

HEAT SHOCK PROTEINS
AND PLANT STRESS
RESISTANCE

O. N. KULAIEVA

A universal cell response of all organisms to the heat shock by induction of heat shock proteins is considered. The role of heat shock proteins in cell resistance to heat is discussed. The plant cell response to other stresses is outlined.

В статье рассмотрен универсальный ответ клеток всех живых организмов на тепловой шок синтезом белков теплового шока (БТШ). Обсуждается роль БТШ в устойчивости клеток к тепловому стрессу. Кратко изложен ответ растительных клеток на другие стрессы.

БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА
И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ
К СТРЕССУ

О. Н. КУЛАЕВА

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

Одно из общих свойств клеток всех типов живых организмов состоит в том, что в ответ на увеличение температуры они включают синтез специфического набора белков, называемых белками теплового шока (БТШ), которые помогают клетке выжить в условиях температурного стресса и вернуться после его прекращения к нормальной жизни. Сходство аминокислотной последовательности (гомология) некоторых из них у самых различных организмов от бактерий до человека говорит о их высокой консервативности в эволюции, которая характерна для жизненно важных белков. Все это сделало их изучение одной из центральных биологических проблем, в которой можно выделить три основных направления:

1) индукция БТШ при тепловом шоке (ТШ) является замечательной моделью для изучения молекулярного механизма включения генов, регуляции их активности и перестройки белоксинтезирующей системы [1, 2];

2) изучение БТШ открыло перспективы к выяснению молекулярных основ устойчивости (резистентности) клеток к стрессу [2, 3];

3) исследование БТШ дало мощный толчок к развитию нового направления в изучении белков с особой функцией, которая состоит в том, чтобы “заботиться” о других белках, влияя на их конформацию и препятствуя их агрегации [4]. Эта новая область в изучении “поведения” белков в клетке и роли в нем БТШ не только в стрессовых, но и в обычных условиях рассмотрена в “Соросовском Образовательном Журнале” [5].

Задача данной статьи состоит в том, чтобы проанализировать роль БТШ в устойчивости клеток к тепловому шоку, подробнее остановившись на БТШ растений, и показать, что БТШ являются у растений одним из компонентов программ, вызываемых (индуцируемых) стрессом и необходимых для выживания клеток в стрессовых условиях.

ОТКРЫТИЕ БТШ

Открытие БТШ началось с работ Ф. Ритоззы в 1962 году на политенных хромосомах слюнных желез личинок дрозофилы. Политенными называются гигантские хромосомы, образованные стопками

параллельно упакованных гомологичных нитей хроматина, которых может быть больше 1000. Это позволяет изучать политенные хромосомы под световым микроскопом, различать в них отдельные “диски”, соответствующие генам, и наблюдать, как при активации генов плотная структура диска переходит в “пуф” — вздутие, образующееся за счет разрыхления структуры хроматина в активном гене и накопления синтезирующихся молекул РНК. Ф. Ритозза обнаружил, что повышение температуры с 20 до 37°C приводит к образованию пуфов там, где они не появлялись при нормальной температуре. Так были открыты гены теплового шока. Правда, позднее было обнаружено, что их можно активировать рядом воздействий и при нормальной температуре. Кодируемые этими генами белки были идентифицированы только в 1974 году. Они получили название БТШ. Вскоре выяснилось, что синтез БТШ в ответ на увеличение температуры характерен для клеток всех типов живых организмов: бактерий, грибов, животных всех уровней организации, человека, низших и высших растений.

БТШ у всех организмов представлены большим набором полипептидов, и их принято именовать в соответствии с молекулярной массой, выраженной в килодальтонах (кД). Например, БТШ с молекулярной массой 70 кД называют БТШ70. О существенной роли БТШ в жизни клеток говорит их высокая консервативность в эволюции. Например, БТШ70 имеет высокое сходство аминокислотной последовательности у насекомых, птиц, млекопитающих, грибов и растений. Отдельные участки в БТШ70 сохраняют свыше 90% гомологии у бактерий и человека. У растений БТШ впервые были обнаружены в 1980 году. Как и у других организмов, БТШ растений множественны [2, 3, 6]. Они представлены группой высокомолекулярных (110–60 кД) и низкомолекулярных (35–15 кД) белков. При двумерном электрофорезе каждая группа БТШ делится на несколько представителей. Это определяется, с одной стороны, тем, что каждое семейство БТШ кодируется, как правило, несколькими генами (семейством близких генов), различающимися главным образом по регуляции их активности, а с другой стороны, БТШ подвергаются модификациям, происходящим после завершения их синтеза. К числу таких модификаций относится, например, обратимое фосфорилирование. Отличительными чертами растений являются множественность низкомолекулярных БТШ и высокая интенсивность их синтеза при ТШ.

ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ КЛЕТОК НА СИНТЕЗ БТШ ПРИ ТЕПЛОВОМ ШОКЕ

Синтез БТШ — стрессовая программа, включаемая тепловым шоком (рис. 1). Он происходит при подъеме температуры на 8–10°C выше нормальной. Например, у широко применяемого в генетических

и физиологических исследованиях растения арабидопсис (резушка Таля — *Arabidopsis thaliana*), с малым размером генома, синтез БТШ происходит при температуре 28–37°C, в листьях ячменя максимум синтеза БТШ достигается при 40°C, а в листьях риса — при 45°C. Необходимо заметить, что индукция синтеза отдельных представителей БТШ может различаться по температуре нагрева и его продолжительности. В результате можно различить ранние и поздние БТШ.

