+} (апо-форма), находится в состоянии стабильной расплавленной глобулы, сохраняет вторичную структуру, а третичная, хотя и довольно расшатанная, все еще способна поддерживать

стойкую конформацию белка. Аполактатальбумин с восстановленными дисульфидными связями переходит в состояние неблагоустроенной расплавленной глобулы со значительно ослабленной третичной структурой, способной агрегировать с образованием нерастворимого осадка (Панасенко и др., 2003; Linder et al., 1997). Оказалось, что нмБТШ взаимодействуют преимущественно с белками-субстратами, которые пребывают в состоянии неупорядоченной расплавленной глобулы, т.е. со структурами, склонными к агрегации и образованию нерастворимых осадков. НмБТШ не взаимодействуют (либо слабо взаимодействуют) с другими термодинамически более устойчивыми формами частично денатурированного белка (Панасенко и др., 2003; Linder et al., 1997).

Изолированные нмБТШ образуют большие олигомерные структуры, взаимодействующие с частично денатуризованными белками, создавая при этом комплексы еще больших размеров, остающиеся в раскрытом состоянии (Панасенко и др., 2003; Lee et al., 1997).

НмБТШ взаимодействуют с белками-субстратами преимущественно благодаря образованию гидрофобных связей — с частично денатуризованными белками, имеющими гидрофобные участки, и не взаимодействуют (или слабо взаимодействуют) с белками, имеющими нативную структуру (Панасенко и др., 2003; Smykal et al., 2000).

Длительное время считалось, что активность нмБТШ не зависит от АТФ (Панасенко и др., 2003; Parsell, Lindquist, 1993). Однако недавно было установлено, что АТФ влияет на функционирование нмБТШ и струк-

туру белков-субстратов. Показано, что при стрессах в клетках значительно снижается уровень АТФ, что сопровождается связыванием частично денатурированных белков-субстратов с нмБТШ (Панасенко и др., 2003). При переходе к нормальному состоянию концентрация АТФ возвращается к исходному уровню, что сопровождается диссоциацией денатурированных белков и последующей ренатурацией их с участием АТФ-зависимых нмБТШ (Lee, Vierling, 2000).

Таким образом, стрессовые белки являются важным компонентом защитной реакции живых организмов на неблагоприятные воздействия. Особенностью растительной клетки является синтез низкомолекулярных стрессовых белков. Несмотря на имеющиеся сведения об образовании и функциональной активности нмБТШ, вопрос об их роли в формировании ответной реакции на стресс остается открытым.

Проведенные в последнее время исследования структуры и функций стрессовых белков растений указывают на их шаперонную активность. Шапероны выполняют защитную функцию, связывая и стабилизируя неустойчивые в условиях стресса белки, а также транспортируют отдельные полипептиды к определенным компартментам растительной клетки. Появление шаперонов ассоциируется с развитием устойчивости растений к действию конкретного стрессора. Однотипность изменений в биосинтезе белков в стрессовых условиях, выявленная для широкого спектра организмов, позволяет отнести синтез стрессовых белков к неспецифическим реакциям, имеющим общебиологическое значение для формирования адаптационного синдрома и эволюционного процесса в целом.

ГЛАВА 5

ВЛИЯНИЕ ГАММА-РАДИАЦИИ НА БИОСИНТЕЗ СТРЕССОВЫХ БЕЛКОВ

После аварии на Чернобыльской АЭС, в результате которой радионуклидному загрязнению подверглось 5,5 млн га территории Украины (Дорогунцов и др., 1992), изучение влияния ионизирующего облучения на ведущие сельскохозяйственные культуры приобрело особую актуальность. Радиоактивные элементы способны проникать внутрь облученного объекта и вступать во взаимодействие с его структурами и компонентами, поскольку энергия квантов и заряженных частиц существенно превышает энергию внутримолекулярных связей. Ионизирующее излучение приводит как к повреждению химических связей молекул, входящих в состав клеток, так и ионизации, или возбуждению молекул. Это, в свою очередь, изменяет клеточные структуры, нарушает процессы обмена веществ и физиологические функции организма в целом (Гродзинский и др., 1991, Косаківська, Гудкова, 2002).

За период времени продолжительностью 10^{-17} – 16^{-16} сек при взаимодействии ионизирующего облучения с составляющими живых организмов происходит передача ограниченных объемов энергии вдоль траекторий заряженных первичных и вторичных частиц. Наряду с ионизацией образуются возбужденные атомы

со значительным избытком энергии, способные вступать в разнообразные реакции. Дальнейшее превращение молекул с ионизированными и возбужденными атомами в разнообразные частицы, обладающие избыточной энергией, происходит в интервале 10^{-16} – 10^{-11} секунд. На пути траекторий ионизации образуются свободные радикалы молекул клеточных компонентов, с большой скоростью реагирующие с другими молекулами или между собой, что вызывает структурные нарушения и изменения функциональных характеристик макромолекул. Установлено, что степень поражения живых организмов ионизирующими облучением зависит от вида, состояния и специфики организма, от условий облучения, его физических особенностей, величины и мощности (Газиев, 1999).

Одним из видов излучения, широко исследуемого в настоящее время, является гамма-излучение, возникающее в ходе ядерной реакции атомов как природных (таких, как ^{226}Ra), так и искусственных (^{60}Co , ^{137}Cs) радиоактивных элементов и изотопов, и являющееся, по сути, электромагнитным излучением с чрезвычайно короткой длиной волны 10^{-12} – 10^{-11} м. В числе ключевых ответных реакций живых организмов на действие гамма-облучения — разрыв химических связей в макромолекулах, в т.ч. ДНК, который происходит в результате непосредственной ионизации (прямое действие), а также под действием высокореактивных частиц, свободных радикалов, образующихся из других молекул клетки (непрямое действие).

Изменения в структуре клеток и молекул приводят к изменениям в комплексе физиологических

функций, хромосомным перестройкам и другим нарушениям. Характерной особенностью ионизирующего излучения является способность влиять на организм даже в малых дозах, причем это влияние может проявиться спустя определенное время после облучения. Растения отличаются большей радиоустойчивостью по сравнению с животными. Адаптация к ионизирующему излучению зависит от структурных и функциональных характеристик объекта, уровня активности во время облучения и функционирования отдельных ферментативных систем, предотвращающих молекулярные повреждения ДНК (Котеров, Никольский, 1999).

Установлено, что устойчивость к одному из стрессовых факторов обуславливает устойчивость к другим, в том числе и к ионизирующему излучению (Wolff, 1998). В то же время показано, что действие малых доз радиации оказывает стимулирующий эффект — так называемый радиационный гормезис (Нариманов, Корыстов, 1997), повышающий стойкость не только к облучению, но и к другим генотоксичным факторам (Cai, 1999). Единого механизма, ответственного за устойчивость к действию радиации, предположительно не существует, хотя известно, что адаптирующее облучение активизирует репарационные процессы, в частности, восстановление после повреждающего воздействия (Joiner et al., 1999). После острого либо хронического облучения имеет место уменьшение радиочувствительности (Котеров, Никольский, 1999).

Изменения, возникающие в клетках под действием ионизирующей радиации, соответствуют предло-

женной В.Я. Александровым классификации реакций на кратковременные стрессовые факторы: 1) первичные повреждения на уровне структуры клеточных компонентов; 2) вторичные нарушения клеточных структур и процессов непосредственно или опосредованно вызванных первичными повреждениями; 3) формирование процессов адаптации; 4) репарация повреждений (Александров, 1975).

Широкомасштабное загрязнение почв радионуклидами инициировало проведение исследований характера утилизации этих соединений и их влияния на растения. Оказалось, что растения являются наиболее пластичным компонентом с высоким уровнем адаптивного потенциала в системе “почва–растение”. Интенсивность накопления радионуклидов зависит от целого ряда факторов, влияющих на ионообменную емкость растительных тканей (Кравец, 1999). Считается, что адаптация осуществляется в результате формирования такого состояния, при котором при радиационной нагрузке обеспечивается жизнедеятельность, фертильность и нормальная функциональная стабильность всех структур биологического объекта (Котеров, Никольский, 1999).

Изучение характера экспрессии генов растительных клеток в ответ на различные виды окислительного стресса показало, что в таких условиях изменяется активность антиокислительных ферментов (Scandalios, 1997). Ионизирующее излучение приводит к повреждениям молекул ДНК, что является сигналом к синтезу *de novo* репарационных ферментов, отвечающих за устойчивость (Вербенко, 1995). В числе

неспецифических реакций отмечены изменения в синтезе белков у животных и растений, а также бактериофагов. Хроническое облучение крыс вызывало увеличение уровня мРНК БТШ 70 в клетках легких, а в период с 7 по 30 сутки облучения фиксировалось увеличение уровня самого белка. Предполагается, что механизм защитного действия БТШ 70 обусловлен дезагрегацией аномальных белок-белковых взаимодействий. В целом же эффект малых доз радиации (до 200 Гр), реализующийся в экспрессии синтеза БТШ, аналогичен реакции живых организмов на действие широкого спектра стрессовых нагрузок, таких как гипотермия, действие тяжелых металлов и др. (Котеров, Никольский, 1999).

В начале 80-х гг. XX века удалось установить, что после облучения растений высокими дозами гамма-радиации синтезируется *de novo* группа низкомолекулярных белков, не являющихся продуктом распада высокомолекулярных полипептидов, о чем свидетельствует достаточно высокий уровень удельной радиоактивности последних. Одновременно наблюдается существенное повреждение транскрипционно-трансляционной системы, деградация либо дефектная сборка полисом вследствие изменений в молекулах РНК (Коломиец, 1982). Синтез низкомолекулярных полипептидов имел место после гамма-облучения клеток томатов, в частности, идентифицированы 15 и 17 кД цитоплазматические и 22 кД митохондриальный БТШ, проявляющий защитную функцию (Banzet et al., 1998). Выявлены изменения в содержании 70 кД БТШ в

клетках ели, подвергавшейся хроническому облучению в 10-км зоне ЧАЭС (Сорочинский и др., 1996).

Экспонирование растений под ультрафиолетовыми лучами (280–320 нм) вызывало существенные изменения в клетках, а также инициировало процессы, уменьшающие влияние радиации (Brosch, Strid, 1999). У *Pisum sativum* выявлены две группы реакций на действие радиации: изменения компонентов хлоропластов, преимущественно задействованных в процессе фотосинтеза, и уменьшение экспрессии генов, кодирующих пластидные белки (Mackerness et al., 1998). Ультрафиолетовая радиация провоцировала изменения в синтезе липидов, полисахаридов и отдельных белков в клетках водорослей (Arts, Rai, 1997). Выявлена кросс-устойчивость растений к действию гипертермии и ультрафиолетового облучения (Борисова и др., 2001).

Радиация приводит к гибели, мутагенезу, трансформации клеток, ускоряет процессы старения и развития различных патологий. Эти последствия действия радиации преимущественно обусловлены повреждениями молекул ДНК. Под воздействием ионизирующего облучения в макромолекулах, в том числе ДНК, происходит разрыв химических связей, что может быть результатом как прямого влияния, так и действия высокореактивных компонентов, — свободных радикалов. Большинство свободных радикалов, взаимодействующих в облученной клетке с молекулами ДНК, возникают в результате радиолиза воды, а 60–80 % повреждений молекул ДНК происходит вследствие опосредованного действия радиации (Halliwell, Aruoma, 1993). Фактически образование в

результате радиолиза воды активных свободных радикалов в облученных клетках эквивалентно мощному окислительному стрессу. Структурные повреждения молекул ДНК ионизирующей радиацией зависят от степени оксигенации клеток, уровня эндогенных антиоксидантов, комплексообразования ДНК с белками и ее компактизации в составе хроматина, активности системы репарации ДНК (Газиев, 1999).

Ионизирующее облучение является мощным стрессовым фактором, действующим на различные параметры и процессы жизнедеятельности растений. Поскольку основным результатом влияния ионизирующего облучения являются окислительные повреждения молекул ДНК с последующими изменениями в процессе биосинтеза белка, особого изучения требуют образующиеся при этом антиокислительные ферменты и БТШ. Если синтез БТШ детально исследуют в течение продолжительного времени ученые ряда лабораторий мира, то стрессовые белки растений, образующиеся под действием ионизирующей радиации, практически не изучали. Научную новизну и ценность представляют сравнительный анализ изменений, возникающих в процессе биосинтеза белка под действием этих двух стрессов, выявление общих и специфических реакций, выяснение роли белоксинтезирующей системы в адаптации к неблагоприятным воздействиям.

Рост растений зависит от совокупности и интенсивности обменных процессов и является достаточно чувствительным к ионизирующему облучению (Гудков, 1985). Торможение ростовых процессов после действия радиационного фактора считают одним из

начальных видимых проявлений лучевого поражения (Васильев, 1962). В связи с этим исследовали действие острого гамма-облучения на ростовую функцию проростков озимой пшеницы сорта Мироновская 61, для чего 5-суточные растения, находившиеся в фазе первого листка, однократно облучали в диапазоне доз 0,5, 1, 1,5, 3, 5, 7, 10, 15, 30, 50 и 100 Гр. Последующие 6 суток ежедневно измеряли длину надземной части. При дозе от 0,5 до 10 Гр скорость роста по сравнению с контролем не изменялась. Увеличение дозы облучения до 15 и 30 Гр сопровождалось торможением роста после 4-х суток культивирования. Дозы в 50 и 100 Гр достоверно угнетали процесс роста в течение всего 6-суточного послерадиационного периода выращивания растений при $t = 24^{\circ}\text{C}$ (рис. 4). Исследования, проведенные с растениями озимой пшеницы, находящимися в фазе 3-х листьев, выявили, что заметное угнетение роста происходило после облучения дозой 4 Гр на следующий после стресса день, а облучение мощностью 18 Гр полностью прекращало рост (Васильев, 1962). Считается, что скорость торможения роста и развития растений после облучения большими дозами радиации зависит от возраста, видовой радиочувствительности и дозы облучения, а также регенерационного потенциала и эффективности репопуляционных процессов в меристеме (Гродзинский, 2000). Установить же истинные причины торможения роста достаточно сложно из-за широкого массива реакций, на которые может воздействовать облучение. Так, торможение процесса деления клеток меристемы определяют в качестве первого эффекта,

имеющего место после облучения растений наряду с некоторыми быстро возникающими биохимическими нарушениями (Гудков, 1985). Известно, что ТШ также провоцирует торможение ростовых процессов. В частности, 4-часовой ТШ (40°C) уменьшал скорость роста 3-суточных проростков озимой пшеницы, что обуславливалось нарушением пролиферации и связанным с ней растяжением клеток (Жук, 2002). Следовательно, рост растений является термо- и радиочувствительным процессом.

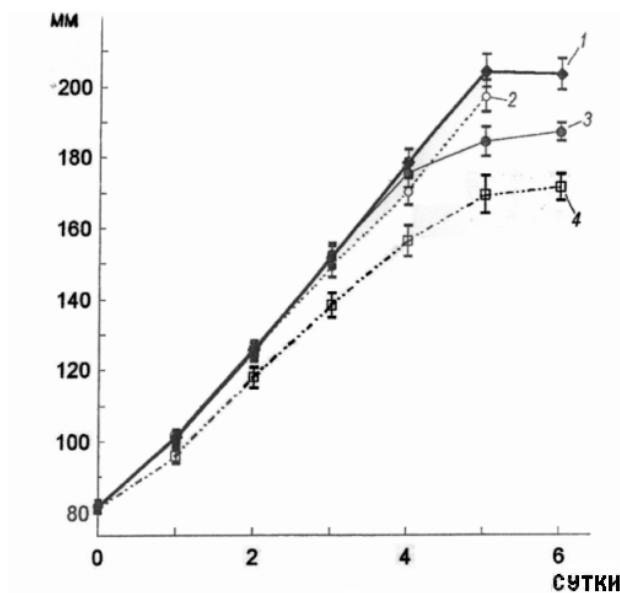


Рис. 4. Изменения длины проростков озимой пшеницы после гамма-облучения в разных дозах: 1 — 0—5 ГР, 2 — 7—10 ГР, 3 — 15—30 ГР, 4 — 50—100 ГР

Для изучения синтеза стрессовых белков в условиях радиации, проростки озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. подвергали однократному острому гамма-облучению на кобальтовой установке “Исследователь” (Россия) в дозах от 3 до 100 Гр при мощности 0,048 Гр/с. Воздействие гамма-радиации исследовали через 2 и 7 часов после облучения. Анализ гелей и их автографов проводили с использованием компьютерной программы Total Lab Version 1.10, что позволило получить денситограммы треков и определить процентное содержание индивидуальных полос в суммарной белковой фракции отдельного трека. Существенные изменения в полипептидном спектре имели место через 4 часа после действия радиации в дозах 3 и 30 Гр. Так, среди новосинтезированных белков идентифицированы полипептиды с мол. массой 32, 40 и 45 кД, а также низкомолекулярные белки с мол. массой от 14 до 20 кД. Одновременно усиливался синтез белков с мол. массой 89, 85, 83, 76, 74, 70, 68 и 51 кД, причем эффект облучения в дозах 3 и 30 Гр практически не отличался. Принимая во внимание, что синтез БТШ является одним из наиболее изученных, сравнивали спектры новосинтезированных полипептидов, образующихся после радиационного и температурного стрессов. Двухчасовой ТШ усиливал синтез 89, 85, 83, 79, 76, 72, 70, 68, 51, 19 и 15 кД белков. Спектр белков, синтезированных через 24 часа после действия гамма-радиации в дозах 3 и 30 Гр, практически не отличался от контроля, за исключением образования высокомолекулярных полипептидов с мол. массой 94 и 96 кД. Значительная часть радиоактивной метки включалась в

полипептиды с мол. массой 110, 109, 108, 85, 83, 77, 76, 74, 70, 68, 65, 59, 56, 53, 51, 46, 41, 38, 36, 28, 25, 23 и 16 кД. Характер синтеза белков через 48 часов после гамма-облучения и ТШ значительно отличался от имевшего место в предыдущие сутки. Вместе с тем для разных стрессов было выявлено много общего, а именно, усиливался синтез 106, 104, 97, 85, 84, 81, 76, 66, 62, 58, 57, 46, 43, 40, 35, 34, 32, 30, 24, 23, 21, 20, 15 и 14 кД полипептидов на фоне резкого уменьшения синтеза белков с мол. массой 75, 68, 61, 59, 51 и 48 кД.

Существенные отличия выявлены в средней части белкового спектра через 72 часа после стрессовых нагрузок. Усиливался синтез 82, 76, 73, 72, 70, 62, 57, 42, 37, 33, 27, 22, 15 и 14 кД полипептидов, прекращалось образование 80 кД и затухал синтез 68 кД белка. Следовательно, при облучении проростков в дозах 3 и 30 Гр основные сдвиги в синтезе белков наблюдались через 4 часа после стресса. Спектры же новосинтезированных белков через 2 суток практически не отличались от контрольных, что позволило в дальнейших экспериментах ограничиться интервалом в 24 часа после действия гамма-радиации.

Наиболее интересные результаты были получены после облучения проростков озимой пшеницы в дозе 15 Гр (Гудкова и др., 2001, 2001a). Спектр новообразованных общих белков состоял из фракций с мол. массой 93, 89, 82, 80, 75, 68, 57, 52, 46, 42, 37, 30, 29, 27, 26, 24, 22, 21, 18, 16, 15, 14 и 13 кД (рис. 5). Через 4 часа после действия гамма-радиации и через 2 часа после ТШ (40 °С, 2 часа) усиливался синтез полипептидов с мол. массой 82, 75, 67, 36, 31, 30, 19, 17 и 14 кД. В

случае радиоактивного облучения через 4 часа не обнаружены 16 кД, а через 24 часа — 36 и 19 кД белки.