Переключение нормальной жизни клетки на стрессовую программу — событие чрезвычайное, которое осуществляется одновременно на многих уровнях регуляции. Оно включает в себя репрограммирование генома — тормозится экспрессия генов, активность которых характерна для жизни клетки в нормальных условиях, и активируются гены теплового шока. В результате в клетках растений, как и дрозофилы, мРНК, кодирующие БТШ, обнаруживаются через 5 мин от начала стресса. Тепловой шок вызывает не только репрограммирование генома и, следовательно, изменение состава вновь синтезируемых мРНК, но и репрограммирование рибосом — распад полисом, синтезирующих белки, типичные для нормальных условий обитания, и формирование полисом, синтезирующих БТШ (см. рис. 1). Такое стремительное включение синтеза БТШ не только на транскрипционном (синтез РНК на ДНК), но и на трансляционном (синтез белка на мРНК) уровне достигается в результате многих событий. Тепловой шок (ТШ) вызывает изменения в мРНК, синтезированных в клетке до шока, происходит модификация белковых факторов трансляции и рибосомных белков. Кроме того, мРНК БТШ имеют отличия от мРНК обычных белков. Все это обуславливает ослабление, а затем и прекращение синтеза обычных белков в клетках и переключение аппарата белкового синтеза на синтез БТШ. В результате БТШ обнаруживаются в клетках уже через 15 мин после начала теплового шока, их синтез активируется, достигая максимума за 2–4 ч ТШ, а затем начинает ослабевать. У дрозофилы синтез БТШ происходит на фоне прекращения синтеза белков, типичных для нормальной температуры. Однако у растений это выражено не так резко, и синтез разных белков растений проявляет различную устойчивость к нагреву.

На рис. 2 представлена флюорограмма радиоактивных белков, выделенных из семян долей тыквы и их хлоропластов. Синтез белков в семенах долей происходил в течение 1,5 ч в присутствии (³⁵S)-метионина. Включение (³⁵S)-метионина в белки во время их синтеза позволило получить меченые белки. После выделения белки фракционировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле. Рис. 2 показывает, что в условиях ТШ ослабевал синтез ряда белков, характерных для нормальной температуры, хотя синтез большой и малой субъединиц (БС) и (МС) рибулезобисфосфаткарбоксилазы (РБФК) —

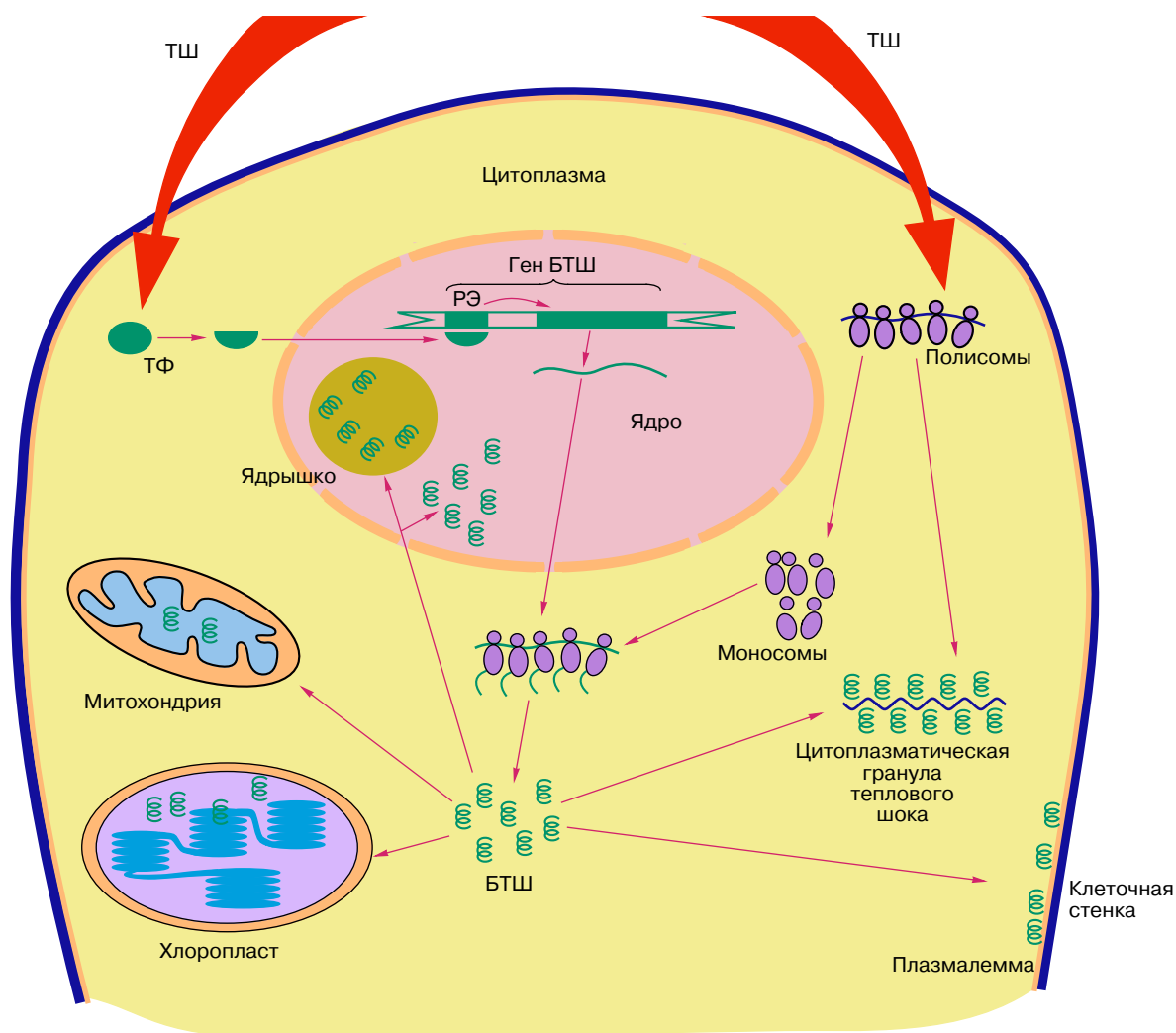


Рис. 1. Схема индукции синтеза белков теплового шока (БТШ) в клетках: ТШ – тепловой шок, ТФ – трансфактор генов БТШ, РЭ – регуляторный элемент генов БТШ, включающий их экспрессию при ТШ. Зеленые волнистые линии – мРНК БТШ. Зеленые спирали – БТШ. Красными стрелками обозначена система ответа клетки на ТШ вплоть до поступления БТШ во все компартменты клетки, включая ядро, митохондрии, хлоропласты и цитоплазматические гранулы ТШ. Синей волнистой линией обозначена дощочковая мРНК (в дощочковых полисомах и гранулах ТШ)

ключевого фермента фотосинтеза – продолжался и при 40°C. ТШ усиливал синтез высоко- и низкомолекулярных БТШ. Набор БТШ хлоропластов существенно отличался от суммарных БТШ семядолей.

Рис. 3 позволяет видеть, что синтез различных БТШ хлоропластов происходит при разной температуре. Синтез высокомолекулярных БТШ был активирован в диапазоне 34–42°, ослабевал при 44°C и резко снижался при 46°C. Индукция синтеза низкомолекулярных БТШ была особенно большой при 40–42°C. Существенное угнетение синтеза БС РБФК происходило только при 44°C. Необходимо подчеркнуть, что почти все из обнаруженных БТШ хлоропластов кодируются в ядре, синтезируются в

цитоплазме и потом транспортируются в хлоропласт, где и выполняют защитную функцию во время ТШ.

Включение генов БТШ при высокой температуре определяется регуляторными элементами генов БТШ (РЭ БТШ), то есть специфическими нуклеотидными последовательностями ДНК в промоторной (регуляторной) зоне этих генов. РЭ сходны у генов разных представителей БТШ и обладают высокой гомологией у всех эукариот. Например, в промоторе гена БТШ70 кукурузы обнаружены два таких РЭ, близких РЭ БТШ70 дрозофилы. Это говорит о том, что не только структура БТШ, но и механизм включения их синтеза сохранил постоянство в эволюции.

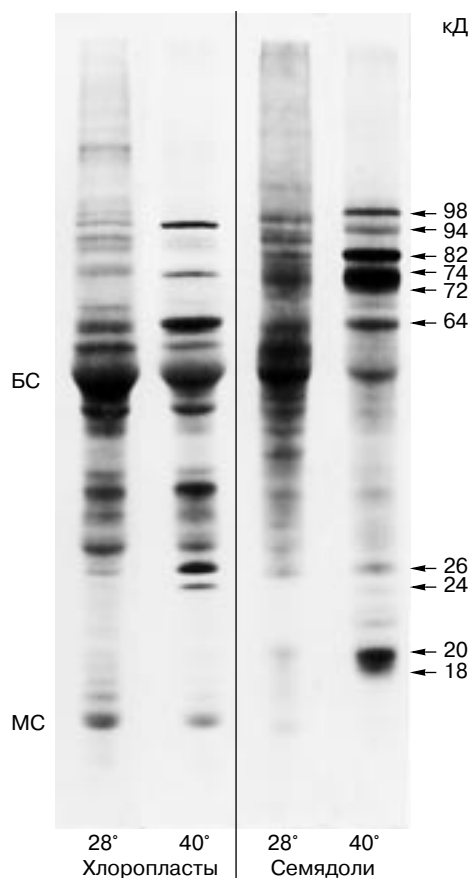


Рис. 2. Флюорограмма радиоактивных белков семядолей тыквы и их хлоропластов. Синтез белка происходил в семядолях в течение 1,5 ч при нормальной (28°C) и шоковой (40°C) температуре в присутствии (³⁵S)-метионина. Затем белки извлекали из семядолей и выделенных из них хлоропластов и разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле. На рисунке представлена флюорограмма радиоактивных белков. Цифрами отмечены молекулярные массы БТШ в килодальтонах. БС и МС – большая и малая субъединицы рибулезобисфосфаткарбоксилазы

РЭ ТШ включают гены БТШ после взаимодействия со специфическими регуляторными белками – факторами транскрипции или трансфакторами этих генов. Эти трансфакторы присутствуют в цитоплазме при нормальных условиях (рис. 1). Тепловой шок вызывает их модификацию, например увеличивается их фосфорилирование, после чего они приобретают способность взаимодействовать с РЭ генов БТШ и тем самым включать активность этих генов. К настоящему времени выявлены некоторые различия в механизмах активации тепловым шоком трансфакторов генов БТШ далеких эволюционно организмов. Однако важнее подчеркнуть принципиальную общность этих механизмов у всех эукариот. Лучше всего об этом говорит следующий факт.