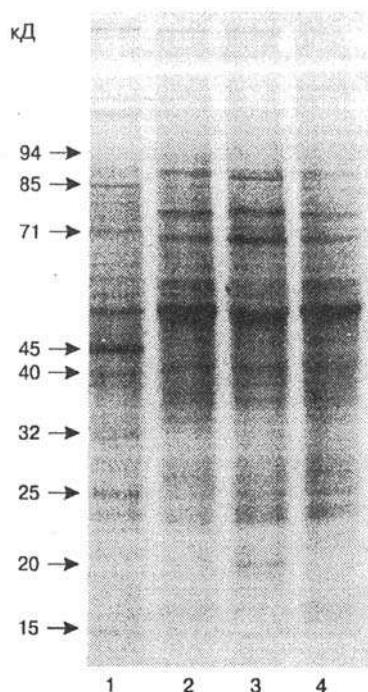


Рис. 5. Электрофоретические спектры новообразованных общих белков проростков *Tricicum aestivum* L: 1 — через 4 часа после гамма-облучения в дозе 16 Гр; 2 — через 24 часа после гамма-облучения в дозе 15 Гр; 3 — тепловой шок (40° , 2 часа); 4 — контроль

В целом существенные изменения претерпел синтез 30 полипептидов в диапазоне мол. масс 109–14 кД. Отметим, что характер синтеза стрессовых белков через 4 часа после гамма-облучения в дозе 15 Гр значительно отличается от других анализированных вариантов. В частности, в высокомолекулярном участке спектра синтезировался *de novo* 80 кД

полипептид, а также усиливался синтез 109 (3,5 %), 85 (4,2 %), 74 (2,8 %) и 71 (4,3 %) кД белков (табл. 4). На этом фоне уменьшался синтез 56 (2,7 %), 50 (6,4 %) и 41 (1,0 %) кД полипептидов и фактически прекращался синтез белков с мол. массой 77, 68 и 67 кД. Специфической компонентой стрессового ответа был интенсивный синтез белка с мол. массой 45 кД (11,5 %). В тоже время в низкомолекулярной части спектра обнаружены 40 (3,7 %) и 32 (6,7 %) кД белки, а также зафиксировано уменьшение образования 36 и 33 кД и усиление 25 кД (5,6 %) полипептидов. В промежутке 14–20 кД идентифицированы 6 новых полипептидов. В отличие от реакции на ТШ фактически затухал синтез 19 кД полипептида. Синтез цитоплазматических БТШ 17 и 15 кД под действием гамма-радиации (доза 3 кГр) обнаружен в клетках культуры томата (Banzet et al., 1998).

Спектр новосинтезированных полипептидов после 24-часового гамма-облучения отличался от контрольного варианта наличием в высокомолекулярной части белков с мол. массой 96 и 94 кД и отсутствием 40 кД полипептида. Температурный шок усиливал синтез высокомолекулярных (85, 77 и 70 кД) и низкомолекулярных (28 и 19 кД) полипептидов (рис. 5).

Первостепенная роль системы энергообеспечения клеток в ответных реакциях на стрессовые воздействия и наличие собственного генетического аппарата у митохондрий вызывают особый интерес к изучению митохондриальных белков — некоторые из них обладают шаперонной активностью (Побежимова, Войников, 2000; Майор и др., 1999; Schatz, 1996).

*Таблица 4. Влияние гамма-радиации и теплового шока на интенсивность синтеза белка в проростках *Tricicum aestivum* L. (по включению радиационной метки)*

Мол. масса	Интенсивность синтеза белков, % к общему количеству							
	общих				митохондриальных			
	K	ГР, через 24ч	ГР, через 4 ч	TШ	K	ГР, через 4 ч	ГР, через 4 ч	TШ
109	0,2±0,1	3,5±0,1	0,2±0,1	0,3±0,1	1,2±0,3	2,1±0,1	—	2,2±0,1
94	—	—	1,6±0,1	0,1±0,01	—	—	—	—
85	2,0±0,4	4,2±0,3	7,4±0,7	4,9±0,5	8,3±0,5	5,4±0,6	8,8±0,2	14,5±0,2
83	1,0	2,3±0,2	1,2±0,3	1,3±0,1	2,5±0,3	2,2±0,2	—	2,0±0,3
80	—	2,7±0,5	—	—	—	—	—	—
77	4,3±0,6	—	4,8±0,7	7,1±0,5	—	—	—	—
71	—	4,3±0,1	—	—	—	2,3±0,1	—	—
70	3,6±0,4	—	4,8±0,2	9,6±1,3	1,8±0,4	—	4,3±0,6	6,9±0,2
50	10,4±0,8	6,4±0,5	9,6±1,0	10,5±0,4	10,0±0,5	1,7±2,7	5,9±1,4	5,2±0,9
45	—	11,5±0,7	—	—	—	1,7±0,3	—	0,4±0,1
40	—	3,7±0,4	1,0±0,2	—	2,2±0,3	1,2±0,4	—	2,2±0,5
32	—	6,7±0,3	—	—	2,2±0,3	3,2±0,2	—	1,3±0,2
25	3,4±0,1	5,6±0,6	3,8±1,0	2,6±0,5	—	1,6±0,3	—	2,6±0,5
19	1,9±0,7	—	—	8,2±0,5	—	—	—	2,6±0,2

П р и м е ч а н и е : К – контроль, ГР – гамма-радиация в дозе 15 Гр, ТШ – тепловой шок (40 °С, 2 часа), “—” – данные отсутствуют.

Известно, что воздействие экстремальных температур индуцирует у растений синтез митохондриальных БТШ 90, 70, 60, а также значительное количество низкомолекулярных БТШ (15–30 кД). Установлено, что шаперонная система митохондрий служит для импорта белка в эти органеллы и для формирования нативной конформации импортированных молекул (Маргулис, Бухова, 2000; Побежимова, Войников, 2000).

Анализ электрофоретических спектров митохондриальных белков выявил 22 фракции в диапазоне мол. масс 89–13 кД (рис. 6). Под воздействием как ТШ, так и гамма-облучения усиливается синтез 86, 45 и 28 кД полипептидов. ТШ также провоцировал усиление синтеза 85, 79, 19 и 17 кД белков. Установлено, что через 4 часа после действия ионизирующего облучения появляются новые 71, 25 и 14 кД полипептиды, а также усиливается синтез 109 и 32 кД белков (табл. 4). В тоже время интенсивность синтеза 85 кД белка уменьшалась, а синтез 80, 68 и 20 кД полипептидов прекращался полностью.

После 24-х часов с момента облучения наблюдался синтез 7 полипептидов в диапазоне мол. масс 85–28 кД. По сравнению с электрофореграммой, снятой через 4 часа после стресса, зафиксировано отсутствие 109, 83, 45, 40, 38, 32, 25 и 14 кД полипептидов. При тепловом шоке усиливается синтез белков с мол. массой 109, 85, 74, 70, 28 и 20 кД и синтез *de novo* 25 и 19 кД полипептидов. Одновременно происходило угнетение синтеза 56, 50, 46, 32 и 23 кД белков и практически полное прекращение синтеза 77 кД полипептида (рис. 6).

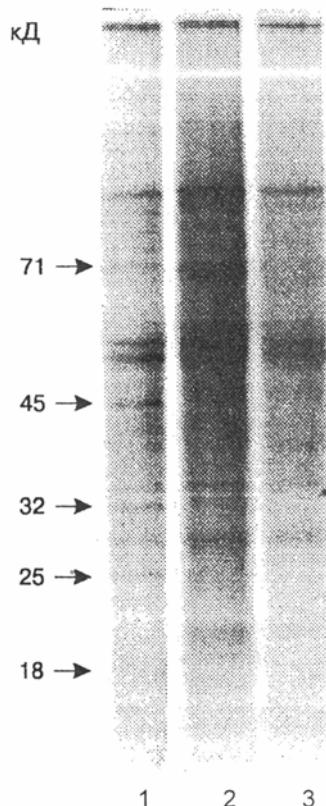


Рис. 6. Электрофоретические спектры митохондриальных белков проростков *Tricicum aestivum* L: 1 — через 4 часа после гамма-облучения в дозе 15 Гр; 2 — тепловой шок (40° , 2 часа); 3 — контроль

ТШ и гамма-облучение экспрессировали синтез полипептидов с мол. массами 32, 25 и 20 кД из семейства низкомолекулярных БТШ. В ответ на радиационное облучение синтезируются полипептиды с мол. массами 71 и 70 кД, тогда как ТШ усиливает синтез полипептидов с мол. массами 73 и 70 кД из семейства БТШ 70. Разный характер индукции их синтеза в ответ на различные стрессы свидетельствует о различных

функциях, выполняемых ими в клетке. При этом гамма-облучение вызывало синтез *de novo* 15 кД, а ТШ – 19 кД полипептидов. Индукцию синтеза полипептида с мол. массой 45 кД во фракции общего белка следует рассматривать как специфическую реакцию белоксинтезирующей системы клетки на действие радиации.

Таким образом, установлено, что под воздействием гамма-облучения в клетках проростков пшеницы изменяется белковый синтез (Гудкова и др., 2001). Анализ спектров новосинтезированных полипептидов выявил меньшую изменчивость синтеза митохондриальных белков по сравнению с общим. В то же время наличие общих синтезированных *de novo* полипептидов и в митохондриях, и суммарном белке свидетельствует о значительном вкладе митохондриома в синтез стрессовых полипептидов. Общие для радиационного и температурного стрессов 70, 32 и 25 кД БТШ обладают шаперонной активностью и, следовательно, выполняют защитную функцию. Впервые установлено, что радиация индуцирует синтез специфического 45 кД полипептида, обнаруженного во фракции как митохондриального, так и общего белка. Известно, что ионизирующее облучение вызывает повреждения молекул ДНК, служащие сигналом для синтеза *de novo* репарационных ферментов, обеспечивающих повышенный уровень устойчивости к воздействию радиационного фактора (Котеров, Никольский, 1999). Вероятно, 45 кД полипептид относится к таким ферментам репарации, о чем свидетельствуют индукция его новообразования в начальный период после гамма-облучения растений и

уменьшение скорости его синтеза спустя сутки после стрессового воздействия.

Как известно, ядро активно реагирует на стресс (Газиев, 1999). Однако характер изменений ядерных белков растений, подвергшихся радиационному облучению, остается неисследованным. Неотъемлемой составляющей частью хроматина всех эукариотичных клеток являются связанные с ядерной ДНК низкомолекулярные структурные белки, обогащенные аргинином и лизином (Босток, Самнер, 1981). Функции этих полипептидов остаются до конца не исследованными, хотя и известно, что гистоны H2A, H2B, H3 и H4, формируя так называемый кор, участвуют в процессах первичной компактизации двусpirальной ДНК, образуя вместе с ней нуклеосомы, а гистон H1 задействован в пространственной упаковке нуклеосом (Георгиев, Бакаев, 1978). Установлено подобие коровых гистонов растений по показателям электрофоретической подвижности и аминокислотному составу, за исключением гистона H1 (Гофштейн, 1978), а также участие этих белков в процессе неспецифического угнетения транскрипции ДНК (Bonner, 1979).

На рис. 7 представлены электрофореграммы ядерных белков этиолированных проростков озимой пшеницы, подвергшихся действию гамма-радиации в дозах 3, 5, 50, 100 Гр и ТШ (40 °C, 2 часа). Гистон H3 представлен двумя фракциями: димером и мономером. Максимальное количество димера H3 наблюдалось после облучения растений в дозе 3 Гр, мономера H3 — 50 Гр (табл. 5). Значительное количество ядерных белков составляла фракция гистона H1, включающая пять

компонентов. Лизинобогащенный гистон H1, связанный с межнуклеосомной ДНК, играет важную роль в обеспечении наднуклеосомной упаковки хроматина. Гистон H1 может вступать во взаимодействие с маркерной и нуклеосомной ДНК, а также с гистонами H2A, H3 и H4 (McGhee, Felsenfeld, 1980).



Рис. 7. Электрофоретические спектры кислоторастворимых ядерных белков проростков озимой пшеницы: 1 — контроль 24 °C; 2 — через 2 часа после действия гамма-радиации в дозе 3 Гр; 3 — 5 Гр; 4 — 50 Гр; 5 — 100 Гр; 6 — через 2 часа после действия ТШ (40 °C, 2 часа)

Одна из фракций гистона Н1 стабилизирует два полных оборота кора нуклеосома, а ее глобулярный участок при этом локализован в ареале входа и выхода суперспирали ДНК (Nagl, 1985).

Нашиими исследованиями установлено, что гамма-облучение проростков озимой пшеницы в дозах 5 и 50 Гр вызывает увеличение количества гистонов Н1, Н2В и Н3, тогда как дозы 3 и 100 Гр снижают содержание этих гистонов (табл. 5).

Таблица 5. Относительное количество гистоновых белков в электрофоретических спектрах проростков озимой пшеницы после гамма-облучения

Гистоны	Относительное количество в спектре после облучения, % к общему содержанию			
	3 Гр	5 Гр	50 Гр	100 Гр
Н3 (димер)	14,6±1,2	11,8±0,8	13,4±0,9	12,2±1,0
Н1	22,9±2,3	24,5±2,1	24,4±1,9	21,9±2,0
Н2В	4,0±0,3	5,0±0,2	5,0±0,4	4,2±0,6
Н3 (мономер)	7,5±1,0	9,8±0,9	12,3±1,1	7,6±1,0
Н4	20,4±1,8	13,6±1,6	16,9±1,7	13,4±0,9

Для всех проанализированных доз гамма-облучения основные изменения были выявлены в так называемых “минорных” фракциях ядерных полипептидов, экстрагированных вместе с гистонами. На электрофо-

рограммах белков, выделенных из проростков озимой пшеницы, подвергшихся воздействию гамма-облучения в дозах 3, 4 и 5 Гр, идентифицировано появление полос между гистонами H1 и H2B (максимальное относительное содержание белка — 2,2 и 1,6 %, соответственно). Гамма-облучение в дозах 50 и 100 Гр приводило к появлению шести полос (максимальное относительное содержание белка — 2,3 и 2 %, соответственно). Кроме того, после облучения в дозе 3 Гр над димером H3 фиксировали появление шести, 5 Гр — четырех, 50 Гр — пяти и 100 Гр — семи дополнительных полос, причем максимальное относительное содержание белка (3 %) выявлено после облучения проростков в дозе 50 Гр.

Дополнительные сведения о составе ядерных полипептидов получены при электрофорезе кислото-ратворимых ядерных белков, выделенных из проростков озимой пшеницы, подвергшихся гамма-облучению в дозах 15 и 30 Гр. Сравнивая белковые спектры, не выявили существенных изменений в составе гистоновых фракций после облучения в дозе 15 Гр, а также через 7 часов после ТШ (рис. 8). Однако увеличение дозовых нагрузок гамма-облучения до 30 Гр и выше приводило к значительным изменениям белковых спектров: уменьшению количества белков во фракциях димера H3, мономера H3 и, особенно, гистона H4. В тоже время зафиксировано значительное усиление “минорных” фракций белков, в частности, трех — расположенных ниже гистона H4, двух — между гистонами H4 и H3 (мономером), а также существенное уменьшение количества “минорных” фракций над димером H3, между

димером H3 и гистонами H1 и H2B (рис. 8). Все эти “минорные” фракции являются кислоторастворимыми ядерными белками, экстрагированными вместе с гистонами.

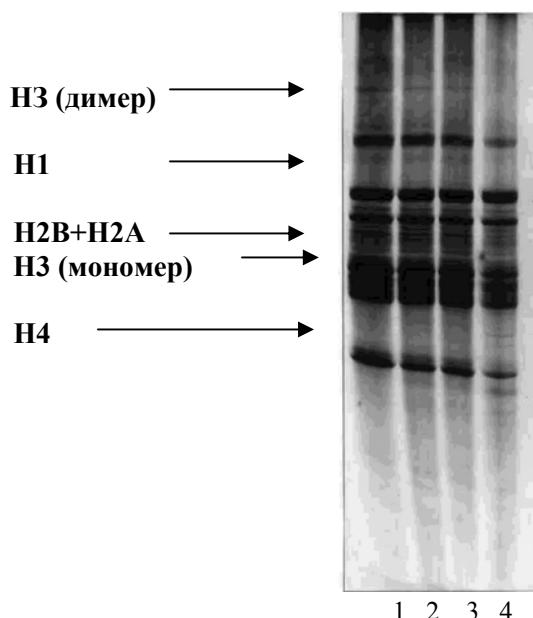


Рис. 8. Электрофоретические спектры гистоновых белков проростков озимой пшеницы: 1 — контроль (24°C); 2 — через 7 часов после действия ТШ (42° , 2 часа); 3 — через 7 часов после гамма-облучения в дозе 15 Гр; 4 — 30 Гр

Уменьшение интенсивности полосы, соответствующей гистону H4, и появление рядом с ней новых полос свидетельствуют о частичной модификации гистона H4. Известно, что модифицированные белки, вступая во взаимодействие с молекулами ДНК, могут под-

держивать различные уровни конденсации в отдельных участках хроматина (Csordas, 1990).

Электрофоретические спектры кислоторастворимых ядерных белков, полученные через 2 часа после ТШ, существенно отличались от вариантов контроля и гамма-облучения (рис. 8), что свидетельствует о нарушениях в структуре хроматина и согласуется с результатами наших ультраструктурных исследований. Изменения зафиксированы во всех фракциях гистоновых белков: наиболее существенно уменьшалось количество димера Н3 и возросло — Н2А—Н2В-подобных гистонов. Кроме того, образовывались многочисленные полосы “минорных” фракций, отсутствующие в других вариантах. В тоже время электрофоретические спектры кислоторастворимых ядерных белков, экстрагированных через 7 часов после действия ТШ, практически не отличались от контрольных и спектра, полученного после гамма-облучения в дозе 15 Гр. Вероятно, в этот временной интервал восстанавливается структура хроматина. Выявленные различия в спектрах кислоторастворимых ядерных белков свидетельствуют об обратимости процесса конденсации хроматина, имеющего место после действия высоких температур, что также подтверждают проведенные ранее ультраструктурные исследования (Гудкова, Заславский, 2002).

Таким образом, гамма-облучение проростков озимой пшеницы в дозе 30 Гр и выше вызывает значительные изменения в составе кислоторастворимых ядерных белков. Преимущественно они выражаются в уменьшении количества основных фракций гистона Н4, димера и мономера Н3 и появлении “минорных” фрак-

ций, которые являются их модифицированными формами, влияющими на процесс регуляции конформационного состояния хроматина. В пользу этого свидетельствует достаточно высокая устойчивость к радиационному стрессу на нуклеосомном уровне организации хроматина, которая изменялась только после воздействия больших доз ионизирующего облучения (Коломиец, 1982). Появление через 2 часа после действия ТШ значительного количества новых кислоторастворимых ядерных белков, исчезающих через 7 часов после шока, связано с процессами формирования стрессового ответа и последующего восстановления структуры ядра, наступающими по окончании шокового воздействия. Изменения в белковом синтезе ядра, происходящие в результате стресса, носят как специфический, так и неспецифический характер и являются частью адаптационного синдрома растений.