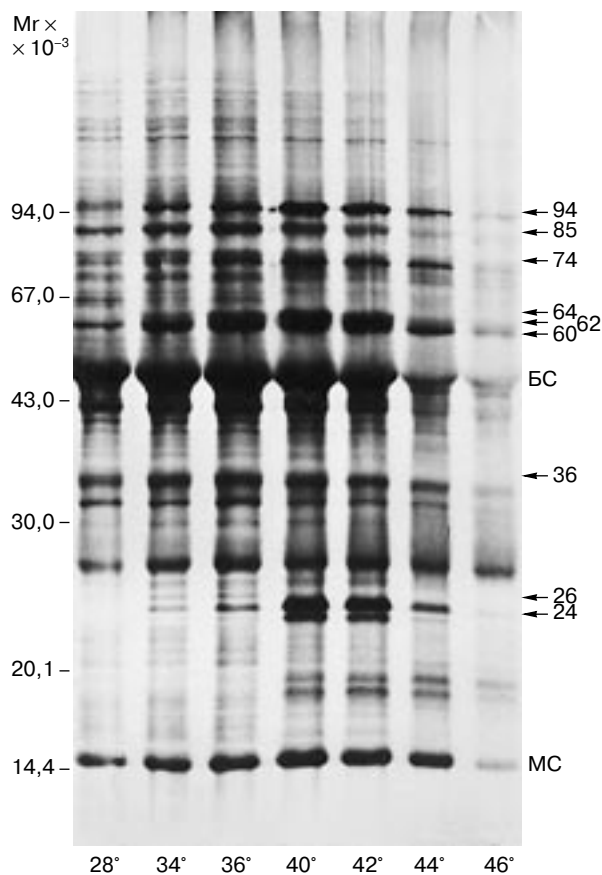


Рис. 3. Температурная зависимость синтеза белков хлоропластов семядолей тыквы. Условия получения флюорограммы меченых белков те же, что и на рис. 2. Синтез белка в присутствии (³⁵S)-метионина происходил в семядолях при температурах, указанных на рисунке. Слева указано положение на электрофореграмме стандартных белков и их молекулярных масс, которые позволяют судить о молекулярных массах меченых хлоропластных белков. Цифры справа означают молекулярные массы БТШ в килодальтонах. БС и МС – большая и малая субъединица РБФК (Kusnetsov V.V., Mikulovich T.P., Kukina I.M. et al. // FEBS Lett. 1993. Vol. 321, № 2/3. P. 189–193)

Введение в геном растительной клетки генетической конструкции, содержащей чужеродный репортерный ген (от “репортер” – дающий информацию), под контролем РЭ гена БТШ70 дрозофилы вызывало экспрессию этого репортерного гена при тепловом шоке в клетках растения. Следовательно, трансфактор генов БТШ, присутствующий в цитоплазме растительной клетки, узнавал в условиях теплового шока РЭ гена БТШ70 дрозофилы и включал экспрессию репортерного гена.

После окончания теплового шока синтез БТШ прекращается и возобновляется синтез белков, характерных для клетки в нормальных температурных условиях. При этом мРНК БТШ быстро разрушаются

в клетках при нормальной температуре, тогда как сами белки могут сохраняться существенно дольше, обеспечивая, по-видимому, повышение устойчивости клеток к нагреву. Длительное пребывание клеток в условиях ТШ обычно также приводит к ослаблению и прекращению синтеза БТШ. В этом случае включаются механизмы регуляции экспрессии генов БТШ по принципу обратной связи. Накопление в клетках БТШ выключает активность их генов. Возможно, таким путем клетка поддерживает количество БТШ на необходимом уровне, препятствуя их сверхпродукции.

КАКИЕ ОСНОВАНИЯ СЧИТАТЬ, ЧТО БТШ СПОСОБСТВУЮТ ЗАЩИТЕ КЛЕТОК ОТ ТЕПЛОвого ШОКА

Переключение клеток всех живых организмов в условиях ТШ на синтез БТШ вызывает естественное предположение, что эти белки защищают клетки при стрессе. Однако нужны прямые доказательства их защитной функции. Общность структуры БТШ и молекулярных механизмов включения их синтеза при тепловом шоке у всех представителей живого мира позволяет, анализируя эту проблему, привлекать данные, полученные на разных организмах [1–3, 6]:

1) выключение синтеза белка специфическими ингибиторами во время теплового шока, когда происходит синтез БТШ, приводит к гибели клеток;

2) клетки можно закаливать, повышая их термостойчивость путем предварительного кратковременного воздействия повышенных температур. Оказалось, что условия такой закалки совпадают с условиями индукции синтеза БТШ. Это хорошо показано в культуре клеток растений [2];

3) как выяснилось, синтез БТШ индуцирует не только ТШ, но и ряд других неблагоприятных воздействий. У животных таких дополнительных индукторов синтеза БТШ очень много, у растений к ним относятся, например, соли кадмия и арсенит. Оказалось, что синтез БТШ, вызванный солями Cd или другими нетемпературными воздействиями, повышает устойчивость клеток к нагреву;

4) обнаружено, что мутации (изменения в структуре гена), повреждающие синтез БТШ, приводят к потере устойчивости клеток к нагреву. Однако это справедливо не для всех представителей БТШ. Существенно, что термочувствительность дрожжей, возникшая в результате мутации гена БТШ104, могла быть исправлена генно-инженерным путем за счет введения в дрожжи гена БТШ101 арабидопсиса. Это не только прямое доказательство участия БТШ104 в терморезистентности клеток, но и убедительное свидетельство общности механизма терморезистентности клеток дрожжей и растений;

5) убедительное доказательство защитной роли БТШ при нагреве получено на клетках соединительной ткани крыс – фибробластах. В клетки вво-

дили антитела к БТШ70. Это приводило к гибели клеток при тепловом шоке за счет того, что антитела, взаимодействуя с БТШ70, мешали проявлению их функции в условиях шока. В частности, препятствовали проникновению БТШ70 в ядро, где эти белки накапливаются во время шока, образуя комплексы с хроматином, а в ядрышке – с предшественниками рибосом, которые они защищают от необратимых тепловых повреждений. При нормальной температуре антитела к БТШ70 не вызывали гибели клеток. Гибель клеток при ТШ, когда антитела препятствуют проникновению БТШ70 в ядро, подчеркивает важность его функции в ядре для термостойчивости клеток. Совокупность представленных аргументов достаточно убедительно говорит в пользу защитной роли БТШ при тепловом шоке. Однако как это происходит, пока еще далеко не ясно. Исследования конкретной функции каждого БТШ необходимы для выяснения молекулярного механизма защитных систем клеток при стрессе.

ФУНКЦИИ БТШ И ГОМОЛОГИЧНЫХ ИМ БЕЛКОВ, КОТОРЫЕ СИНТЕЗИРУЮТСЯ ПРИ НОРМАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Как выяснилось, большинство БТШ имеют в клетках родственные белки, которые синтезируются при нормальной температуре постоянно или на определенных стадиях развития организма. Например, у дрожжей семейство БТШ70 кодируется девятью генами, из которых шесть усиливают экспрессию при тепловом шоке, два снижают, а один не реагирует на тепловой шок. У дрозофилы один из БТШ70 индуцируется тепловым шоком, а семь других экспрессируются при нормальной температуре. В последнее десятилетие появился прогресс в понимании того, что делают эти белки. БТШ70 присоединяется к другим белкам, вызывая их разворачивание и препятствуя их агрегации, которая помешала бы белку приобрести нативную конформацию, необходимую для его функциональной активности (см. [5]). Разворачивание белков с помощью БТШ70 необходимо для их проникновения через мембрану хлоропластов, митохондрий и эндоплазматического ретикулаума. Агрегация белков резко усиливается при повышении температуры. Активация синтеза в этих условиях БТШ70 должна защищать белки от необратимого повреждения. Поскольку БТШ70 влияет на конформационное состояние других белков, его относят к группе шаперонов (от англ. *chaperon*, обозначающего проводящую, наставника при молодой особе). Подробнее о шаперонах можно прочитать в статье Н.К. Наградовой (Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 7. С. 10–18) [5]. Взаимодействие БТШ70 с другими белками АТР/АДР зависимо: постулируется, что БТШ70 в комплексе с АТР удерживает на себе расплетенный белок, замена АТР на АДФ приводит к освобождению этого белка из комплекса с БТШ70. Замена связанной с БТШ70 АТР на АДФ происходит

за счет АТФ-азной активности БТШ70. Предполагают, что БТШ70 совершает АТФ-зависимый цикл работы по протаскиванию белков через мембрану, в основе которого лежит изменение конформации БТШ70 в зависимости от связи с АТФ или АДФ [8].

БТШ70 присутствует во всех компартментах клетки. На рис. 1 представлена схема ответа клетки на ТШ синтезом БТШ и их последующим распространением во все части клетки. БТШ70 обнаруживается в ядре и ядрышке, где он накапливается при тепловом шоке; в цитоплазме, в связи с элементами цитоскелета, в связи с клеточной мембраной, в митохондриях, хлоропластах и эндоплазматическом ретикулуме. БТШ70 способствует прохождению синтезированных в цитоплазме предшественников хлоропластных белков через хлоропластную мембрану, играя тем самым важную роль в биогенезе хлоропластов. Это справедливо и для митохондрий.

Другая группа белков теплового шока — БТШ60 также относится к шаперонам, их называют также шаперонинами. Эти белки обеспечивают правильную сборку четвертичной структуры клеточных белков [5]. Такую функцию они выполняют у бактерий, в митохондриях и хлоропластах эукариотических клеток. Они образуют два наложенных друг на друга кольца, в каждом из которых присутствуют по семь субъединиц БТШ60. Такая сложная структура направляет правильную упаковку клеточных белков при образовании четвертичной структуры, например ключевого фермента фотосинтеза РБФК, который строится из восьми малых и восьми больших полипептидов (субъединиц) и локализуется в строме хлоропластов.