В результате анализа характера изменений в составе фракций общего, митохондриального и кислоторастворимых ядерных белков клеток проростков озимой пшеницы под воздействием радиационного и температурного стрессов выявлены следующие закономерности. Стressовые условия преимущественно влияют на качественный и количественный состав легкорастворимых белков; имеет место образование новых белков в высоко- и низкомолекулярных участках белкового спектра. Радиационный и температурный стрессы вызывают увеличение синтеза общих белков, из семейств БТШ 110, 90 и 70. Кроме того, оба стресса сопровождаются синтезом *de novo* и усилением синтеза митохондриальных белков из семейств

БТШ 110, 70 и низкомолекулярных БТШ. Существенные изменения в белковом синтезе выявлены через 4 часа после действия гамма-радиации. Синтез полипептида с мол. массой 45 кД во фракции как общего, так и митохондриального белка является специфической реакцией белоксинтезирующей системы на гамма-облучение. На вторые и трети сутки после воздействия ионизирующего облучения и теплового шока синтез белков нормализуется, спектры полипептидов проростков озимой пшеницы практически не отличаются от контроля. Наличие одинаковых для фракций митохондриального и общего белка, синтезированных *de novo* полипептидов, указывает на активное участие митохондриона в процессе синтеза стрессовых полипептидов. Гамма-облучение проростков озимой пшеницы в дозах 30 Гр и выше вызывало незначительное уменьшение количества гистона Н4, димера Н3 и мономера Н3 и появление “минорных фракций”, являющихся модификациями этих гистонов. Через 2 часа после ТШ увеличивается количество кислоторастворимых ядерных белков, исчезающих через 7 часов после шока в результате восстановления структуры ядра. Изменения на молекулярном и ультраструктурном уровнях взаимосвязаны. Как известно, стрессовые белки преимущественно синтезируются на мембранах гранулярного эндоплазматического ретикулюма на фоне распада полисом (Блехман, Шеламова, 1992). Способность белоксинтезирующей системы к переходу на раздельное существование матриц и рибосом обеспечивает их целостность, необходимую для быстрого включения в репарационные

процессы при нормализации параметров внешней среды (Клячко, Бочарова, 1980). После гамма-облучения в дозе 100 Гр на фоне уменьшения количества рибосом и полисом в цитоплазме уменьшается плотность локализации рибосом на поверхности гранулярного эндоплазматического ретикулюма по сравнению с условиями теплового шока (Гудкова, Мартын, 2001). Минимальная доза гамма-радиации (15 Гр), ингибирующая рост, вызывает торможение ростовых процессов только на 4-е сутки после облучения и активизацию синтеза белков, подобных БТШ. Следовательно, синтез стрессовых белков является определяющим для ультраструктурных перестроек клеток растений.

В целом физиологический ответ проростков озимой пшеницы на действие радиационного и температурного стрессов является комплексом последовательных реакций, происходящих на разных организационных уровнях. Прежде всего это синтез стрессовых белков — неспецифический компонент адаптационного синдрома; далее — ультраструктурные изменения, на уровне которых проявляются специфические реакции органелл, а также неспецифические реакции: распад полисом, сегрегация ядрышек, нагромождение пластоглобул в этиопластах, нарушение оболочек и увеличение контактов различных органелл. Между синтезом стрессовых белков и ультраструктурными изменениями клетки существуют определенные связи и зависимость. Образование стрессовых полипептидов, обладающих шаперонной активностью в ответ на действие ионизирующего излучения свидетельствует о важной роли этих макромолекул в формировании защитной реакции и адаптационного синдрома в целом.

ГЛАВА 6

РУБИСКО И СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ

Среди важнейших физиологических процессов растений фотосинтез является одним из наиболее чувствительных к отрицательным воздействиям. Так, незначительное повышение температуры по сравнению с характерной для обычной среды обитания того или иного вида может существенно влиять на фотосинтез (Larcher, 1995). Центральное звено в процессе фотосинтеза принадлежит Д-рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазе/оскигеназе (EC.4.1.39) (Рубиско) — белку, который в 1947 году выделили из листьев шпината Уайлдман и Боннер (Wildman, Bonner, 1947) и с тех пор интенсивно исследуют во многих лабораториях мира. На долю Рубиско приходится 60 % от общего количества растворимых белков растительной клетки (Ellis, 1979). Белок локализован в ассоциатах хлоропластов (Lyttleton, Ts’O, 1958), на мембрanaх тилакоидов (Wildman, 1967), выявлен во всех растениях, содержащих хлорофилл *a*, включая синезеленые водоросли (Kung, 1977).

Наличие фермента в фотосинтезирующих бактериях (Bowman, Chollet, 1980) свидетельствует о том, что Рубиско участвовал в наиболее древних системах превращения солнечной энергии в химическую. Прини-

мая, что хемоавтотрофные бактерии предшествовали появлению фотосинтезуирующих организмов, можно утверждать, что Рубиско появилась несколько позже белков, участвующих в транспорте электронов, или одновременно с ними, т.е. около 2 млрд. лет назад.

Рубиско — высокомолекулярное соединение с мол. массой 550 тыс. дальтон (Gray, 1979). Молекула ферmenta состоит из двух типов субъединиц: восьми больших с мол. массой 55 кД и восьми малых (12–15 кД) (Baker et al., 1975, 1977). На долю малых субъединиц приходится 25–29 % общего содержания белка высших растений (Kung, 1977). Активный центр ферmenta локализован на больших субъединицах (Gray, Kekwick, 1974). Рубиско катализирует реакцию карбоксилирования Д-рибулозо-1,5-дифосфата (РДФ) с образованием двух молекул 3-фосфоглицериновой кислоты (ФГК) (Horecker et al., 1956; Jakoby et al., 1956; Weissback et al., 1956). Позднее, в 70-х годах XX века было установлено, что Рубиско также катализирует процесс фотодыхания, окисляя молекулу РДФ с образованием молекулы ФГК и молекулы фосфогликоловой кислоты (Badger, Andrews, 1974; Kung, Marsho, 1976). Рубиско находится в хлоропластах в свободном и связанном состояниях. Свободная, или растворимая форма ферmenta локализована в строме хлоропласта, а связанная ассоциирована с мембранными тилакоидами (Алиев и др., 1982). Ассоциация Рубиско с мембранный системой хлоропаста установлена благодаря электронно-микроскопическим исследованиям (Alder et al, 1993). Свободная Рубиско связывается с мембранными тилакоидами на ранних стадиях онтогенеза хлоропластов, что сопро-

вождается изменением в соотношении карбоксилазной/оксигеназной активности фермента в сторону усиления карбоксилазной функции. Предполагается, что биологическая роль мембранных связанный формы Рубиско состоит в регуляции соотношения интенсивности процессов фотосинтеза и фотодыхания при различных физиологических состояниях растений (Алиев и др., 2001). Возрастание ферментативной активности мембранных связанных мультиферментного комплекса, включающего Рубиско, свидетельствует о мембранным уровне регуляции функциональной активности ферментов (Бабаджанова и др., 2002).

Исследования биосинтеза Рубиско показали, что большие субъединицы синтезируются на 70 S хлоропластных рибосомах под контролем хлоропластной ДНК, а малые — на 80 S цитоплазматических рибосомах под контролем ядерной ДНК (Kung, 1977). Малые и большие субъединицы объединяются в молекулы фермента в хлоропластах после транспорта в них из цитоплазмы предшественников малых субъединиц Рубиско (Ellis et al., 1989; Roy, 1998). Следовательно, Рубиско — перспективный модельный белок, который изучают, анализируя ключевые физиологические процессы — фотосинтез, фотодыхание, генетическое детерминирование и наследование.

Изучение влияния негативных факторов на карбоксилазную активность Рубиско показало способность растения сохранять фотосинтетическую активность в стрессовых условиях. Как известно, фотосинтетический аппарат имеет высокий уровень надежности. Если бы фотосинтез оказался ненадежным процессом,

это означало бы катастрофу для биосферы в целом (Гродзинский, 1983). Фотосинтетический аппарат отдельных растений не повреждается в условиях повышенных температур, способен восстанавливать функциональную активность хлоропластов при снижении температуры до нормальной. Температурный режим влияет на содержание хлорофилла, белков светособирающего комплекса, цитохрома и количество Рубиско (Makino et al., 1994). Так, ТШ приводит к уменьшению количества больших и малых субъединиц Рубиско, причем более уязвимым является синтез малых субъединиц, выполняющих регуляторную функцию в каталитической активности фермента. Большие субъединицы — носители активного центра — более устойчивы к ТШ, что позволяет молекуле фермента сохранять каталитическую активность в стрессовых условиях. Установлено, что ТШ провоцирует конформационные изменения в молекуле Рубиско, которые содействуют адаптации к стрессу (Weidner, Fehling, 1985).

Как известно, процесс фотосинтеза особенно чувствителен к прямому действию ТШ. Угнетение фотосинтетической активности непосредственно обусловлено снижением активности Рубиско. Скорость образования ксилулозо-1,5-бифосфата, замедляющего каталитическую активность Рубиско, возрастает с повышением температуры. В тоже время карбоксилазная активность фермента в листьях хлопка и табака уменьшается уже через 7 секунд после воздействия ТШ. Следовательно, ТШ оказывает прямое и непрямое воздействие на активность Рубиско и фотосинтез в

целом (Salvucci, Crafts-Brandner, 2004).

Повреждающие воздействия в умеренных дозах могут вызывать неспецифическое повышение устойчивости клеток животных и растений, названное перекрестной адаптацией (Sabehat et al., 1998). Умеренный тепловой шок приводит к денатурации белков хлоропластов, в ликвидации повреждений которых участвуют БТШ. Молекулярные шапероны обнаружены в строме хлоропластов и внутритилакоидном пространстве (Meirnyk, 1997). Предполагается, что БТШ способствуют защите фотосинтетического аппарата, в частности, интенсификации reparации реакции Хилла после повторного прогрева растений (Шаркова, 2001).

Устойчивость фотосинтетического аппарата к тепловому шоку меняется под влиянием освещенности. Предварительный ТШ повышает устойчивость ФСII к совместному действию нагрева и яркого света (Singh, Singhal, 2001). Повышение устойчивости сопровождается синтезом нм БТШ (Stapel et al., 1993).

Установлено, что такие факторы окружающей среды, как освещенность и концентрация CO₂ регулируют активность Рубиско, изменяя концентрацию компетентных реакционных центров и их активность (Вийль, 2002). Концентрация CO₂ в атмосфере лимитирует скорость карбоксилирования, т.е. Рубиско никогда не проявляет своей максимальной активности. При концентрации CO₂, которая нормально насыщает фотосинтез, верхний предел скорости карбоксилирования определяется синтезом субстрата — рибулозобифосфата (Вийль и др., 2001).

Наряду с синтезом БТШ в фотосинтезирующих

клетках в экстремальных условиях усиливаются процессы, элиминирующие активные формы кислорода (АФК) и свободные радикалы, и уменьшающие поступление световой энергии к реакционным центрам (РЦ) ФСII (Foyer et al., 1994). Имеются доказательства участия БТШ в повышении устойчивости фотосинтетических мембран к гипертермии, в т.ч. на ярком свету (Stapel et al., 1993). ТШ в период роста индуцирует увеличение активности и/или содержания таких ферментов, как супероксидисмутаза, каталаза, аскорбат-пероксидаза, защищающих от свободнорадикального окисления биологические структуры (Ye et al., 2000; Sairam et al., 2000).

Рубиско — универсальная модель для изучения влияния ТШ на синтез белков хлоропластов, а также взаимодействия между ядром и хлоропластами в процессе биосинтеза хлоропластных белков (Barkan, Goldschmidt-Clermont, 2000). Синтез субъединиц Рубиско уменьшается с увеличением температуры ТШ (33–40 °C) и достигает минимального уровня (20–30 % от контрольного) при температуре максимального синтеза БТШ (39–40 °C). После ТШ при 38 °C синтез субъединиц Рубиско восстанавливается до контрольного уровня одновременно с уменьшением синтеза БТШ. В целом синтез хлоропластных белков менее чувствителен к ТШ, чем белков цитоплазмы, а транспорт белков в хлоропласти (на примере малых субъединиц Рубиско) продолжается при ТШ (Vierling, Key, 1985).

Особо чувствительной к действию ТШ оказалась тилакоидная система зрелых хлоропластов землян-

ики и пшеницы. Формирование крупных гран наблюдалось в хлоропластах при интенсивных прогревах в течение 30 минут (Палеева и др., 1993; Кислюк и др., 2004).

Тактика адаптации растений к низким температурам заключается в продлении процесса накопления метаболического субстрата и энергии, происходящего в результате структурно-функционального приспособления фотосинтетического аппарата (Климов и др., 1993). Действие умеренного ($10\text{--}6^{\circ}\text{C}$) низкотемпературного стресса на биосинтез растительных белков, в отличие от теплового шока, проявляется только через 24 часа. При этом имеют место угнетение процесса образования нормальных полипептидов и биосинтез специфических стрессовых белков. Такой процесс является обратимым — после возвращения растений в нормальные температурные условия биосинтез традиционных белков полностью восстанавливается (Hakn, Walbot, 1989). Снижение температуры культивирования риса до $15/10$ и $11/6^{\circ}\text{C}$ существенно уменьшало количество синтезированной мРНК большой и малой субъединиц Рубиско и, соответственно, — малых (до 90 %) и больших (до 80 %) субъединиц фермента (Hakn, Walbot, 1989). Холодоустойчивые и чувствительные генотипы цитрусовых при снижении температуры существенно уменьшают количество синтезированных больших субъединиц Рубиско (Mauk et al., 1989). Снижение температуры до 0°C угнетало процесс биосинтеза малых субъединиц Рубиско проростков рапса (Meza-Basso et al., 1986), а выращивание шпината и фасоли при температуре 10°C в течение 10

суток сопровождалось повышением уровня карбоксилазной активности Рубиско (Holaday et al., 1992). Закаливание озимой пшеницы и огурцов при температуре +2 ° и +10 °С в течение недели увеличивало карбоксилазную активность Рубиско (Беляева и др., 1985). Изменение величины электрофоретической подвижности Рубиско после холодовой нагрузки может быть обусловлено конформационными изменениями в молекуле белка, носящими приспособительный характер (Войников и др., 1986). Адаптационные изменения при холодовом стрессе включают колебание величины карбоксилазной активности Рубиско (Holaday et al., 1992).

Отсутствие эффекта угнетения С-3 фотосинтеза кислородом на фоне низких температур обусловлено сохранением уровня фотофосфорилирования и регенерации РДФ, а также соответствующей каталитической активностью Рубиско (Schnyder et al., 1986). Соотношение между уровнями фотосинтеза и фотодыхания возрастает на фоне низких температур, в то же время соотношение между карбоксилазной и оксигеназной активностью Рубиско не изменяется (Lenhnerr et al., 1985).

Следовательно, стрессовые температуры непосредственно влияют на качественные и количественные показатели ключевого фермента процесса фотосинтеза Рубиско. Причем количественные сдвиги носят односторонний (в сторону уменьшения) характер, а качественные зависят от вида стресса. Снижение уровня карбоксилазной активности Рубиско в условиях ТШ соответствует общему затуханию метаболизма, фото-

синтеза в том числе, что позволяет максимально сохранить стабильным водный режим и адаптироваться к действию высоких температур. Увеличение карбоксилазной активности Рубиско при холодовом стрессе соответствует активизации процесса фотосинтеза и накоплению запасных веществ, что помогает растению противостоять негативному влиянию низких температур.

Одним из факторов, существенно влияющих на активность фотосинтетического аппарата растений, является водный дефицит. Диффузию СО₂ к центрам карбоксилирования ограничивает закрытие устьиц (Cornic, 1994). При этом снижается активность Рубиско, что не всегда связано с уменьшением количества самого фермента (Berkowitz, 1998; Castrillo, Trujillo, 1994). Установлено, что прогрессирующая почвенная засуха приводит к ингибированию фотосинтетической активности, скорость обращения цикла Кальвина замедляется, регенерация Рубиско и количество фермента снижается, в результате чего уменьшается скорость фиксации СО₂ (Дроздова и др., 2004).

Чрезвычайно чувствительными к условиям водного стресса оказались активность и интенсивность биосинтеза Рубиско. Так, установлена прямая зависимость между уровнем активности фермента, содержанием хлорофилла и белка, а также относительным содержанием воды, осмотическим и водным потенциалом листьев кукурузы, подвергшихся воздействию водного стресса (Castrillo, Fernandez, 1990). Изучение влияния кратковременного водного стресса на интенсивность фотосинтеза, содержание хлорофилла, раствор-

римого белка, Рубиско и рибулозобифосфата (РБФ), а также активность Рубиско в листьях подсолнечника выявило снижение интенсивности фотосинтеза на фоне незначительных изменений остальных параметров, за исключением субстрата — РБФ (Limenez et al., 1992).

Сравнение устойчивости фотосинтетических ферментов растений C-3 и C-4 путей фотосинтеза выявило, что ферменты цикла Кальвина, в т.ч. Рубиско, в большей мере зависимы от влияния водного дефицита. Устойчивость фотосинтетических ферментов C-4 растений способствует их лучшей адаптации к водному стрессу (Юзбеков и др., 1989).

Метаболизм органических кислот по типу толстянковых (CAM) обеспечивает ассимиляцию CO₂ и способствует повышению адаптационного потенциала растений в условиях экстремально засушливого климата. Эффективность использования воды CAM-растениями превышает аналогичный показатель C-3 растений в 5–10 раз (Kramer, Boyer, 1995). Формирование CAM-фотосинтеза может носить конститутивный, стресс-индуцируемый или онтогенетически регулируемый характер. Способность растений существовать в условиях водного дефицита не в последнюю очередь обусловлена изменением проницаемости клеточных мембран, которая обеспечивается группой интегральных белков — аквапоринов. Они функционируют как водные каналы и обеспечивают пассивный перенос молекул воды через мембранны (Verkman, Mitra, 2000).

Водный стресс вызывает торможение и прекращение биосинтеза белков в проростках ячменя. Одновременно активизируется синтез Рубиско и *de*

novo — 60 кД БТШ (Dasgupta, Bewley, 1984).

Выявлено, что активность Рубиско, особенно в начале засухи, снижается прежде всего в результате блокирования его активных центров специфическими ингибиторами (Raghu et al., 2002). Доля заблокированных, связанных ингибиторами каталитических центров фермента достаточно высока как в эксперименте, так и в контроле. Предполагается, что блокирование активных центров Рубиско специфическими ингибиторами может определять степень изменения карбоксилазной активности в условиях засухи, а также защищать от гидролиза протеазами. Активность Рубиско *in vivo* регулируется, преимущественно АТФ-зависимым ферментом Рубиско/активазой, чувствительной к содержанию АТФ и величине соотношения АТФ/АДФ (Portis, 2003). Манипуляции с генами, кодирующими Рубиско/активазу, позволяют в дальнейшем регулировать величину карбоксилазной активности фермента (Raghu et al., 2003). Рубиско/активаза представляет собой AAA⁺ (АТФ-азы ассоциированные с различными активностями) белок (Neuwald et al., 1999), способствующий АТФ-зависимому переносу фосфатов сахара из активного центра Рубиско, освобождая таким образом активный центр для последующего спонтанного карбомилирования CO₂ и связывания металла, которые необходимы для проявления активности. В экспериментах с листьями пшеницы и хлопчатника было установлено, что активаза образует высокомолекулярные комплексы и формирует нерастворимые агрегаты при температуре, ингибирующей активность Рубиско, но не влияющей на фотосинтетический

перенос электронов (Feller et al., 1998). Активаза связана с мембранными тилакоидами, что обусловлено конформационными изменениями в молекуле фермента, имеющими место при ТШ (Rokka et al., 2001). Установлено, что Рубиско/активаза — наиболее подверженный действию ТШ белок хлоропластов табака и гороха, что, в свою очередь, сказывается на уменьшении карбоксилазной активности (Salvucci et al., 2001). В условиях стремительного ТШ активаза быстро теряет стабильность структуры, разрушая систему шаперонинов. При постепенном росте температуры наблюдается акклиматизация фотосинтеза. Механизм этого процесса пока не ясен. Предполагается, что благодаря шаперонинам происходит стабилизация активазы, в результате чего она не образует непродуктивных ассоциаций с другими молекулами, в т.ч. Рубиско (Salvucci et al., 2001).

Оsmотический стресс, как и водный, снижает интенсивность фотосинтеза на фоне уменьшения количества молекул РБФ и карбоксилазной активности Рубиско, а также значительного уменьшения содержания самого фермента (Miteva et al., 1992).

Существенное значение для регуляции биосинтеза и активности Рубиско имеют такие факторы, как освещенность, концентрация микро- и макроэлементов, озона, кислорода, углекислого газа, поллютантов и пр. Показано, что фотосинтез С-3 растений достаточно чувствителен к засухе, однако его различные этапы характеризуются разной устойчивостью и проявляют существенную генотипическую и фенотипическую специфичность (Стасик, 2007).

Хлоропластный БТШ 60 представляет собой

шаперонин, ответственный за связывание субъединиц Рубиско. Изучение процесса сборки молекулы Рубиско в изолированных хлоропластах показало, что ей предшествовало объединение новосинтезированных больших субъединиц с другим белком. Изолированный из гороха белок, связывающий субъединицы Рубиско, представлял собой комплекс с мол. массой 720 кД, включающий два типа полипептидов с мол. массой 61 и 60 кД. Секвенирование ДНК пшеницы, *Ricinus communis* и *Brassica napus* выявило, что 61 кД полипептид на 46 % идентичен GroEL *E. coli* и на 43 % — БТШ 60 из *S. cerevisiae*. В тоже время аминокислотная последовательность 60 кД полипептида *Brassica napus* была на 46 % идентична GroEL *E. coli* и 49 % — полипептиду 61 кД растений. В пользу наличия шаперонинной функции у полипептида с мол. массой 60 кД свидетельствует то обстоятельство, что GroEL и GroES из *E. coli* облегчают сборку молекул Рубиско цианобактерий и *Rhodospirillum rubrum* (Vierling, 1991).

Среди многих реакций, задействованных в фиксации CO₂, наиболее чувствительны к ТШ активация Рубиско ферментом Рубиско/активазой (Crafts-Brandner, Sulvucci, 2000).

Накопление аминокислот, в частности глицина, серина, глутамата и пролина, дает возможность исследовать пути интеграции, регуляции и изменения метаболических процессов в подвергшихся стрессу фотосинтезирующих тканях. Аминокислоты в фотосинтезирующих клетках синтезируются в хлоропластах и митохондриях при участии углеродного и азотного метаболических циклов. Среди защитных функций

аминокислот, особенно пролина, выделяют преимущественно связанные с предохранением мембран и белков от возрастающей концентрации ионов при засухе. Модель, базирующаяся на изменении фотосинтетического метаболизма в условиях низкого водного потенциала, включает синтез пролина и глутамата, исполняющих роль протекторов (Lawlor, 2002).

Особая роль в предохранении фотосинтетической активности отводится белкам. Так, накопление дегидринов защищает метаболизм при низком водном потенциале. Аквапорины — белки, интегрированные в клеточную мембрану, способствуют диффузии воды и других небольших молекул в клетку (Божко и др., 2004). Их задача — регулирование таких метаболических процессов, как обратимое фосфорилирование, зависящее, в свою очередь, от величины водного потенциала апопласта (Maurel, Chrispee, 2001). Стressовые белки с шаперонной активностью играют важную роль в сопровождении и сборке белков во время синтеза, а также в процессах удаления и расположения нефункционирующих и поврежденных белков. Для обеспечения активности шаперонов необходимы молекулы АТФ, в свою очередь, низкий уровень АТФ стимулирует образование БТШ. Поэтому интенсивный синтез молекул АТФ при стрессах вполне понятен (Wiengarden et al., 1996), т.к. фактически является триггером к запуску синтеза и накопления шаперонов.

Таким образом, стрессовые белки в определенной степени задействованы в защите фотосинтеза от влияния неблагоприятных факторов. Прослеживается четкая связь между биосинтезом Рубиско и

БТШ, а также величиной карбоксилазной активности фермента и образованием отдельных, в т.ч. стрессовых белков.

Роль стрессовых белков в предотвращении отрицательных воздействий на фотосинтез требует дальнейшего анализа, однако, уже сейчас можно утверждать, что одной из функций стрессовых белков является участие в формировании защитных механизмов, обеспечивающих фотосинтетическую активность в стрессовых условиях.

ГЛАВА 7

Влияние фитогормонов — АБК, ИУК и цитокининов на биосинтез стрессовых белков

Гормоны растений играют важную роль в регуляции ключевых метаболических процессов. Они действуют в очень низких концентрациях на уровне 10^{-6} – 10^{-12} М, не участвуя непосредственно в тех биохимических реакциях, которые ими вызываются. Для каждого класса фитогормонов существует специфическая реакция, проявляющаяся на различном иерархическом уровне — от органа до клетки. Следовательно, гормональные сигналы определенным образом воспринимаются и трансформируются на уровне клеточного метаболизма.

Механизмы восприятия и передачи внутриклеточных гормональных сигналов активно изучают с 60-х гг. XX столетия — сначала у животных, а затем и у растений. У животных, в частности, обнаружены высокоспециализированные белки, названные рецепторами и служащие для узнавания гормонов и последующей передачи гормонального сигнала на первичные внутриклеточные мишени, реагирующие на такой сигнал запуском характерной ответной реакции. Главной мишенью гормонального сигнала внутри клетки, передающегося благодаря белку-рецептору, является, как правило, определенный набор генов, реагирующий на сигнал активацией либо подавлением транскрипции.

Участки ДНК, ответственные за чувствительность гена к определенному гормону, консервативны и находятся в промоторной (нетранскрибуируемой) области гена, т.е. гормональная регуляция транскрипции осуществляется на уровне инициации синтеза РНК. В отличие от гормонов животных, действие фитогормонов запускает целые программы, такие как переход от одного этапа онтогенеза к другому. В то же время количество генов первичного ответа на действие фитогормонов составляет лишь доли процента от общего числа экспрессируемых генов. Гены первичного ответа, как правило, кодируют синтез регуляторных белков, которые, в свою очередь, экспрессируют другие гены, запуская так называемый “каскадный” механизм гормонально-индуцируемого изменения экспрессии комплекса генов, необходимого для регуляции определенной программы (Романов, 2002).

Рецепторы фитогормонов представляют собой миорные белки, содержащиеся в клетках в достаточно низких концентрациях. Кроме того, это сложноорганизованные белки, которые включают различные функциональные домены и характеризуются высокой нестабильностью (Романов, 1989).

Одним из ключевых фитогормонов, играющим важную роль в формирования адаптационного синдрома, является абсцизовая кислота (АБК). В различных стрессовых условиях растения проявляют тенденцию к резкому увеличению содержания АБК в органах и тканях. Современные методические подходы позволяют детально проанализировать динамику накопления

и локализацию этого фитогормона в стрессовых условиях (Косаковская, 2003).

АБК впервые описали в 60-х гг. прошлого века при изучении различных растений. Название фитогормона ассоциировалось с опаданием (*abscission*) коробочек хлопка, которое наблюдалось при накоплении АБК (Lin, Carns, 1961). АБК синтезируется в хлоропластах зеленых листьев, окончивших рост, а также в плодах, откуда она транспортируется в другие органы растений, в частности апексы, угнетая процессы роста и индуцируя переход к состоянию покоя (Гэлстон и др., 1983). Содержание АБК зависит от физиологического состояния растения и отличается в отдельных органах и тканях: наибольшее количество гормона обнаружено в семенах и молодых плодах (Milborrow, 1974). Детально описана роль АБК в процессах закрывания устьиц (Davies et al., 1983; Mansfield, Davies, 1983). Показано, что она активизирует биосинтез РНК и белков, необходимых для формирования отделительного слоя при опадании листьев (Milborrow, 1978), влияет на синтез белков, регулируя активность генетического аппарата (Lee et al., 1991; Викторова и др., 1995; Максимова, Викторова, 2003), а также на активность ферментов (Seemann, Sharkey, 1987). Идентификация в структуре мембран белка, имеющего высокую степень сродства к АБК, свидетельствует о существовании белкового рецептора АБК на мемbrane (Hocking et al., 1978). Полифункциональный характер действия АБК проявляется в том, что она влияет как на процессы опадания листьев, цветов и плодов растений, так и на прорастание семян, вызревание плодов, рост корней и гравиотропизм.

Увеличение количества эндогенной АБК во время различных стрессов поставило закономерный вопрос о механизме ее действия и роли в адаптационных процессах. Усиленное образование АБК прежде всего влияет на регуляцию движения устьиц при нарушении температурного и водного режимов (Henson et al., 1989; Zeevart, 1988; Nejad, Meeteren, 2007). АБК вызывает отток ионов K^+ из замыкающих клеток устьиц, что сопровождается их смыканием и упреждает обезвоживание листьев (Creelman, 1989; Mansfeild, Devies, 1983). Показано, что в замыкающих клетках устьиц участие Ca^{2+}/H^+ -обменников тонопласта в удалении излишков цитоплазматического Ca^{2+} является главной причиной существования широкого диапазона концентрации АБК (0,01–1,0 мкМ). Осуществлено моделирование генерации кальциевого сигнала в замыкающих клетках устьиц при действии на них АБК (Вересов и др., 2003). АБК влияет на физические характеристики клеточных стенок, увеличивая модуль их сопротивляемости (Rajashekhar, Lafta, 1994). Фитогормон угнетает синтез целлюлозы клеточной стенки, однако практически не действует на процесс образования пектиновых полисахаридов (Wakabayashi et al., 1989).

Особый интерес вызывает исследование влияния АБК на биосинтез белка. Установлено, что фитогормон ингибирует формирование полисом и изменяет их трансляционную активность (Wiedner et al., 1991). Методом дифференциального скрининга ДНК библиотек тканей зародышей кукурузы, обработанных и не обработанных АБК, выделен ДНК-клон, содержащий ген, индуцированный АБК. Установлена зависимость

между уровнем АБК и мРНК этого гена в условиях водного стресса и механического повреждения листа (Gomez et al., 1988). Обработка клеток *Bromus inermis* экзогенной АБК вызывала образование 43 АБК-индуцированных белков, 26 из которых термостойкие, а также экспрессию гена дегидрина (Robertson et al., 1994). Полагают, что вызванное стрессом увеличение содержания лектина в проростках пшеницы находится под контролем АБК (Cattue et al., 1989). Увеличение холдоустойчивости клеток кукурузы определяется, в частности, образованием АБК-связанных белков — конъюгата АБК с полиоксиэтилен-бис-амином (Xin et al., 1994).

Быстрые и значительные колебания уровня эндогенной АБК в растениях при локальном воздействии температуры указывают на существование оперативного механизма изменения содержания этого фитогормона. Быстрое повышение уровня АБК в листьях проростков огурца не только при их непосредственном прогреве, но и при действии высокой температуры на корни, а также наблюдаемые стремительные изменения содержания фитогормона в органах, пространственно удаленных от места стрессовой нагрузки, подтверждают важную роль этого гормона в интеграции защитно-приспособительных реакций в системе целого растения (Таланова и др., 2003). Влияние АБК на адаптивные процессы, имеющие место при воздействии различных физических и химических стрессоров, проявляется как на уровне мембран (Zeevart, 1988) в виде быстрых реакций, так и в более медленных реакциях изменения экспрессии генов и биосинтеза

белков (Leung, Giraudat, 1998). Действие стрессоров на корневую систему индуцирует в надземной части однотипные изменения неспецифического характера, направленные на повышение устойчивости и связанные с увеличением уровня АБК (Титов и др., 2003).

При обезвоживании наряду с накоплением АБК синтезируются различные стрессовые белки (COR-белки), причем фитогормон активизирует транскрипцию АБК-индуцибельных генов (Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, 1994; Максютова, Викторова, 2003). Большинство идентифицированных COR-генов кодируют белки, отличающиеся высокой гидрофильностью, термостабильностью, имеющие относительно простой аминокислотный состав и повторяющиеся аминокислотные последовательности (Tomashow, 1999). Специфичные для закаленного состояния проростков озимой пшеницы дегидрины, за исключением белка 169 кД, являются гомологами RAB-белков, что указывает на прямое участие АБК в запуске биосинтеза этих стрессовых белков и формировании устойчивости. Для более криотолерантных сортов озимой пшеницы характерно высокое содержание АБК-индуцибельных полипептидов, в то время как в проростках яровых сортов обнаружено минимальное количество этих белков (Боровский и др., 2002). Считается, что одной из основных функций RAB-полипептидов и дегидринов является предотвращение локальной дегидратации и денатурации белковых макромолекул (Close, 1996). В промоторных областях генов дегидринов выявлен цисрегуляторный элемент ABRE (от ABA responsive ele-

ment), что указывает на индукцию экспрессии генов этих белков АБК (Rodriguez et al., 2005).

Установлено, что АБК усиливает синтез мРНК дегидрина в проростках пшеницы (Аллагурова и др., 2007).

АБК — это медиатор, который одним из первых воспринимает изменения в окружающей среде и вызывает определенные изменения в метаболизме, способствующие адаптации.

Регулируя процесс закрытия устьиц, АБК в определенной степени смягчает действие стресса, а стимулируя экспрессию отдельных генов и образование новых полипептидов, способствует формированию защитных реакций и повышению устойчивости растений. Изменения в характере образования АБК в растениях в ответ на стресс носят универсальный характер, их следует идентифицировать как неспецифическую реакцию живого организма на стресс. Существенное увеличение содержания фитогормона в экстремальных условиях является одним из компонентов адаптационного синдрома.

Наряду с АБК существенную роль в процессах адаптации играют фитогормоны-стимуляторы, в частности индолил-3-уксусная кислота (ИУК) и цитокинины (Косаківська, 2003).

Известно, что ИУК необходима для осуществления процесса деления растительных клеток. Ауксины непосредственно влияют на митотический цикл, а также на процесс перехода клеток из состояния покоя к активной пролиферации. Только в присутствии ауксина в питательной среде активизируется процесс дыхания,

увеличивается содержание белка и РНК (Гамбург и др., 1990, 1992). Несмотря на то, что функции ауксинов в развитии устойчивости растений к засухе начали исследовать еще в 50-х гг. прошлого века, полученные на сегодня результаты не являются однозначными и исчерпывающими. В частности, установлено, что во время засухи снижается уровень ауксинов (Hartung, Witt, 1969). В условиях водного дефицита некоторые виды растений аккумулируют N-маланил-Д-триптофан, являющийся предшественником ИУК (Рекославская, 1990). Некоторое время считалось, что температурные стрессы вызывают уменьшение количества ауксинов с последующим снижением ростовой активности (Гуревич, 1979). Однако, холодовое и тепловое закаливание существенно увеличивало количество ауксинов, особенно на начальных этапах (Волкова и др., 1991). Накопление ИУК происходит одновременно с синтезом стрессовых полипептидов, что свидетельствует о возможной связи между быстрым ростом активности ауксинов в начале действия закаливающих температур и биосинтезом стрессовых белков (Sachs, Ho, 1986). Регуляторное воздействие ауксинов на метаболизм реализуется посредством гормон-рецепторного взаимодействия с белковым рецептором. Для ауксинсвязывающего белка 1 (ABP1) впервые были получены молекулярные характеристики и доказательства рецепторной функции (Романов, 1989; Napier, 1995). ABP 1 кукурузы состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 22 кД и длиной 163 аминокислотных остатка (Jones, 1994). Близкие по структурным и функциональным характеристикам ауксинсвязывающие белки обна-

ружены у многих растений, включая виды родов *Nicotiana*, *Arabidopsis* и др. (Романов, 2002). В области связывания гормона на молекуле АВР 1 находится металлсвязывающий (марганцевый) сайт. Предполагается, что при формировании комплекса “гормон-рецептор” ион металла образует связь с кислотной группой молекулы ауксина (Warwicker, 2001). Незначительная часть от суммарного количества АВР 1 локализована на плазмалемме и именно она отвечает за восприятие и передачу ауксинового сигнала. Основная масса АВР 1 находится в эндоплазматическом ретикулуме и, скорее всего, является запасом, позволяющим в случае необходимости быстро восполнить дефицит белка на плазматической мембране клетки (Macdonald, 1997). Первичное действие АВР 1 детально изучено на уровне плазмалеммы, где он участвует в быстрой гиперполяризации мембранны под действием ауксина (Venis, Napier, 1995).

Цитокининам принадлежит важная роль в жизни растений: они индуцируют деление клеток, тормозят процесс старения, стимулируют биосинтетическую активность, влияют на каталическую активность ферментов, свойства мембран, синтез РНК и белков (Дерфлин, 1985; Кулаева, Кузнецов, 2002). В настоящее время идентифицированы гены ключевого фермента синтеза цитокининов — изопентенилтрансферазы из *Arabidopsis thaliana* (Takei et al., 2001). Открыт мембранный receptor цитокининов (Inoue et al., 2001), гены первичного ответа на цитокинины (D'agostino et al., 2000) и факторы регуляции их экспрессии (Sakai et al., 2001). Особое внимание привлекает

проблема активности цитокининов в хлоропластах. В частности, установлено, что в хлоропластах присутствует полный спектр этого фитогормона, а также цитокининсвязывающий белок, специфичный для регуляции транскрипционной активности (Benkova et al., 1999; Люкевич и др., 2002). Участие цитокининов в регуляции биосинтеза белков хлоропластов является одним из главных компонентов их активности. Хлоропласти — это полуавтономные органеллы растительной клетки. Между ядром и пластидами происходит постоянный обмен информацией. Так, ядро активно участвует в биосинтезе белков хлоропластов, а пластиды влияют на экспрессию ядерных генов, кодирующих хлоропластные белки (Barkan, Goldschmidt-Clermont, 2001; Rodermel, 2001).

Рецепторы цитокининов представляют собой интегральные трансмембранные белки с мол. массой 120–130 кД (длина 1036–1116 остатков аминокислот). Установлено, что эти белки входят в состав цитоплазматической мембраны клеток различных растений. На N-конце находятся гидрофобные сегменты, служащие для закрепления белка в мембране. Между этими сегментами располагается консервативная полипептидная последовательность (около 280 аминокислот), локализованная на внешней стороне мембраны. Именно этот внешний домен служит для узнавания и специфического связывания цитокининов (Schmülling, 2001; Романов, 2002). У *Arabidopsis* идентифицированы 7 генов первичного ответа на цитокинины. Функции цитокинининддуцируемых белков окончательно не установлены, однако их экспрессия ингибитирует влияние цито-

кининов на транскрипцию. Так реализуется механизм обратной связи, в результате чего подавляется действие цитокининов после вызванной ими активации транскрипции (Dagostino, Kieber, 1999).

Достаточно детально исследовано влияние цитокинина и АБК на накопление полипептидов тилакоидных мембран хлоропластов (TMX) и содержание кодирующих их мРНК. Изучена экспрессия 15 хлоропластных генов, кодирующих полипептиды основных пигмент-белковых комплексов TMX. Установлено, что в каждом пигмент-белковом комплексе TMX содержится как минимум один белок, синтез которого регулируется цитокинином на транскрипционном или посттранскрипционном уровне (Kusnetsov et al., 1994).

Представление о множественности систем рецепции и трансдукции гормональных сигналов все больше подтверждается в последнее время (Кулаева, Кузнецов, 2002; Napier, 2004). В частности, в отношении ауксинов и АБК есть веские основания полагать, что в растительной клетке имеется два разных типа рецепторов, расположенных на плазмалемме и внутри клетки (Романов, 2002). Установлено, что внутриклеточным рецептором цитокининов является цитокининсвязывающий белок с мол. массой 67 кД, который совместно с гормоном участвует в регуляции транскрипции (Каравайко и др., 2004). Этот белок локализован в ядре и характеризуется общими свойствами у одно- и двудольных растений (Kulaeva et al., 2000). В этиолированных проростках кукурузы обнаружен белок с мол. массой 70 кД, родственный белку с мол. массой 67 кД по функциональной активности (Kulaeva et al., 1998).