К группе шаперонов относят БТШ90. Этот белок играет крайне важную роль в образовании комплекса стероидных гормонов с их рецептором. Вместе с БТШ70 и другими белками БТШ90 контролирует функциональную активность рецепторов стероидных гормонов, направляя их “поведение” в клетке. Установлено, что БТШ90 образует комплексы с некоторыми протеинкиназами, контролируя их активность. Как известно, протеинкиназы фосфорилируют самые различные клеточные белки и благодаря этому регулируют их активность. БТШ90 обнаружен в клетках растений, однако сведений о его функции у растений пока нет. Таким образом, БТШ60, 70 и 90 образуют комплексы с другими белками клетки, изменяя их структуру и функциональное состояние. Предполагают, что во время теплового шока они защищают клеточные белки от повреждения, хотя многое в этом направлении еще предстоит выяснить.

К БТШ относится также убиквитин — белок, присоединение которого к N-концу полипептида делает этот полипептид мишенью для разрушения протеазами. Это “метка смерти” для белков, и при ее помощи происходит выбраковка поврежденных, недостроенных и функционально неактивных по-

липептидов. Ассоциированный с убиквитином белок разрушается в особых мультикомпонентных комплексах, называемых протеасомами. Тепловой шок приводит к появлению в клетках недостроенных и поврежденных белков, для удаления которых важен убиквитин. Интересно, что появление таких поврежденных и недостроенных белков в клетках является сигналом к синтезу БТШ даже при нормальной температуре. К тому же факторы, стабилизирующие структуру белков, тормозят синтез БТШ.

В число БТШ входят низкомолекулярные белки. У дрожжей всего один ген кодирует низкомолекулярный БТШ, а у растений их больше 30. Молекулярная масса этих БТШ лежит в диапазоне от 16 до 40 кД. Эти белки локализируются главным образом в специальных гранулах — цитоплазматических гранулах теплового шока (рис. 4), которые появляются в цитоплазме во время ТШ и исчезают после его окончания [2, 3]. В гранулах теплового шока обнаруживается также мРНК, синтез которых происходил в нормальных температурных условиях. Поэтому полагают, что цитоплазматические гранулы теплового шока предохраняют “дошовые” мРНК в клетках, что дает возможность вновь использовать эти мРНК для синтеза белка после окончания шока.

На рис. 4 показаны изменения в ультраструктуре растительных клеток при действии теплового шока. Видно появление электронноплотных образований в ядре за счет конденсации хроматина и скопления нуклеопротеидных частиц, содержащих предшественники мРНК — премРНК. В этих частицах обнаруживается БТШ70, который, по-видимому, защищает от необратимых повреждений при высокой температуре хроматин и синтезированные до ТШ предшественники мРНК для “дошовых” белков. Эндоплазматический ретикулум приобретает характерный вид ватрушки. В цитоплазме видны скопления электронноплотных частиц, называемых цитоплазматическими гранулами теплового шока. Специальная техника с использованием антител к БТШ 17 кД, протеина А (белок из золотистого стафилококка, взаимодействующий с иммуноглобулинами и, следовательно, с антителами к БТШ) и коллоидного золота позволяет обнаружить скопление в цитоплазматических гранулах низкомолекулярных БТШ. Важно, что такие же структурные изменения обнаружены нами в клетках растений при других стрессах: недостатке воды и действии высоких концентраций солей.

Низкомолекулярные БТШ у растений обнаруживаются не только в цитоплазматических гранулах теплового шока, но и в других компартментах, в том числе в хлоропластах. Предполагают, что они защищают от теплового шока тилакоидные мембраны, в которых локализованы процессы трансформации световой энергии в химическую. Низкомолекулярные БТШ переменны по своей первичной структуре, но у всех представителей этого семейства есть