Локальное действие стресса на определенную часть растения способно индуцировать в другой его части, не подвергшейся такому воздействию, неспецифические реакции. Так, накопление цитокининов в листе проростков пшеницы при повышении температуры воздуха способствовало увеличению устьичной проводимости, а снижение содержания фитогормона в листьях при понижении температуры корневой зоны — ее снижению (Веселова и др., 2006). Снижение уровня транскрипции при стрессе регулируется как АБК, количество которой возрастило, так и цитокининами, содержание которых в проростках пшеницы при осмотическом и холодовом шоке снижалось (Веселов и др., 2002). При постепенно усиливающейся почвенной засухе торможение роста листьев огурца скорее обусловлено не замедлением фотосинтеза, а снижением содержания цитокининов и ИУК (Пустовойтова и др., 2003).

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о несомненном участии фитогормонов в формировании стрессовой реакции и их влиянии на биосинтез стрессовых белков. Абиотические стрессы сопровождаются активным образованием эндогенной АБК, а в ряде случаев и увеличением содержания ИУК и цитокининов. Баланс фитогормонов в условиях стресса является одним из факторов, формирующих адаптационный синдром (Косаковская, 2003). АБК, ИУК и цитокинины вызывают экспрессию индуцибелльных генов и последующий синтез стрессовых белков (рис. 9).

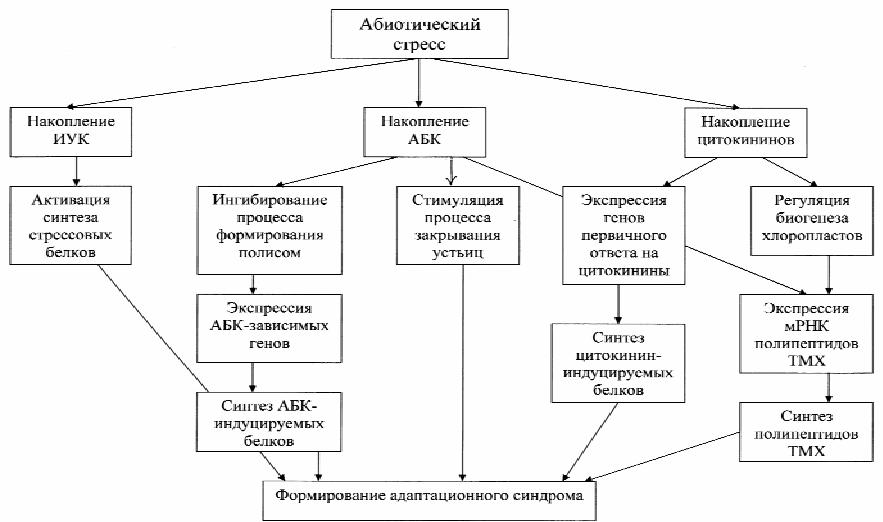


Рис. 9. Участие фитогормонов в формировании адаптационного синдрома

Интенсивно изучаются белки — рецепторы фитогормонов, возможность регуляции устойчивости при помощи фитогормонов, а также создание генетически модифицированных растений, способных синтезировать увеличивающие и обеспечивающие резистентность соединения.

Заключение

Глобальные экологические изменения — повышение температуры, уменьшение доступности водных ресурсов, засоление почв и их загрязнение тяжелыми металлами и радиоактивными соединениями — угрожают потерей значительных плодородных территорий. В связи с этим особую актуальность приобретает проблема создания устойчивых к абиотическим стрессам растений. Адаптация растений к стрессам контролируется сложной молекулярно-генетической системой, которая запускает определенный стрессреагирующий механизм, обеспечивающий гомеостаз и защищающий от разрушений белки и клеточные компоненты. В отличие от устойчивости к биотическим стрессам, которая преимущественно контролируется единичными генами, абиотические стрессы экспрессируют мультигенную систему, поэтому достаточно сложным является контроль и инженерия резистентности к тому или иному отрицательному воздействию. Создание устойчивых к абиотическим стрессам растений базируется на экспрессии генов, участвующих в сигнальных или регуляторных системах, в запуске синтеза стрессовых белков, функциональных и структурных метаболитов.

Первичные стрессы — засуха, засоление, холод, жара химические поллютанты — чаще всего взаимодействуют и вызывают повреждение клеток и такие вторичные стрессы, как осмотический и окислительный. Первичный стрессовый сигнал (например, изменение осмотического либо ионного режима, температуры, про-



Рис. 10. Схема ответа растений на абиотический стресс.

ницаемости мембран и др.) является триггером, запускающим ответный механизм адаптации и защиты. Так, восстанавливаются параметры гомеостаза и обеспечивается защита белков и мембран от повреждений и разрушений. Неадекватные реакции при передаче сигналов и экспрессии генов могут привести к необратимым изменениям клеточного гомеостаза, разрушению белков и мембран, в конечном итоге — к гибели клетки (рис. 10).

Стрессовые белки являются ключевым компонентом, формирующим клеточный гомеостаз в стрессовых условиях. Молекулярные шапероны контролируют сопровождение, сборку, транслокацию и деградацию белков, причем большинство шаперонов и есть стрессовыми белками. Они локализованы в цитозоле и органеллах, в частности ядре, митохондриях, хлоропластах, эндоплазматическом ретикулуме.

Различают пять основных семейств стрессовых белков, наиболее изученными из которых является БТШ 70 и БТШ 60. Стрессовые белки активно взаимодействуют с фитогормонами, защищают фотосинтетическую активность, участвуют в формировании комплексных защитных реакций.

Несмотря на то, что с момента открытия БТШ их интенсивно исследуют в ряде лабораторий различных стран, остается еще много неясного в характере и механизме их действия, в вопросах взаимодействия между собой, регуляции их биосинтеза, в частности, фитогормонами. Особое внимание уделяется возможности использования стрессовых белков в качестве биомаркеров при изучении растений различных экологических стратегий, при проведении биотехнологических работ, получении устойчивых высокоурожайных сортов.

ЛИТЕРАТУРА

- Александров В.Я.* Клетки, макромолекулы и температура. — Л.: Наука, 1975. — 329 с.
- Алиев К.А., Васильева В.Н., Насыров Ю.С.* Локализация и свойства свободной и мембраносвязанной рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы (оксигеназы) из хлоропластов проростков гороха // ДАН СССР. — 1982. — **265**, № 3. — С. 762–764.
- Алиев К.А., Бабаджанова М.А., Бабаджанова М.П., Давлятназарова З.Б.* Активность мембраносвязанной рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы в процессе формирования системы внутренних мембран хлоропластов // Физиол. раст. — 2001. — **48**, № 2. — С. 185–190.
- Аллагулова Ч.Р., Гималов Ф.Р., Шакирова Ф.М., Вахитов В.А.* Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции // Биохимия. — 2003. — **68**. — С. 1157–1165.
- Аллагулова Ч.Р., Гималов Ф.Р., Авальбаев А.М.* Структура дегидрин-подобного гена *TADHN* мягкой пшеницы и участие АБК и 24-эпифрассинолида в активации его экспрессии // Физиол. раст. — 2007. — **54**, № 1. — С. 131–136.
- Бабаджанова М.П., Бабаджанова М.А., Алиев К.А.* Свободный и мембраносвязанный мультиферментные комплексы цикла Кальвина листьев хлопчатника // Там же. — 2002. — **49**, № 5. — С. 663–669.
- Беляева Е.В., Филимонов А.А., Доман Н.Г.* Увеличение активности рибулозодифосфаткарбоксилазы после закаливания проростков // ДАН СССР. — 1985. — **282**, № 2. — С. 504–507.

-
- Блехман Г.И.* Синтез белка в условиях стресса // Успехи совр. биол. — 1988. — **103**, вып. 3. — С. 340—353.
- Блехман Г.И., Шеламова Н.А.* Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // Там же. — 1992. — **112**, вып. 2. — С. 281—297.
- Божко К.Н., Жесткова И.М., Трофимова М.С. и др.* Изменение содержания аквапоринов в клеточных мембранах *Mesembryanthemum crystallinum* при переходе с C-3 типа фотосинтеза на CAM // Физиол. раст. — 2004. — **51**, № 6. — С. 887—895.
- Борисова Т.А., Бугаджес С.М., Ракитина В.Ю. и др.* Тепловой шок повышает устойчивость к УФ-β облучению. Выделение этилена и CO₂ // Там же. — 2001. — **48**, № 5. — С. 733—738.
- Боровский Г.В., Войников В.К.* Локализация низкомолекулярных белков теплового шока на поверхности и внутри митохондрий кукурузы // Там же. — 1993. — **40**, № 4. — С. 596—598.
- Боровский Г.Б., Ступникова И.В., Антипина А.И., Войников В.К.* Наеопление дегидринов и RAB-белков в проростках пшеницы при низкотемпературной адаптации // Там же. — 2002. — **49**, № 2. — С. 257—263.
- Боровский Г.Б., Ступникова И.В., Антипина А.И. и др.* Ассоциация дегидринов с митохондриями пшеницы при низкотемпературной адаптации // Там же. — 2005. — **52**, № 2. — С. 221—226.
- Босток К., Самнер Э.* Хромосомы эукариотической клетки. — М.: Мир, 1981. — 598 с.
- Васильев И.М.* Действие ионизирующих излучений на растения. Радиофизические исследования. — М.: Изд-во АН СССР, 1962. — 224 с.

-
- Вербенко В.Н., Калинин В.Л.* Роль радиоустойчивости бактериофагов как результат экспрессии стрессовых систем клетки-хозяина // Генетика. — 1995. — 31, № 2. — С. 1630–1636.
- Вересов В.Г., Кабак А.Г., Волотовский И.Д.* Моделирование генерации кальцевого сигнала при действии абсцизовой кислоты на замыкающиеся клетки устьиц // Физиол. раст. — 2003. — 50, № 5. — С. 645–652.
- Веселов Д.С., Сабиржанова И., Ахиярова Г.Л. и др.* Роль гормонов в быстром ростовом ответе растений пшеницы на осмотический и холодовой шок // Там же. — 2002. — 49, № 4. — С. 572–576.
- Веселова С.В., Фархутдинов Р.Г., Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р.* Роль цитокининов в регуляции устьичной проводимости проростков пшеницы при быстром локальном изменении температуры // Там же. — 2006. — 53, № 6. — С. 857–862.
- Виль Ю., Иванова Х., Пярник Е., Пярсим Э.* Определение концентрации активных центров рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (Рубиско) *in vivo* // Там же. — 2001. — 48, № 1. — С. 137–142.
- Виль Ю.* Регуляция рибулозобисфосфаткарбоксилазы: влияние параметров частных реакций на скорость карбоксилирования/оксигенирования // Там же. — 2002. — 49, № 36. — С. 814–820.
- Викторова Л.В., Максютова Н.Н., Кузьмина Г.Г., Ионов Э.Ф.* Влияние абсцизовой кислоты на синтез белков в зерновках пшеницы // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1995. — 27, № 1—2. — С. 26–30.
- Войников В.К., Иванова Г.Г., Гудиковский А.В.* Белки теплового шока растений // Физиол. раст. — 1984. — 31, № 2. — С. 970–979.

-
- Войников В.К., Иванова Г.Г., Корытов М.В.* Синтез белков в растениях при действии низких температур // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1986. — **18**, № 3. — С. 211–222.
- Войников В.К., Иванова Г.Г.* Физиологический стресс и регуляция активности генома клеток эукариотов // Усп. совр. биол. — 1988. — **105**, вып. 1. — С. 3–16.
- Войников В.К., Боровский Г.Б.* Роль стрессовых белков в клетках при гипертермии // Там же. — 1994. — **114**, вып. 1. — С. 85–95.
- Войников В.К., Грабельных О.И., Колесниченко А.В., Побежимова Т.П.* Белок холодового шока 310 кД разобщает окислительное фосфорилирование в растительных митохондриях // Физиол. раст. — 2001. — **48**, № 1. — С. 106–112.
- Войников В.К., Колесниченко А.В., Побежимова Т.П., Грабельных О.И.* Функционирование стрессового белка БХШ 310 связано с шунтированием транспорта электронов по дыхательной цепи митохондрий озимой пшеницы // Там же. — 2006. — **53**, № 3. — С. 371–379.
- Волкова Р.И., Титов А.Ф., Таланова В.В., Дроздов С.Н.* Изменение в системе ауксинов в начальный период теплового и холодового закаливания вегетирующих растений // Там же. — 1991. — **34**, № 3. — С. 538–544.
- Газиев А.И.* Повреждение ДНК в клетках под действием ионизирующей радиации // Радиац. биол. радиоэкол. — 1999. — **39**, № 6. — С. 630–638.
- Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г.* Ауксины в культурах тканей и клеток растений. — Новосибирск.: Наука, 1990. — 240 с.
- Гамбург К.З., Еникеева А.Г., Швецов С.Г.* Влияние ауксина на поглощенин мечеными аминокислот и их включение в белок при переходе из состояния покоя к активной

-
- пролиферации // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1992. — **24**, № 1. — С. 47–53.
- Георгиев Г.П., Бакаев В.В.* Три уровня структурной организации хромосом эукариот // Мол. биол. — 1978. — **12**, № 6. — С. 1205–1230.
- Гэлстон А., Дэвис П., Сэттер Р.* Жизнь зеленого растения. — М.: Мир, 1983. — 549 с.
- Гофштейн Л.В.* Гистоны растительного происхождения в связи с эволюцией от прокариотов к эукариотам // Биохимия. — 1978. — **43**, № 6. — С. 947–958.
- Грабельных О.И., Колесниченко А.В., Побежимова Т.П. и др.* Влияние Ca^{2+} и разобщающего белка БХШ 310 на функционирование митохондрий озимой пшеницы *in vitro* // Вісн. Харк. Нац. аграрн. ун-ту. — 2003. — № 3(2). — С. 53–61.
- Гродзинский Д.М.* Надежность растительных систем. — Киев: Наук. думка, 1983. — 366 с.
- Гродзинский Д.М., Коломиец К.Д., Кутлахмедов Ю.А. и др.* Антропогенная радионуклидная аномалия и растения. — Киев: Лыбидь, 1991. — 160 с.
- Гродзинський Д.М.* Радіобіологія. — К.: Либідь, 2000. — 448 с.
- Гудков Д.И.* Клеточные механизмы пострадиационного восстановления растений. — Киев: Наук. думка, 1985. — 224 с.
- Гудкова Н.В., Косаковская И.В., Кравець В.С., Майор П.С.* Влияние ионизирующего излучения на синтез белков этиолированных проростков озимой пшеницы // Физиол. и биохим. культ. раст. — 2001. — **33**, № 2. — С. 121–126.
- Гудкова Н.В., Косаковская И.В., Майор П.С.* Синтез стрессовых белков в проростках пшеницы под действием гамма-радиации // Доп. НАН України. — 2001а. — № 2. — С. 176–179.

-
- Гудкова Н.В., Мартин Г.Г.* Анатомія листків проростків озимої пшениці в умовах радіаційного та температурного стресів // Укр. ботан. журн. — 2001. — **58**, № 6. — С. 731–736.
- Гудкова Н.В., Заславский В.А.* Действие теплового шока и ионизирующего излучения на ультраструктуру клеток проростков озимой пшеницы // Тез. II Междунар. конф. по анат. и морфол. раст. — С.-Пб, 2002. — С. 272.
- Гуревич Л.С.* Роль гормонального баланса ауксинов и этилена в адаптационных реакциях высших растений // Ботан. журн. — 1979. — **64**, № 11. — С. 1602–1608.
- Дерфлинг К.* Гормоны растений. Системный подход. — М.: Мир, 1985. — 303 с.
- Дорогунцов С.И. Поповкин В.А., Степаненко А.В.* Концептуальные подходы к развитию и размещению производительных сил на территории с повышенными уровнями радиоактивного загрязнения // Социально-экономич. пробл. ликвидации последствий Чернобыльской катастрофы. — Киев: СОПС Украины АН Украины, 1992. — С. 4–21.
- Дроздова И.С., Пустовойтова Т.Н., Джикаладзе Т.Г.* Эндогенная регуляция фотосинтетической активности листьев огурца в условиях прогрессирующей почвенной засухи: влияние конечных продуктов фотосинтеза // Физиол. раст. — 2004. — **51**, № 5. — С. 742–750.
- Евстегнеева З.Г., Соловьева Н.А., Сидельникова Л.И.* Структура и функции шаперонов и шаперонинов // Прикл. биохим. и микробиол. — 2001. — **37**, № 1. — С. 5–18.
- Жук О.І., Григорюк І.П., Варавкін В.О.* Вплив препарату “Гарт” на ріст проростків озимої пшениці після температурного стресу // Физиол. и биохим. культ. раст. — 2002. — **34**, № 1. — С. 58–62.

-
- Зыкова В.В., Грабельных О.И., Турчанинова В.В. и др. Влияние белка холодового шока 310 на перекисное окисление липидов и дыхательную активность митохондрий озимой пшеницы // Физиол. раст. — 2002. — **49**, № 5. — С. 703–710.
- Каравайко Н.Н., Селиванкина С.Ю., Кудрякова Н.В. Участвует ли цитокинин-связывающий белок (67 кД) из листьев ячменя и *Arabidopsis thaliana* в ответе листьев на производные фенилмочевины // Там же. — 2004. — **51**, № 6. — С. 878–886.
- Кислюк И.М., Буболо Л.С., Палеева Т.В., Шерстнева О.А. Термоиндуцированное увеличение устойчивости фотосинтетического аппарата пшеницы к совместному действию высокой температуры и видимого света. Фиксация CO₂, фотосинтетические пигменты и ультраструктура хлоропластов // Там же. — **51**, № 4. — С. 507–515.
- Климов С.В., Астахова Н.В., Трунова Т.Н. Структурно-функциональная адаптация фотосинтетического аппарата озимой пшеницы к низким температурам // Журн. общ. биол. — 1993. — **54**, № 1. — С. 33–44.
- Клячко Н.Л., Бочарова М.А. Активность бесклеточной трансляции полисом в связи с влиянием низких температур // Физиол. раст. — 1980. — **36**, № 1. — С. 112–117.
- 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. — **31**, № 2. — С. 145–149.
- Колесниченко А.В., Побежимова Т.П., Войников В.К. Характеристика белков низкотемпературного стресса растений // Физиол. раст. — 2000. — **47**, № 4. — С. 624–630.

-
- Колесниченко А.В., Побежимова Т.П., Грабельных О.И., Войников В.К.* Механизм разобщающего действия стрессового белка БХШ 310 отличается от механизма действия известных разобщающих растительных белков // Физиол. раст. — 2003. — 50, № 2. — С. 251–259.
- Колесниченко А.В., Таусон Е.Л., Зыкова В.В. и др.* Природа лиганда, связанного с разобщающим белком БХШ 310 // Там же. — 2005. — 52, № 2. — С. 216–220.
- Колесниченко А.В., Грабельных О.И., Побежимова Т.П. и др.* Функционирование митохондрий озимой пшеницы *in vitro* в присутствии ионов Ca^{2+} и стрессового разобщающего белка БХШ 310 // Там же. — 2006. — 53, № 3. — С. 380–386.
- Коломиець О.Д.* Биосинтез белков и радиационные эффекты в клетке. — Киев: Наук. думка, 1982. — 182 с.
- Коротаєва Н.Е., Антипіна А.І., Грабельных О.І. и др.* Митохондриальні низкотемпературні белки теплового шока і устойчивость митохондрий злаков к гипертермии // Физиол. раст. — 2001. — 48, № 6. — С. 917–922.
- Косаківська І.В., Гудкова Н.В.* Вплив іонізуючого опромінення на життєдіяльність рослин // Укр. ботан. журн. — 2002. — 59, № 3. — С. 246–250.
- Косаківська І.В., Гудкова Н.В.* Нові уявлення про структуру та функції стресових білків // Там же. — 2002а. — 59, № 1. — С. 72–74.
- Косаківська І.В.* Фізіологічно-біохімічні основи адаптації рослин до стресів. — К.: Сталь, 2003. — 191 с.
- Косаківська І.В., Головянко І.В.* Вплив температурних стресів на вміст та електрофоретичний спектр білків різних органів *Phaseolus vulgaris* L. і *Zea mays* L. на ранніх етапах вегетативного розвитку // Вісн. Харк. нац. агр. ун-та. — 2007. — 2, № 11. — С. 58–63.

-
- Колупаєв Ю.С.* Стресові реакції рослин. Молекулярно-клітинний рівень. — Харків: Харків. держ. ун-т ім. В.В. Докучаєва, 2001. — 172 с.
- Котеров А.Н., Никольський А.В.* Адаптация к облучению *in vivo* // Радиац. биол. радиоэкол. — 1999. — 39, № 6. — С. 648–662.
- Кравець А.П.* Факторы физиологического контроля накопления радионуклидов культурными растениями // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1999. — 31, № 4. — С. 261–265.
- Кузнецов В.В., Кимпел Дж., Гокджиян Дж., Ки Дж.* Элементы неспецифической реакции генома растений при холодовом и тепловом стрессе // Физиол. раст. — 1987. — 34, № 5. — С. 859–868.
- Кузнецов В.В., Трофимова М.С., Андреев И.М.* Кальций как регулятор синтеза белков теплового шока в клетках растений // Докл. РАН. — 1997. — 354, № 3. — С. 416–418.
- Кулаєва О.Н., Микулович Т.П., Хохлова В.А.* Стressовые белки растений // Совр. пробл. биохим. — М.: Наука, 1991. — С. 174–190.
- Кулаєва О.Н.* БТШ и устойчивость растений к стрессам // Соросовский образоват. журн. — 1997. — № 2. — С. 5–13.
- Кулаєва О.Н., Кузнецов В.В.* Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов // Физиол. раст. — 2002. — 49, № 4. — С. 626–640.
- Люкевич Т.В., Кузнецов В.В., Каравайко Н.Н. и др.* Изучение функциональных свойств зеатин-связывающего белка, участвующего в гормонзависимой регуляции транскрипции хлоропластного генома // Там же. — № 1. — С. 105–112.
- Майор П.С., Половинкін І.Г., Кравець В.С.* Вплив низьких температур та затоплення на синтез білків етіользованих проростків

-
- ків озимої пшениці // Физiol. и биохим. культ. раст. — 1999. — **31**, № 2. — С. 123–128.
- Максимова Н.Н., Викторова Л.В.* Сравнительное исследование действия абсцизовой кислоты и cAMP на синтез белков зерновок пшеницы в условиях засухи // Биохимия. — 2003. — **68**, № 4. — С. 523–528.
- Максютова Н.Н., Викторова Л.В.* Сравнительное исследование действия абсцизовой кислоты и cAMP на синтез белков зерновой пшеницы в условиях засухи // Там же. — 1977. — **42**, № 4. — С. 523–528
- Маргулис Б.А., Бухова И.В.* Белки стресса в эукариотической клетке // Цитология. — 2000. — **42**, № 4. — С. 323–342.
- Медведев С.С.* Кальциевая сигнальная система растений // Физiol. раст. — 2005. — **52**, № 2. — С. 282–305.
- Нариманов А.А., Корыстов Ю.Н.* Стимулирующее действие малых доз ионизирующего излучения на развитие растений // Радиац. биол. радиоэкол. — 1997. — **37**, № 3. — С. 312–319.
- Палеева Т.В., Буболо Л.С., Кислюк И.М.* Влияние температуры на фотосинтез, дыхание и ультраструктуру клеток листьев земляники *Fragaria vesca* // Цитология. — 1993. — **35**, № 1. — С. 60–69.
- Панасенко О.О., Ким М.В., Гусев Н.Б.* Структура и свойства малых белков теплового шока // Успехи биол. химии. — 2003. — **43**, № 1. — С. 59–98.
- Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Войников В.К. и др.* Стрессовый белок 310 кДа при гипотермии влияет на энергетическую активность растительных митохондрий // Докл. РАН. — 1996. — **351**, № 5. — С. 715–718.
- Побежимова Т.П., Войников В.К.* Импорт белков в митохондрии // Физiol. раст. — 2000. — **47**, № 1. — С. 142–151.

-
- Побежимова Т.П., Грабельных О.И., Колесниченко А.В. и др.*
Локализация белков, иммунохимически родственных субъединицам стрессового белка 310 кД, в митохондриях озимой пшеницы // Физиол. раст. — 2001. — **48**, № 2. — С. 238–244.
- Половинкін І.Г., Майор П.С., Кравець В.С.* Синтез мітохондріальних білків кукурудзи за умов впливу низьких температур // Фізіол. і біохім. культ. раст. — 1999. — **31**, № 4. — С. 249–252.
- Порфирова С.А., Клюєва П.Ю., Хохлова В.А., Кулєєва О.Н.* Влияние ингибиторов синтеза РНК и белка на ответ клеток листьев *Arabidopsis thaliana* (L.) на тепловой шок. 2. Локализация и синтез белков теплового шока // Физиол. раст. — 1992. — **39**, № 3. — С. 524–632.
- Пустовойтова Т.Н., Дроздова И.С., Жданова Н.Е., Жолкевич В.Н.* Рост листьев, интенсивность фотосинтеза и содержание фитогормонов у *Cucumis sativus* при прогрессирующей почвенной засухе // Там же. — 2003. — **50**, № 4. — С. 496–498.
- Рекославская Н.И.* N-маланил-Д-триптофан, условия образования и возможная физиологиченская роль: Автореф. дис. д-ра биол. наук. — М., 1990. — 53с.
- Романов Г.А.* Гормон-связывающие белки растений и проблема рецепции фитогормонов // Физиол. раст. — 1989. — **36**, № 2. — С. 166–177.
- Романов Г.А.* Рецепторы фитогормонов // Там же. — 2002. — **49**, № 4. — С. 615–625.
- Селье Г.* Очерки об адаптационном синдроме. — М.: Медгиз, 1960. — 254 с.
- Селье Г.* На уровне целого организма. — М.: Наука, 1972. — 122 с.
- Селье Г.* Стресс без дистресса. — М.: Прогресс, 1982. — 125 с.

-
- Сорочинский Б.В., Прохневский А.И., Ручко М.В.* Некоторые молекулярные механизмы соматических эффектов облучения, отмеченные у растений из 10 км зоны Чернобыльской АЭС // Цитол. и генет. — 1996. — **30**, № 4. — С. 15–19.
- Стасик О.О.* Реакція фотосинтетичного апарату С-3 рослин на водний дефіцит // Физiol. и биохим. культ. раст. — 2007. — **39**, № 1. — С. 14–27.
- Ступникова И.В., Боровский Г.Б., Антипина А.И., Войников В.К.* Полиморфизм термостабильных белков в проростках мягкой пшеницы в период низкотемпературной адаптации // Физiol. раст. — 2001. — **48**, № 6. — С. 923–929.
- Ступникова И.В., Боровский Г.Б., Войников В.К.* Сезонные изменения состава и содержания дегидринов в растениях озимой пшеницы // Там же. — 2004. — **51**, № 5. — С. 707–713.
- Таланова В.В., Акимова Т.В., Титов А.Ф.* Динамика содержания АБК в листьях и корнях проростков огурца и их теплоустойчивости под влиянием общего и локального прогрева // Там же. — 2003. — **50**, № 1. — С. 100–104.
- Титов А.Ф., Таланова В.В., Акимова Т.В.* Динамика холодо- и теплоустойчивости растений при действии различных стресс-факторов на их корневую систему // Там же. — 2003. — **50**, № 1. — С. 94–99.
- Тихомирова М.М., Ватти К.В., Мамон Л.А.* Механизмы, обеспечивающие устойчивость генетического материала клетки к стрессовым воздействиям // Генетика. — 1994. — **30**, № 8. — С. 1097–1104.
- Трофимова М.С., Андреев И.М., Кузнецов В.В.* Кальций как внутриклеточный регулятор синтеза БТШ 96 и термотолерантности клеток растений при гипертермии // Физiol. раст. — 1997. — **44**, № 4. — С. 511–516.

-
- Шаркова В.Е.* Влияние теплового шока на способность клеток растений пшеницы к восстановлению фотосинтетического транспорта электронов после действия света или повторного теплового шока // Физиол. раст. — 2001. — **48**, № 6. — С. 911–916.
- Юзбеков А.К., Шматъко И.Г., Шведова О.Е., Латашенко О.П.* Активность ключевых ферментов фотосинтеза и особенности азотного метаболизма у C-3 и C-4 растений в условиях водного стресса // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1989. — **20**, № 6. — С. 523–527.
- Adler K., ArKona C., Manteuffel R., Suss K.-H.* Electron-microscopical localization of chloroplast proteins by immunogold labeling of cryo-embedded spinach leaves // Cell. Biol. Int. — 1993. — **17**. — P. 213–220.
- Alamilo J., Almoguera C., Bartels D., Jordani J.* Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* // Plant Mol. Biol. — 1995. — **29**. — P. 1093–1099.
- Almoguera C., Jordano J.* Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular weight heat shock protein and Lea mRNAs // Ibid. — 1992. — **19**. — P. 781–792.
- Almoguera C., Coca M.A., Jordano J.* Tissue-specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress // Plant J. — 1993. — **4**. — P. 947–958.
- Altschuller M., Mascarenhas J.P.* The synthesis of heat-shock and normal proteins at high temperatures in plants and their possible roles in survival under heat stress // Heat Shock from Bacteria to Man. — 1982. — P. 321–327.
- Amin J., Ananthan J., Voellmy R.* Key features of heat shock regulatory elements // Mol. Cell Biol. — 1988. — **8**. — P. 3761–3769.

-
- Amir-Shapira D., Leustek T., Dalie B. et al.* Hsp 70 proteins, similar to *Escherichia coli* Dna K, in chloroplasts and mitochondria of *Euglena gracilis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1990. — **87**. — P. 1749–1752.
- Antikainen M., Griffith M., Zhang J. et al.* Immunolocalization of anti-freeze proteins in winter rye leaves , crowns, and roots by tissue printing // Plant Physiol. — 1996. — **110**, N 3. — P. 845–857.
- Arrigo A.-P., Landry J.* Expression and function of the low molecular weight heat shock proteins and molecular chaperones. — N.-Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. — P. 335–373.
- Arts M.T., Rai H.* Effects of enhanced ultraviolet-β radiation on the production of lipid, polysaccharide and protein in three freshwater algal species // Freshwater Biol. — 1997. — **38**, N 3. — P. 597–610.
- Ashburner M., Bonner J.J.* The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock // Cell. — 1979. — **17**. — P. 241–251.
- Badger M.R., Andrews T.J.* Effect of CO₂, O₂ and temperature on a high affinity form of ribulose diphosphate carboxylase from spinach // Biochem. Biophys. Res. Commununs. — 1974. — **60**, N 1. — P. 204–260.
- Bahr J.T., Jenses R.G.* Ribulose bisphosphate oxygenase activity from freshly ruptured spinach chloroplasts // Arch. Biochem. Biophys. — 1974. — **164**, N 3. — P. 408–413.
- Baker T.S., Eisenberg D.A., Eisenberg F.A., Weissman L.* The structure of form I crystals of D-ribulose-1,5-diphosphate carboxylase // J. Mol. Biol. — 1975. — **91**, N 4. — P. 391—399.
- Baker J. S., Such Se Won., Eisenberg D.A.* Structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: form III crystals // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — **74**, N 3. — P. 1037–1041.

-
- Baler R., Zou J., Voellmy R.* Evidence for a role of Hsp 70 in the regulation of the heat shock response in mammalian cells // Cell Stress and Chaperones. — 1996. — **1**, N 1. — P. 33–39.
- Banzet N., Richaud C., Deveaux Y. et al.* Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial Hsp 22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells // Plant J. — 1998. — **13**, N 4. — P. 519–527.
- Bardwell J., Craig I.* Major heat shock gene of *Drosophila* and *Escherichia coli* heat-induced dnK gene are homologous // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1984. — **81**. — P. 848—852.
- Barkan A., Goldschmidt-Clermont M.* Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression // Biochemie. — 2000. — **82**. — P. 559–572.
- Barros M.D., Charnecka E., Gurley W.B.* Mutational analysis of plant heat shock element // Plant Mol. Biol. — 1992. — **19**. — P. 665–675.
- Basha E., Lee G.J., Breci L.A. et al.* The identity of proteins associated with small heat shock protein during heat stress *in vivo* indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions // J. Biol. Chem. — 2004. — **279**, N 9. — P. 7566–7575.
- Basha E., Lee G.J., Demeler B., Vierling E.* Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat // Eur. J. Biochem. — 2004a. — **271**. — P. 1426–1436.
- Beckman R.P., Mizzen L.A., Welch W.* Interaction of HSP 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly // Science. — 1990. — **248**. — P. 850–854.
- Benkova E., Witters E., van Dongen W. et al.* Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts. Occurrence and changes due to light/dark treatment // Plant Physiol. — 1999. — **121**, N 2. — P. 245–251.

-
- Berkel J., Salamini F., Gebhardt C.* Transcripts accumulating during cold storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers are sequence related to stress-responsive genes // Plant Physiol. — 1994. — **104**, N 2. — P. 445–452.
- Berkowitz G.A.* Water and salt stress // Photosynthesis. A comprehensive treatise / Ed. Raghavendra A.S. — Cambridge: Cambridge Univ. Press., 1998. — P. 226–237.
- Bonner J.* Properties and composition of isolated chromatin // Chromatin structure and functions. Molecular and cellular biophysical methods. — N.-Y.: Plenum Press., 1979. — P. 3–13.
- Boorstein W.R., Zeigelhoffer T., Craig E.L.* Molecular evolution of the HSP 70 gene family // J. Mol. Evol. — 1994. — **38**. — P. 1–17.
- Bose S., Weikl T., Begl H., Buchner J.* Chaperone function of Hsp 90-associated proteins // Science. — 1996. — **276**. — P. 1715–1717.
- Boston R.S., Vittanen P.V., Vierling E.* Molecular chaperones and protein folding in plants // Plant Mol. Biol. — 1996. — **32**, N 1—2. — P. 191–222.
- Borovskii G.V., Stupnikova I.V., Antipina A.A. et al.* Accumulation of dehidrin-like-proteins in the mitochondria of cold-treated plants // J. Plant Physiol. — 2000. — **156**, N 6. — P. 797–800.
- Bouchard R.A.* Characterization of expressed meiotic prophase repeat transcript clones of *Lilium*-meiosis-specific expression, relatedness, and affinities to small heat-shock protein genes // Genome. — 1990. — **33**. — P. 68–79.
- Bowman L.H., Chollet R.* Presence of two subunit types in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from *Thiobacillus intermedius* // J. Bacteriol. — 1980. — **141**, N 2. — P. 652–657.

-
- Bravo L.A., Gallardo J., Navarette A. et al.* Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley // Physiol. Plant. — 2003. — **118**. — P. 262–269.
- Brodsky J., Bauerle M., Horst M., McClellan A.* Mitochondrial Hsp 70 cannot replace BiP in driving protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum // FEBS Letters. — 1998. — **435**, N 2—3. — P. 183–186.
- Brosch M., Strid O.* Cloning, expression, and molecular characterization of a small Rea gene family regulated by low level of ultraviolet β radiation and other stress // Physiol. Plant. — 1999. — **121**, N 2. — P. 479–488.
- Brown C., Martin R., Hansen W. et al.* The constitutive and stress inducible forms of hsp 70 exhibit functional similarities and interact with one another in ATP-dependent fashion // J. Cell Biol. — 1993. — **120**. — P. 1101–1112.
- Cai L.* Research on the adaptive response induced by low-dose radiation: where have we been and where should we go? // BELLE Newsletter. — 1999. — 7, N 3. — P. 2–7.
- Cammue B.P.A., Broekaert W.F., Kellens J.T.C. et al.* Stress-induced accumulation of wheat germ agglutinin and abscisic acid in roots of wheat seedlings // Plant Physiol. — 1989. — **91**, N 4. — P. 1432–1435.
- Castrillo M., Fernandez D.* Ribulose bisphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities, chlorophyll and protein contents of two maize hybrids under water stress // Maydica. — 1990. — **35**, N 1. — P. 67–72.
- Castrillo M., Trujillo J.* Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and chlorophyll and protein contents *in vivo* cultivars *French bean* plants under water stress and rewetting // Photosynthetica. — 1994. — **30**, N 1. — P. 175–181.

-
- Charnecka E., Gurley W.B., Nagao R.T., Mosquera L.A., Key J.L.* DNA sequence and transcript mapping of a soybean gene encoding a small heat shock protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1985. — **82**. — P. 3726–3730.
- Charnecka-Verner E., Yuan C., Nover L. et al.* Plant heat shock transcription factors: positive and negative aspects of regulation // Acta Physiol. Plant. — 1998. — **19**. — P. 529–537.
- Chen Q., Lauzon L.M., DeRocher A.E., Vierling E.* Accumulation, stability and localization of a major chloroplast heat-shock protein // J. Cell Biol. — 1990. — **111**. — P. 1873–1883.
- Cheng M.Y., Hartl F.-U., Martin J. et al.* Mitochondrial heat-shock protein HSP 60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria // Nature. — 1989. — **337**. — P. 620–625.
- Cloney L.P., Bekkaoui D.R., Feist G.L. et al.* *Brassica napus* plastid and mitochondrial chaperonin-60 proteins contain multiple distinct polypeptides // Plant Physiol. — 1994. — **105**, N 2. — P. 233–241.
- Close T.J., Fenton R.D., Moonan F.* A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide // Plant Mol. Biol. — 1993. — **23**. — P. 279–286.
- Close T.J.* Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydratation proteins // Physiol. Plant. — 1996. — **97**. — P. 795–803.
- Coca M.A., Almoguera C., Jordano J.* Expression of sunflower low molecular weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localisation and possible function implication // Plant Mol. Biol. — 1994. — **25**. — P. 479–492.
- Cooper P., Ho T.-H. D.* Intracellular localization of heat shock proteins in maize // Plant Physiol. — 1987. — **84**, N 4. — P. 1197–1203.

-
- Cornic G.* Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis // Photoinhibition of photosynthesis from molecular mechanisms to the field / Eds. Baker N.R., Bower J.R. — Oxford: Biol. Sci., 1994. — P. 297–313.
- Crafts-Brandner S.J., Salvucci M.E.* Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂ // Proc. Nat. Acad. Sci. — 2000. — **97**. — P. 13430–13435.
- Creelman R.A.* Abscisic acid physiology and biosynthesis in higher plants // Physiol. Plant. — 1989. — **75**, N 1. — P. 131–136.
- Csordas A.* On the biological role of histone acetylation // Biochem. J. — 1990. — **265**, N 1. — P. 23–28.
- Curley W., Key J.* Transcription regulation of the heat shock response: a plant perspective // Biochemistry. — 1991. — **30**, N 1. — P. 1–12.
- Dagostino I.B., Kieber J.J.* Phosphorelay signal transduction: the emerging family of plant response regulator // Trends Biochem. Sci. — 1999. — **24**. — P. 452–456.
- Dagostino I.B., Deruere Y., Kieber J.J.* Characterization of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin // Plant Physiol. — 2000. — **124**, N 7. — P. 1706–1717.
- Dasgupta J., Bewley J.D.* Variations in protein synthesis in different regions of greening leaves of barley seedlings and effects of imposed water stress // J. Exp. Bot. — 1984. — **35**, N 159. — P. 1450–1459.
- Davies W.J., Mansfield T.A., Welburn A.R.* The role of abscisic acid in drought avoidance // Abscisic acid. — New York: Praeger, 1983. — P. 237–268.
- Derocher A., Vierling E.* Cytoplasmic Hsp 70 homolog of pea — differential expression in vegetative and embryonic organs // Plant Mol. Biol. — 1995. — **3**, N 27. — P. 441–456.