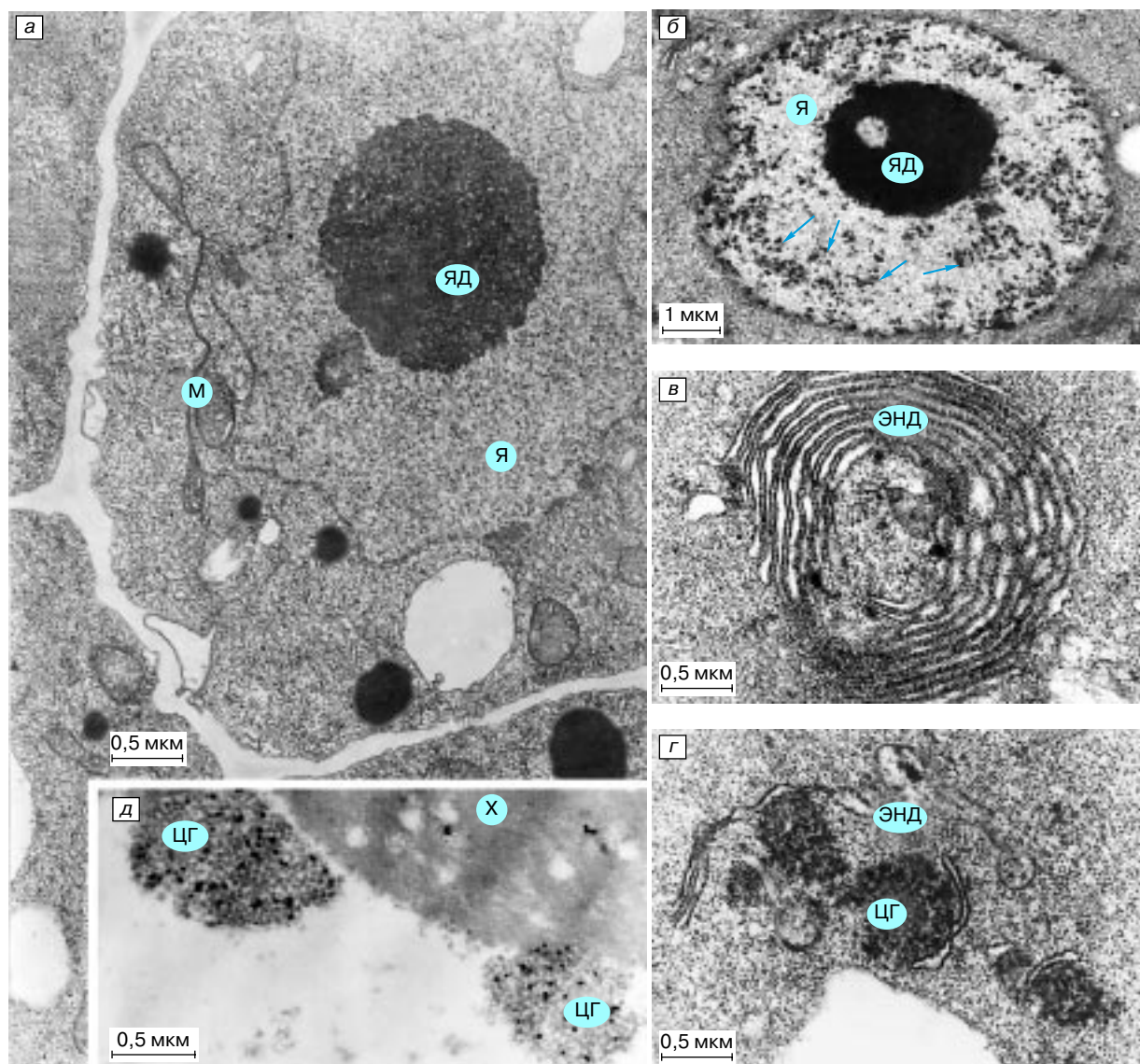


Рис. 4. Ультраструктурные изменения клеток меристемы корня тыквы под действием теплового шока (40 °С; 1,5 ч): а – контрольная клетка при нормальной температуре 28 °С. Видны ядро, ядрышко, митохондрии, каналы эндоплазматического ретикулума и небольшие вакуоли; б – ядро и ядрышко клетки при тепловом шоке. Стрелками помечены электронноплотные образования; в – эндоплазматический ретикулум при тепловом шоке; г – цитоплазматическая гранула теплового шока; д – локализация низкомолекулярных БТШ (17 кД) в цитоплазматической грануле (ЦГ) теплового шока в клетках листа *Arabidopsis thaliana*. БТШ выявляли с помощью комплекса, состоящего из антител к БТШ 17 кД, протеина А и коллоидного золота. Видные под электронным микроскопом черные точки коллоидного золота соответствуют локализации БТШ 17 кД. Протеин А – 42 кД белок из золотистого стафилококка, распознающий иммуноглобулины, к которым относятся антитела к 17 кД БТШ. Я – ядро, ЯД – ядрышко, М – митохондрия, ЭНД – эндоплазматический ретикулум, ЦГ – цитоплазматические гранулы, Х – хлоропласт

аминокислотная последовательность, гомологичная α -кристаллину – белку хрусталика глаза. Пока значимость этого наблюдения, как и вообще функция низкомолекулярных БТШ, требует дальнейшего выяснения. Следует упомянуть, что многие из них синтезируются в клетках на определенных стадиях развития растений и имеют органную специфичность. В период мейоза у лилии, кукурузы, а

также у дрозофилы и дрожжей четко выражен синтез одного из низкомолекулярных БТШ в нормальных температурных условиях. Возможная регуляторная роль БТШ в онтогенезе организмов подчеркивается тем, что у дрозофилы гормон линьки – экдизон инициирует синтез БТШ. БТШ синтезируются в эмбриогенезе растений, обеспечивая устойчивость зародышей к ТШ в первые часы набухания семян.

Долгое время одним из аргументов против участия БТШ в термотолерантности клеток служило отсутствие их синтеза при ТШ в пыльце. Однако впоследствии у некоторых растений (но не у всех) был обнаружен конститутивный (неиндуцированный) синтез БТШ во время формирования пыльцы. Следовательно, предсинтезированные БТШ могли обеспечить термостабильность пыльцы при ТШ, хотя нельзя исключить наличие у пыльцы и других механизмов устойчивости к нагреву. Важно подчеркнуть, что синтез БТШ происходит у растений в жаркие часы при их выращивании в полевых условиях и, по-видимому, обеспечивает нормальную функцию растений при смене температур.