-
- Dietrich P.S., Bouchard R.A., Casey S.E., Sinibaldi R.M.* Isolation and characterization of a small heat shock protein gene from maize // *Plant Physiol.* — 1991. — **96**. — P. 1268–1276.
- Duina A., Kalton H., Gaber R.* Requirement for Hsp 90 and CyP-40-type cyclophilin in negative regulation of the heat shock response // *J. Biol. Chem.* — 1998. — **3**, N 27. — P. 441–456.
- Eckey-Kaltenbach H., Kiefer E., Grosskopf E. et al.* Differential transcript induction of parsley pathogenesis-related proteins and of a small heat shock protein by ozone and heat shock // *Plant Mol. Biol.* — 1997. — **33**. — P. 343–350.
- Ellis R.J.* The most abundant protein in the world // *Trends of Biochemical Sciences.* — 1979. — **4**. — P. 241–244.
- Ellis R.J.* Proteins as molecular chaperones // *Nature.* — 1987. — **328**, N 6128. — P. 379–381.
- Ellis R.J., Van der Vies S.M., Hemmingsen S.M.* The molecular chaperon concept// *Biochem. Soc. Symp.* — 1989. — **55**. — P. 145–153.
- Ellis R.J., Van der Vies S.M.* Molecular chaperones // *Ann. Rev. Biochem.* — 1991. — **60**. — P. 321–347.
- Escobar G.M.L., Marttila S., Hakansson G. et al.* Heat stress response in pea involves interaction of mitochondrial nucleoside diphosphate kinase with a novel 86-kilodalton protein // *Plant Physiol.* — 2001. — **126**, N 1. — P. 69–77.
- Feige U., Polla B.* Hsp — a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical application // *Experientia.* — 1994. — **50**. — P. 979–986.
- Feige U., Morimoto R.I., Yahara I., Polla B.* Stress-inducible cellular responses. — Basel: Birkhauser, 1996. — 512 p.
- Feller U., Crafts-Brandner S.J., Salvucci M.E.* Moderately high temperature inhibit ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygen-

-
- nase (Rubisco) activase — mediated activation of Rubisco // Plant Physiol. — 1998. — **116**, N 3. — P. 539–546.
- Flaherty K.M., DeLuca-Flaherty C., McKay D.B.* Three-dimensional structure of ATP-as fragment of 70 kD heat-shock cognate protein // Nature. — 1990. — **346**. — P. 623–628.
- Forreiter C., Nover L.* Heat induced stress proteins and the concept of molecular chaperones // J. Biosci. — 1998. — **23**. — P. 287–302.
- Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J.* Photooxidative stress in plants // Physiol. Plant. — 1994. — **92**. — P. 696–717.
- Galvis M.L.E., Marttila S., Hykansson G. et al.* Heat stress response in pea involves interaction of mitochondrial nucleoside diphosphate kinase with a novel 86 kilodalton protein // Plant Physiol. — 2001. — **126**, N 1. — P. 69–77.
- Glover J.R., Lindquist S.* Hsp 104, Hsp 70 and Hsp 40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins // Cell. — 1998. — **94**. — P. 73–82.
- Gomez J., Sanchez-Martinez D., Stiefel V. et al.* A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein // Nature. — 1988. — **334**, N 6179. — P. 262–264.
- Gray J.C., Kekwick R.G.O.* An immunological investigation of the structure and function of RuDP carboxylase // Eur. J. Biochem. — 1974. — **44**, N 3. — P. 481–489.
- Gray J.C.* Fraction I protein and plant phylogeny // Proc. Int. Symp., Chemosyst. Princ. and Pract. / Proc. Int. Symp., Southampton London e.a. — 1979. — P. 67–193.
- Gurley W.B., Key J.L.* Transcriptional regulation of the heat-shock response: a plant perspective // Biochemistry. — 1991. — **30**, N 1. — P. 1–12.
- Gusev N.B., Bogatcheva N.V., Martson S.B.* Structure and properties of small heat shock proteins (sHSP) and their interaction with

-
- cytoskeleton proteins // Biochemistry. — 2002. — **67**, N 5. — P. 511–519.
- Guy C., Haskell D., Li Q.B.* Association of proteins with the stress 70 molecular chaperones at low temperature: evidence for the existence of cold labile proteins in spinach // Cryobiology. — 1998. — **36**, N 4. — P. 301–314.
- Guy C., Li Q.B.* The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family // Plant Cell. — 1998. — **10**. — P. 539–556.
- Gyorgyey J., Gartner A., Nemeth K.* Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis // Plant Mol. Biol. — 1991. — **16**. — P. 999–1007.
- Haas I.* Bip (GRP 78), an essential hsp 70 resident protein in the endoplasmic reticulum // Experientia. — 1999. — **4**. — P. 1012–1020.
- Hachiya N., Mihara K., Suda K. et al.* Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import // Nature. — 1995. — **376**. — P. 705–709.
- Hakn M., Walbot V.* Effect of cold-treatment on protein synthesis and mRNA levels in rice leaves // Plant Physiol. — 1989. — **91**, N 3. — P. 930–938.
- Hallberg R.L.* A mitochondrial chaperonin: genetic, biochemical and molecular characteristics // Sem. Cell Biol. — 1990. — **1**. — P. 37–45.
- Halliwell B., Aruoma O.I.* DNA and free radicals. — London: Harwood, 1993. — 284 p.
- Hartung V.W., Witt G.* Uber den einflud der boden feuchtingkeit und den wuch-stoffgenhget von *Anaststica hiero-chunta* und *Helianthus annuus* // Flora. — 1969. — **157**, N 4. — P. 603–614.

-
- Hashimoto M., Kisselova L., Sawa Sh. et al.* A novel ricePR 10 protein, RSO, PR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signalling pathway // Plant Cell Physiol. — 2004. — **45**, N 5. — P. 550–559.
- Haucke V., Schatz G.* Import of proteins into mitochondria and chloroplasts // Trends in Cell Biol. — 1997. — **7**, N 3. — P. 103–106.
- Hemmingsen S.M., Woolford C., van der Veis S.M. et al.* Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly // Nature. — 1988. — **333**. — P. 330–334.
- Henson I.E., Jensen C.R., Turner N.C.* Leaf gas exchange and water relations of lupins and wheat. II. Abscisic acid and drought-induced stomatal closure // Aust. J. Plant Physiol. — 1989. — **16**, N 5. — P. 429–442.
- Hocking T.J., Clapham J., Cattell K.J.* Abscisic acid binding to subcellular fractions from leaves of *Vicia faba* // Plants. — 1978. — **138**, N 2. — P. 303–308.
- Holaday A.S., Martindale W., Alred R. et al.* Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature // Plant Physiol. — 1992. — **98**, N 3. — P. 1105–1114.
- Horecker B.L., Hurtwitz L., Weissbach A.* The enzymatic synthesis and properties of ribulose 1,5-diphosphate // J. Biol. Chem. — 1956. — **218**. — P. 785–794.
- Howarth C.J.* Molecular responses of plants to an increased incidence of heat shock // Plant Cell Environ. — 1991. — **14**. — P. 831–841.
- Hoyos M.E., Zlang Sh.* Calcium-indepent activation of salicylicacid-induced protein kinase and 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress // Plant Physiol. — 2000. — **122**, N 6. — P. 1355–1364.

-
- Hubel A., Schöffl F.* *Arabidopsis* heat shock factor characterization of the gene and the recombinant protein // Plant Mol. Biol. — 1994. — **26**. — P. 353–362.
- Hubel A., Lee J.H., Wu C., Schöffl F.* *Arabidopsis* heat shock factor is constitutively active in *Drosophila* and human cells // Mol. Gen. Genet. — 1995. — **248**. — P. 136–141.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y. et al.* Identification of CRE I as a cytokinin receptor from *Arabidopsis* // Nature. — 2001. — **409**. — P. 1060–1063.
- Jakoby W.B., Brummond D.O., Ochoa S.* Formation of 3-phosphoglyceric acid by carbon dioxide fixation with spinach leaf enzymes // J. Biol. Chem. — 1956. — **218**. — P. 811–822.
- Joiner M.C., Lambin P., Marples B.* Adaptive response and induced resistance // Comptes Redus Acad. Sci. Ser. III-Sci. Vie-Life Sci. — 1999. — **322**, N 2–3. — P. 167–175.
- Jones A.M.* Auxin-binding proteins // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1994. — **45**. — P. 394–420.
- Key J.L., Kimpel J.A., Chu-Y L. et al.* The heat shock response in soybean // Cell. and Mol. Biol. of Plant Stress, Alan R. Liss. Inc. — 1985. — P. 161–179.
- Khokhlova V., Porfirova S.* The influence of different ecological stresses on plant cell ultrastructure // Physiol. Plant. — 1990. — **79**, N 2. — P. 46–51.
- Kim K.K., Kim R., Kim S.H.* Crystal structure of a small heat-shock protein // Nature. — 1998. — **394**. — P. 595–599.
- Kimpel J.A., Key J.L.* Heat shock in plants // Trends in Biochem. Sci. — 1985. — **10**, N 9. — P. 353–357.
- Kimpel J.A., Key J.L.* Presence of heat shock mRNAs in field grown soybean // Plant Physiol. — 1985a. — **79**, N 3. — P. 672–678.
- Kirshner M., Winkekhau S., Theifelder J., Nover L.* Transient expression and heat-stress-induced co-aggregation of endogenous

-
- and heterologous small heat-stress proteins in tobacco protoplasts // Plant J. — 2000. — **24**, N 3. — P. 397–411.
- Kloppstech K., Meyer G., Schuster G., Ohad I.* Synthesis, transport and localisation of a nuclear coded 22-kd heatshock protein in the chloroplast membranes of pease and *Chlamydomonas reinhardtii* // EMBO J. — 1985. — **4**, N 8. — P. 1901–1909.
- Kramer P.J., Boyer J.S.* Water relations of plants and soils. — New-York; London: Academic, 1995. — 495 p.
- Krishna P., Felsheim R.F., Larkin J.S., Das A.* Structure and light-induced expression of a small heat-shock protein gene of *Pharbitis nil* // Plant Physiol. — 1992. — **100**. — P. 1772–1779.
- Kruse E., Liu Z., Kloppstech K.* Expression of heat shock proteins during development of barley // Plant Mol. Biol. — 1993. — **23**, N 1. — P. 111–122.
- Kulaeva O.N., Zagranichnaya T.K., Brovko F.A. et al.* A new family of cytokinin receptors from *Cereals* // FEBS Lett. — 1998. — **423**. — P. 239–242.
- Kulaeva O.N., Karavaiko N.M., Selivankina S.Yu. et al.* Nuclear and chloroplast cytokinin-binding proteins from barley leaves participating in transcription regulation // Plant Growth Regul. — 2000. — **32**. — P. 329–335.
- Kung S.D., Marsho T.V.* Regulation of RDP carboxylase/oxygenase activity and its relationship to plant photorespiration // Nature. — 1976. — **259**, N 5541. — P. 325–326.
- Kung S.D.* Expression of chloroplast genomes in higher plants // Ann. Rev. Plant Physiol. — 1977. — **28**. — P. 401–437.
- Kusnetsov V.V., Oelmüller R., Sarwat M.I. et al.* Cytokinins, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus luteus* cotyledons without notable effect on steady-state mRNA levels // Planta. — 1994. — **194**. — P. 318–327.

-
- Ladomery M.* Multifunctional proteins suggest connection between transcriptional and posttranscriptional processes // Bioessays. — 1997. — **19**. — P. 903–909.
- Larcher W.* Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups / 3rd End. — Berlin: Springer-Verlag, 1995. — 117 p.
- Lavoie J.N., Hickey E., Weber L.A., Landry J.* Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27 // J. Biol. Chem. — 1993. — **268**, N 32. — P. 24210–24214.
- Lavoie J.N., Lambert H., Hickey E. et al.* Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27 // Mol. Cell Biol. — 1995. — **15**, N 1. — P. 501–511.
- Lawlor D.W.* Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata metabolism and the role of ATP // Ann. Botany. — 2002. — **89**. — P. 871–885.
- Lawrence S.D., Cline K., Moore G.A.* Chromoplast development in ripening tomato fruit: identification of cDNA encoding a plastid-localized low-molecular-weight heat shock protein // Plant Mol. Biol. — 1997. — **33**. — P. 483–492.
- Lee S.P., Chen T.H.Y., Fuchigami L.H.* Changes in the translatable RNA population during abscisic acid induced freezing tolerance in bromegrass suspension culture // Plant and Cell Physiol. — 1991. — **32**, N 1. — P. 45–56.
- Lee G.J., Pokala N., Vierling E.* Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea // J. Biol. Chem. — 1995. — **270**, N 18. — P. 10432–10438.

-
- Lee G.J., Roseman A.M., Saibil H.R., Vierling E.* A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in folding-competent state // EMBO J. — 1997. — **16**, N 3. — P. 659–671.
- Lee G.J., Vierling E.* A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein // Plant Physiol. — 2000. — **122**, N 1. — P. 189–198.
- Lee-Yoon D., Easton D., Murawski M. et al.* Identification of the major subfamily of large hsp 70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein // J. Biol. Chem. — 1995. — **270**. — P. 725–733.
- Lenhnerr B., Machker F., Nosberger J.* Influence of temperature on the ratio of ribulose bisphosphate carboxylase to oxyganase activities and on the ratio of photosynthesis to photorespiration of leaves // J. Exp. Bot. — 1985. — **36**, N 168. — P. 1117–1125.
- Leung J., Giraudat J.* Abscisic acid signal transduction // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1998. — **49**. — P. 199–222.
- Li., Bing, Hong-Tao Liu., Da-Ye Sun., Ren-Gard Zhou.* Ca²⁺ and calmodulin modulate DNA-binding activity of maize heat shock transcription factor *in vitro* // Plant Cell Biol. — 2004. — **45**, N 5. — P. 627–634.
- Limenez C., Mitchel V.J., Lawlor D.W.* Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress // Plant Physiol. — 1992. — **98**, N 2. — P. 516–524.
- Lin W.C., Carns H.R.* Isolation of abscisin and abscission acceleratating substance // Science. — 1961. — **134**. — P. 384v385.
- Linder R.A., Kapur A., Carver J.A.* The interaction of molecular chaperon, a-crystallin with mottled globule states of bovine α -lactalbumin // J. Biol. Chem. — 1997. — **272**. — P. 27722–27729.

-
- Lindquist S.* The heat shock response // Ann. Rev. Biochem. — 1986. — **45**. — P. 39–72.
- Lindquist S., Craig E.A.* The heat shock proteins // Ann. Rev. Genet. — 1988. — **22**. — P. 631–677.
- Lorimer G.H.* A personal account of chaperonin history // Plant Physiol. — 2001. — **125**, N 1. — P. 38–41.
- Low D., Brandle K., Nover L., Forreiter C.* Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones *in vivo* // Planta. — 2000. — **211**. — P. 575–582.
- Lund D., Rhoads A., Lund P., Cerny T.E.* In vivo modifications of the maize mitochondrial small heat stress protein HSP 22 // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**, N 32. — P. 24–29.
- Lyttleton J.W., Ts'o P.O.P* The localization of Fraction I protein of green leaves in the chloroplasts // Arch. Biochem. Biophys. — 1958. — **73**. — P. 120–126.
- Macdonald H.* Auxin perception and signal transduction // Physiol. Plant. — 1997. — **100**. — P. 423–430.
- Mackerness S.A.H., Surplus S.Z., Jordan B.R., Thomas B.* Effect of supplementary ultraviolet β-radiation on photosynthetic transcripts at different stages of leaf development and light level in pea (*Pisum sativum* L.): role of active oxygene species and antioxodante enzymes // Photochem. Photobiol. — 1998. — **68**, N 1. — P. 88–96.
- Makino A., Nakano H., Mac T.* Effects of growth temperature on the responses of rebulose-1,5-bisphosphate carboxylase, electron transport components, and sucrose synthesis enzymes to luf nitrogen in rice, and their relationships to photosynthesis // Plant Physiol. — 1994. — **105**, N 4. — P. 1231–1238.
252. *Mansfield T.A., Davies W.J.* Abscisic acid and water stress // Biochem. Soc. Trans. — 1983. — **11**, N 5. — P. 557–560.

-
- Marshall J.S., DeRocher A.E., Keegstra K., Vierling E.* Identification of heat shock protein hsp 70 homologs in chloroplasts // Proc. Nat. Acad. Sci. — 1990. — **87**. — P. 374–378.
- Mauk G.S., Witt W., Yelenosky G . et al.* The physiology of cold hardiness in citrus genotypes. Response of protein metabolism to cold hardening temperatures and exogenously-applied growth regulators // Acta Physiol. Plant. — 1989. — **11**, N 1. — P. 51–63.
- Maurel C., Chrispee M.J.* Aquaporins. A molecular entry into plant water relation // Plant Physiol. — 2001. — **125**, N 1. — P. 135–138.
- McGhee J.D., Felsenfeld G.* Nucleosome structure // Ann. Rev. Biochem. — 1980. — **49**. — P. 1115–1156.
- McKay D.* Structure of the 70-kilodalton heat shock-related proteins // Springer Semin. Immunopathol. — 1991. — **13**. — P. 1–9.
- McMullin T, Hellberg R.L.* Highly consereved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *E. coli* gro EL gene // Mol. Cell Biol. — 1988. — **8**. — P. 371–380.
- Meirnyk J.A.* The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones // Trends in Plant Sci. — 1997. — **5**, N 2. — P. 1360–1385.
- Meirnyk J.A.* Protein folding in plant cell // Plant Physiol. — 1999. — **191**, N 2. — P. 695–703.
- Meza-Basso L., AlberdiN., Raynal M. et al.* Changes in protein synthesis in rapeseed (*Brassica napus*) seedlings during a low temperature treatment // Ibid. — 1986. — **82**, N 3. — P. 733–738.
- Milborrow B.V.* Chemistry and physiology of abscisic acid // Ann. Rev. — 1974. — **25**. — P. 250–307.
- Milborrow B.V.* The stability of conjugated abscisic acid during witting // J. Exp. Bot. — 1978. — **29**, N 158. — P. 1059–1066.

-
- Milioni D., Hatzopoulos P.* Genome organization of HSP90 gene family in *Arabidopsis* // Plant Mol. Biol. — 1997. — **6**, N 35. — P. 955–961.
- Miteva T.S., Zhelev N.Zh., Popova L.P.* Effect of salinity on the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in barley leaves // J. Plant Physiol. — 1992. — **140**, N 1. — P. 46–51.
- Mogelsvang S., Simpson D.J.* Protein folding and transport from endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in plants // J. Plant Physiol. — 1998. — **153**, N 1. — P. 1–15.
- Montfort V., Slingsby C., Vierling E.* Structure and function of the small heat shock protein/α-crystallin family of molecular chaperones // Protein folding in the Cell / Horwich, A.L., ed. — New-York: Academic Press, 1999. — P. 105–156.
- Morimoto P.I., Kline M.P., Bimston D.N., Cotto J.J.* The heat shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones // Essay Biochem. — 1997. — **32**. — P. 17–29.
- Nagao R.T., Kimpel J.A., Vierling E., Key J.L.* The heat shock response: a comparative analysis // Oxford Surveys of Plant Mol. and Cell Biol. — 1986. — **3**. — P. 348–384.
- Nagl W.* Chromatin organization and the control of gene activity // Intern. Rev. of Cytology. — 1985. — **94**. — P. 21–56.
- Napier R.M.* Towards an understanding of ABP I // J. Exp. Bot. — 1995. — **46**. — P. 1787–1795.
- Napier R.M.* Plant hormone binding sites // Ann. Bot. — London, 2004. — **93**. — P. 227–233.
- Nejad A.R., Meeteren U.* The role of abscisic acid in disturbed stomatal response characteristics of *Tradescantia virginiana* during growth at high relative air humidity // J. Exp. Bot. — 2007. — **58**, N 3. — P. 627–636.

-
- Neumann D., Nieden U.Z., Manteuffel R.* et al. Intracellular localisation of heat-shock proteins in tomato cell culture // Eur. J. Cell Biol. — 1987. — **43**, N 1. — P. 71–81.
- Neumann D., Nover L., Parthier B.* et al. Heat shock and other stress response systems of plants // Biologischer Lentralbatt. — 1989. — **108**. — P. 1–115.
- Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V.* AAA+: a class of chaperone-like ATPase associated with assembly, operation and disassembly of protein complexes // Genome Res. — 1999. — **9**. — P. 27–43.
- Nover L., Scharf K.D., Neumann D.* Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves // Mol. Cell Biol. — 1983. — **3**. — P. 1648–1655.
- Nover L., Hellmund D., Neumann D.* et al. The heat-shock response of eucaryotic cells // Biol. Zentralblatt. — 1984. — **103**, N 4. — P. 357–365.
- Nover L., Scharf K.D.* Synthesis, modification and structural binding of heat-shock proteins in tomato cell cultures // Evol. Biochem. — 1984. — **139**. — P. 304–313.
- Nover L., Scharf K.D., Neumann D.* Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs // Mol. Cell Biol. — 1989. — **9**. — P. 1298–1308.
- Nover L., Scharf K.D., Garliardi D.* et al. The Hsf world: classification and plant heat stress transcription factors // Cell Stress Chap. — 1996. — **1**. — P. 215–223.
- Nylander M., Svensson J., Pavla T.E., Welin B.V.* Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana* // Plant Mol. Biol. — 2001. — **45**. — P. 263–279.

-
- Oh H.J., Chem X, Subject J.R.* Hsp 110 protects heat-denatured and confers cellular thermoresistance // *J. Biol. Chem.* — 1997. — **272**. — P. 636–640.
- Pareek A., Singla S.L., Kush A.K., Glover A.* Distribution patterns of HSP-90 protein in rice // *Plant Science.* — 1997. — **2**. — P. 221–230.
- Parry M.A., Andraloje P.J., Sharnaz K. et al.* Rubisco activity: effects of drought stress // *Ann. Botany.* — 2002. — **89**. — P. 833–839.
- Parry M.A., Andraloje P.J., Mitchell R.A.C. et al.* Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation // *J. Exp. Bot.* — 2003. — **54**, N 386. — P. 1321–1333.
- Parsell D.A., Lindquist S.* The function of heat-shock proteins chaperones in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins // *Annu. Rev. Genet.* — 1993. — **27**. — P. 437–496.
- Pearce R.S.* Molecular analysis of acclimation to cold // *Plant Growth Regul.* — 1999. — **29**, N 1. — P. 47–76.
- Pelham H.R.B.* A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* Hsp 70 heat-shock gene // *Cell.* — 1982. — **30**, N 1. — P. 49–57.
- Perhman H.P.B.* Speculations on the function of major heat shock and glucose-regulated proteins // *Ibid.* — 1986. — **46**. — P. 517–528.
- Perdue D., Mitcham E., Neven L.* Transient expression of the HCS 70 protein in cherry fruit subjected to heat shock // *J. Agr. Food Chem.* — 1998. — **46**, N 10. — P. 4447–4450.
- Pla M., Huguet G., Verdaguer D. et al.* Stress proteins co-expressed in suberized and lignified cells and in apical meristems // *Plant Sci.* — 1998. — **139**, N 1. — P. 49–57.
- Portis A.R.Jr.* Rubisco activase — Rubisco catalytic chaperone // *Photosynt. Res.* — 2003. — **75**, N 1. — P. 11–27.

-
- Prasad T.K., Hellberg R.L.* Identification and metabolic characterization of the *Zea mays* mitochondrial homolog of the *E. coli* gro EL protein // Plant Mol. Biol. — 1989. — **12**. — P. 609–618.
- Prasad T.K., Hack E., Hellberg R.L.* Function of the mitochondrial chaperonin hsp 60: specific association between hsp 60 and newly synthesized F I-ATP-ase alfa subunits // Mol. Cell Biol. — 1990. — **10**. — P. 3679–3686.
- Prodromou C., Roe S.M., O'Brien R. et al.* Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in Hsp 90 molecular chaperone // Cell. — 1997. — **90**. — P. 65–75.
- Queitsch C., Hong S.-W., Vierling E., Lindquist S.* Heat shock protein 10 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis* // Plant Cell. — 2000. — **12**. — P. 479–492.
- Rajashekhar C.B., Lafta A.* Cell wall changes in leaves of evergreens and cultured cells in response to cold acclimation and exogenous ABA // Plant Physiol. — 1994. — **105**, N 1. — P. 169–174.
- Rapoport T.A., Jungnickel B., Kutay U.* Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes // Ann. Rev. Biochem. — 1996. — **65**. — P. 271–303.
- Rassow J., von Ashen O., Bomer U., Pfanner N.* Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family // Trends in Cell Biol. — 1997. — **7**, N 3. — P. 129–133.
- Reddy R.K., Chadhary S., Patil P. et al.* The 90 kDa heat shock protein (HSP 90) is expressed throughout *Brassica napus* seed development and germination // Plant Science. — 1998. — **131**, N 1. — P. 131–137.
- Reddy R.K., Kurek I., Silverstein A.M. et al.* High molecular weight FK 506-binding proteins are components of heat shock protein 90

-
- heterocomplexes in wheat germ lysate // Plant Physiol. — 1998a. — **118**, N 4. — P. 1395–1401.
- Ritossa F.* A new puffing pattern induced by heat shock and DNA in *Drosophilae* // Experientia. — 1962. — **18**, N 4. — P. 568–571.
- Robertson A.J., Ishikawa M., Gusta L.V., MacKenzie B.L.* Abscisic-acid-induced heat tolerance in *Bromus inermis* leyss cell-suspension cultures: heat-stable, abscisic acid-responsive polypeptides in combination with sucrose confer enhanced thermostability // Plant Physiol. — 1994. — **105**, N 1. — P. 181–190.
- Rodermel S.* Pathways of plastid-to-nucleus signalling // Trends Plant Sci. — 2001. — **6**. — P. 471–478.
- Rodriguez E.M., Svensson J.T., Malatrasi N. et al.* Barley Dhn13 encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression // Theor. Appl. Genet. — 2005. — **110**. — P. 852–858.
- Rokka A., Zlang L., Aro E-M.* Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function? // Plant J. — 2001. — **25**. — P. 463–471.
- Roy H.* Rubisco assembly: a model system for studing the mechanisms of chaperonin action // Plant Cell. — 1998. — **117**. — P. 651–658.
- Sabehat A., Weiss D., Lurie S.* Heat shock proteins and cross-tolerance in plants // Physiol. Plant. — 1998. — **103**, N 3. — P. 437–441.
- Sabehat A., Lurie S., Weiss D.* Expression of small heat shock proteins at low temperature // Plant Physiol. — 1998a. — **117**, N 5. — P. 1651–1658.
- Sachs M.M., Ho T.-H.D.* Alteration of gene expression during environmental stress in plants // Ann. Rev. Plant Physiol. — 1986. — **37**. — P. 363–392.

-
- Sairam R.R., Srivastava G.S., Saxena D.C.* Increased antioxidant activity under elevated temperatures: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes // Biol. Plant. — 2000. — **43**. — P. 245–251.
- Sakai H., Honma T., Aoyama T. et al.* ARR I, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins // Science. — 2001. — **294**, N 5546. — P. 1519–1521.
- Salvucci M.E., Osteryoung K.W., Crafts-Brandner S.J., Vierling E.* Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation *in vitro* and *in vivo* // Plant Physiol. — 2001. — **127**, N 4. — P. 1053–1064.
- Salvucci M.E., Crafts-Brandner S.J.* Mechanisms for deactivation of Rubisco under moderate heat stress // Physiol. Plant. — 2004. — **122**, N 2. — P. 513–519.
- Satyanarayana C., Horst M.* The ATP-driven protein translocation-motor of mitochondria // Gene Therapy and Mol. Biol. — 1998. — **1**. — P. 741–748.
- Scandalios J.C.* Molecular genetics of superoxide dismutase in plants // Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. — New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1997. — P. 527–568.
- Scharf K.D., Heider H., Hohfeld I. et al.* The tomato Hsf system : HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules // Mol. Cell Biol. — 1998. — **18**, N 4. — P. 2240–2251.
- Scharf K.D., Siddique M., Vierling E.* The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins (sHsps) and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acd proteins) // Cell Stress Chaperones. — 2001. — **6**. — P. 225–237.
- Schatz G.* The protein import system of mitochondria // J.Biol. Chem. — 1996. — **271**. — P. 31763–31766.

-
- Schirmer E.C., Lindquist S.L., Vierling E.* An *Arabidopsis* heat shock complements in thermotolerance defect in yeast // Plant Cell. — 1994. — **6**. — P. 1899–1909.
- Schirmer E.C., Ware D.M., Queitsch C. et. al.* Subunit interactions influence the biochemical properties of Hsp 104 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — **98**, N 3. — P. 914–919.
- Schlesinger M.J., Ashburner M., Tissieres A.* Heat shock: from bacteria to man. — New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1982. — 115 p.
- Schmulling T.* CREam of cytokinin signalling: receptor identified // Trends Plant Sci. — 2001. — **6**. — P. 281–284.
- Schnell D.J., Kessler F., Blobel G.* Isolation of components of the chloroplast machinery // Science. — 1994. — **266**. — P. 1007–1012.
- Schnyder H., Machler F., Nosberger J.* Regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity associated with lack of oxygen inhibition of photosynthesis at low temperature // J. Exp. Bot. — 1986. — **37**, N 181. — P. 1170–1179.
- Schoffl F., Prandl R., Reindl A.* Regulation of the heat shock response // Plant Physiol. — 1998. — **117**, N 4. — P. 1135–1141.
- Seemann J.R., Sharkey T.D.* The effect of abscisic acid and other inhibitors on photosynthetic capacity and biochemistry of CO₂ assimilation // Ibid. — 1987. — **84**, N 3. — P. 696–700.
- Shi Y., Mosser D.D., Morimoto R.I.* Molecular chaperones as HSF I-specific transcriptional repressors // Genes. Develop. — 1998. — **12**. — P. 654–666.
- Singh A.K., Singhal J.S.* Effect of irradiance on the thermal stability of thylakoid membrane isolated from acclimated wheat leaves // Photosynthetica. — 2001. — **39**, N 1. — P. 23–37.

-
- Smykal P., Masin J., Konopasek I., Zarsky V.* Chaperone activity of tobacco HSP18, a HSP, inhibited by ATP // Plant J. — 2000. — **23**. — P. 703–713.
- Sorger P.K.* Heat shock factor and the heat shock response // Cell. — 1991. — **65**. — P. 363—366.
- Soto A., Allona I., Collada C. et al.* Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhance *Escherichia coli* viability under heat and cold stress // Plant Physiol. — 1999. — **120**, N 2. — P. 521–528.
- Sriram M., Osipiuk J., Freeman B.* Human Hsp70 molecular chaperone binds two calcium ions within ATPase domain // Structure. — 1997. — **5**. — P. 403–414.
- Stapel D., Kruse E., Kloppstech K.* The protective effect of heat shock proteins against photoinhibition under heat shock in barley (*Hordeum vulgare*) // J. Photochem. Photobiol. B.: Biol. — 1993. — **21**. — P. 211–218.
- Steponkus P.L.* Responses to extreme temperatures: cellular and subcellular bases // Encyclopedia of Plant Physiology. — New York: Acad. Press, 1981. — **12**. — P. 371–402.
- Sun W., Bernard C., Cotte V., Montagu V., Verbuggen N.* At HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon over expression // Plant J. — 2001. — **27**. — P. 407–415.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T.* Identification of genes encoding adenylate isopentyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme in *Arabidopsis thaliana* // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**. — P. 26405–26410.
- Tanaka N., Che F.-S., Watanabe N. et al.* Flagellin from an incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H₂O₂ generation accompanying hypersensitive cell death and expression of PAL, Cht-I, and PBZI, but not LOX in rice // Mol. Plant-Microbe Interact. — 2003. — **16**. — P. 422–428.

-
- Tanguay R.M.* Genetic regulation during heat shock and function of heat-shock proteins: a review // Can. J. Biochem. Cell Biol. — 1983. — **61**. — P. 387–395.
- Terlecky S.P., Chiang H.L., Olson T.S., Dice J.F.* Protein and peptide binding and stimulation of *in vitro* lysosomal proteolysis by the 73 kDa heat shock cognate protein // J. Biol. Chem. — 1992. — **267**. — P. 202–209.
- Thomashow M.F.* Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1999. — **50**. — P. 571–599.
- Tranbarger T.J., Misra S. T.* The molecular characterization of a set of cDNAs differentially expressed during Douglas-fir germination and early seedling development // Physiol. Plant. — 1999. — **95**. — P. 456–464.
- Ukaji N., Kuwabara C., Takezawa D. et al.* Accumulation of small heat-shock protein homologs in the endoplasmic reticulum of cortical parenchyma cells in mulberry in association with seasonal cold acclimation // Plant Physiol. — 1999. — **120**, N 2. — P. 481–489.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.* A novel cis-acting element in a *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high salt stress // Plant Cell. — 1994. — **6**. — P. 251–264.
- Ye L., Gao H., Zou G.* Responses of the antioxidant systems and xanthophyll cycle in *Phaseolus vulgaris* to the combined stress of high irradiance and high temperature // Photosynthetica. — 2000. — **38**. — P. 205–2210.
- Venis M.A., Napier R.M.* Auxin receptors and auxin-binding proteins // Crit. Rev. Plant Sci. — 1995. — **14**. — P. 27–47.
- Verkman A.S., Mitra A.K.* Structure and function of aquaporin water channel // Amer. J. Physiol. — 2000. — **278**. — P. F13–F28.

-
- Vierling E., Key J.L.* Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase synthesis during heat shock // *Plant Physiol.* — 1985. — **78**, N 1. — P. 155–162.
- Vierling E., Mishkind M.L., Schmidt G.W., Key J.L.* Specific heat shock proteins are transported into chloroplasts // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1986. — **83**. — P. 361–365.
- Vierling E.* The roles of heat shock proteins in plants // *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1991. — **42**. — P. 579–620.
- Wakabayashi K., Sakurai N., Kuraishi S.* Effects of ABA on the synthesis of cell-wall polysaccharides in segments of etiolated squash hypocotyls. I. Changes in incorporation of glucose and myo-inositol into cell-wall components // *Plant and Cell Physiol.* — 1989. — **30**, N 1. — P. 99–105.
- Warwicker J.* Modelling of auxin-binding protein I suggests that its C-terminus and auxin could compete for a binding site that incorporates a metal ion and tryptophan residue 44 // *Planta*. — 2001. — **212**. — P. 343–347.
- Waters E.R., Lee G.J., Vierling E.* Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants // *J. Exp. Bot.* — 1996. — **47**, N 296. — P. 325–338.
- Wehmeyer N., Hernandes L.D., Finkelstein R.R., Vierling E.* Synthesis of small heat shock proteins is a part of the developmental program of a late seed maturation // *Plant Physiol.* — 1996. — **112**, N 3. — P. 747–757.
- Wehmeyer N., Vierling E.* The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signal and suggests a general protective role in desiccation tolerance // *Ibid.* — 2000. — **122**, N 7. — P. 1099–1108.
- Weidner M., Fehling E.* Heat modification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by temperature pre-treatment of wheat

-
- (*Triticum aestivum* L.) seedlings // *Planta*. — 1985. — **166**, N 1. — P. 117–127.
- Weidner S., Dechert J., Gwozdz E.* Translational activity of polysomes from embryos during germination of wheat caryopses in the presence of abscisic acid // *Acta Physiol. Plant.* — 1991. — **11**, N 3. — P. 175–182.
- Weissbach A., Horecker B.L., Hyrtwitz J.* The enzymatic formation of phosphoglyceric acid from ribulose diphosphate and carbon dioxide // *J. Biol. Chem.* — 1956. — **218**. — P. 795–810.
- Wiengarden N.A., Wong K.S., Sopta M., Westwood J.T.* Sodium salicylate decreases intracellular ATP, induces both heat shock factor binding and chromosomal puffing, but does not induce hsp gene transcription in *Drosophila* // *J. Biol. Chem.* — 1996. — **271**. — P. 26971–26980.
- Wildman S.G., Bonner J.* The proteins of green leaves. I. Isolation, enzymic properties, and auxin content of spinach cytoplasmic proteins // *Arch. Biochem.* — 1947. — **7**. — P. 391–413.
- Wildman S.G.* The organization of grana-containing chloroplasts in relation to location of some enzymatic system concerned with photosynthesis, protein synthesis, ribonucleic acid synthesis // *Biochemistry of Chloroplasts*. — London: Acad. Press, 1967. — **11**. — P. 259–320.
- Wisniewski M., Close T.J., Artlip T., Arora R.* Seasonal patters of dehydrins and 70-kDa heat-shock proteins in bark tissues of eight species of woody plants // *Physiol. Plant.* — 1996. — **96**. — P. 496–505.
- Wisniewski M., Webb , Balsamo R. et al.* Purification, immunolocalisation, cryoprotective and antifreeze activity of PCA 60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*) // *Ibid.* — 1999. — **105**. — P. 600–608.

-
- Wolff S.* The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implications // Environ. Health Perspect. — 1998. — **106**. — P. 277–283.
- Wu C.* Heat shock transcription factors :structure and regulation // Ann. Rev. Cell Dev. Biol. — 1995. — **11**. — P. 441–469.
- Wu D.H., Laidman D.I.* Selective binding of plant proteins to heat shock protein 70 // Phytochem. — 1997. — **6**, N 46. — P. 987—990.
- Xiao H., Lis J.T.* Germilan transformation used to define key features of heat-shock response elements // Science . — 1988. — **239**, N 4. — P. 1139–1142.
- Xin Z., Chen W., Li P.H.* Evidence for a functional ABA-receptors on the external face of the plasma membrane during induction of chilling tolerance in maize cells // Plant Physiol. — 1994. — **105**, N 1. — P. 142–150.
- Zarsky V., Garrido D., Eller N. et al.* The expression of small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation // Plant Cell Environ. — 1995. — **18**, N 1. — P. 139–147.
- Zeevart J.A.D.* Metabolism and physiology of abscisic acid // Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. — 1988. — **39**. — P. 439–473.

Наукове видання

Косаківська Ірина Василівна

СТРЕСОВІ БІЛКИ РОСЛИН

російською мовою

Редактор А.А. Дідух

Оригінал-макет і верстка М.Д. Алейнікової

В и д а в н и ц т в о Українського фітосоціологічного центру
Київ - 28, а. с. 2, тел/факс (044) 524-11-61

Підп. до друку 25.03.08. Формат 84×108/32. Папір офсет.
Гарнітура Таймс. Друк офсет. Ум. друк. 5,7. Обл.-вид. арк. 4,75.
Наклад 150 прим. Замовлення 658.

Надруковано в друкарні
Українського фітосоціологічного центру