Мы рассмотрели защиту клеток всех живых организмов от теплового шока при помощи БТШ. Это не исключает других защитных механизмов, действующих на уровне синтеза химических протекторов, изменения свойств мембран и ионного гомеостаза клеток. Не следует также забывать, что помимо клеточных механизмов защиты от теплового шока, в которых БТШ играют важнейшую роль, существуют другие, организменные уровни, связанные с морфологическими изменениями растений или усилением транспирации (испарения воды через устьица), снижающей температуру листьев.

ДРУГИЕ СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ РАСТЕНИЙ

Репрограммирование генома при стрессе, приводящее к синтезу специфических стрессовых белков, которые помогают клетке пережить экстремальные воздействия, является общим принципом ответа клеток на многие стрессы. Например, кислородное голодание (анаэробноз), в которое наиболее часто попадают корни и прорастающие семена при затоплении почвы, вызывает синтез специфических стрессовых белков анаэробноза. Они включают в себя ферменты гликолиза, которые позволяют обеспечить клетки энергией при недостатке кислорода. Крайне активно синтезируются несколько форм алкогольдегидрогеназы. Синтез белков анаэробноза включается на уровне активации их генов через регуляторный элемент анаэробного шока, который гомологичен у разных генов ответа на анаэробноз и у разных растений. Эта генетическая программа позволяет растениям пережить непродолжительный недостаток кислорода. Так, клубни картофеля гибнут при анаэробнозе через 48 ч, проростки кукурузы — через 3 дня, риса — через 7 дней. Но есть среди растений рекордсмены, например *Acorus calamus* — растение-амфибия, клубни которого сохраняют жизнеспособность в течение двух месяцев анаэробноза. Такие растения представляют особый интерес для генных инженеров как потенциальные доноры генов устойчивости при получении стресс-резистентных трансгенных растений.

Обезвоживание клеток растений вызывает синтез большого набора белков с невыясненной пока

функцией. Их индуктором является фитогормон — абсцизовая кислота (АБК). Эти белки синтезируются при нормальном водоснабжении растений в зародышах на стадии позднего эмбриогенеза, когда происходит естественное обезвоживание созревающих семян; синтезу предшествует накопление в семенах АБК, которая индуцирует синтез этих белков. Поэтому их называют белками позднего эмбриогенеза или белками ответа на АБК. При нормальном водоснабжении они отсутствуют в листьях, но недостаток воды вызывает накопление в листьях АБК, которая индуцирует синтез белков обезвоживания. Эти белки и их гены пристально изучают, чтобы понять механизм устойчивости клеток к обезвоживанию. Особое внимание уделяется таким рекордсменам засухоустойчивости, как, например, *Cratogeomys plantagineum*, которая способна высушиться до воздушно-сухого состояния, а после предоставления воды быстро зеленеть и возвращаться к нормальному функционированию.

Растение испытывает недостаток воды не только при засухе, но также при засолении почвы и холоде. В настоящее время обнаружено, что при каждом из этих стрессов синтезируются как общие, так и специальные для каждого из них белки. Важную роль при этих стрессах играют низкомолекулярные осмопротекторы — вещества, которые накапливаются в клетках в высоких концентрациях, препятствуют их обезвоживанию и выполняют защитную функцию по отношению к внутриклеточным структурам, включая мембраны и различные белковые комплексы. Такую осмопротекторную функцию выполняют сахара, пролин, полиамины, олигосахариды, полиспирты, например маннит и сорбит, и многие другие соединения. Их накопление коррелирует с засухоустойчивостью. Например, у *Mesembryanthemum crystallinum* — растения, обитающего в пустынях Намибии и обладающего устойчивостью к засухе, засолению и холоду одновременно, концентрация осмопротекторов в цитоплазме и хлоропластах достигает при стрессе 700 мМ, а в специализированных эпидермальных клетках превышает 1 М [9].

Среди белков, чей синтез активируется у арабидопсиса при засолении, обнаружен аквапорин — белок, образующий каналы в мембране для прохождения в клетку воды. Он гомологичен у растений и животных. Введение мРНК аквапорина растений в ооциты *Xenopus* повышает их проницаемость для воды. Следовательно, у растений и животных существуют общие молекулярные механизмы поступления воды в клетки. Это не противоречит осморегуляторной функции вакуоли, в мембране которой (тонопласте) также обнаружен аквапорин. Все сказанное позволяет видеть общность ответа клеток растений и других организмов на различные стрессы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стрессовые белки синтезируются в растениях в ответ на различные экстремальные воздействия: анаэробноз, окислительный стресс, повышенные и пониженные температуры, обезвоживание, высокие концентрации соли, при действии тяжелых металлов, вредителей, а также при раневых эффектах и ультрафиолетовой радиации. Каждый из перечисленных стрессов вызывает синтез специфических для него белков. Вместе с тем есть белки, которые индуцируются при различных стрессах. Например, БТШ70 синтезируется при пораниении растений, недостатке воды, засолении, действии АБК. Арсенит и соли Cd индуцируют у растений полный спектр БТШ, действуя через другие регуляторные элементы генов БТШ, чем ТШ. Очевидно, в эволюции возникла способность этих генов отвечать на различные неблагоприятные воздействия и обеспечивать защитные реакции клеток. Это позволяет ожидать наряду со специфическими механизмами устойчивости клеток к неблагоприятным факторам и наличия общих механизмов. Существенно, что эти механизмы могут иметь много одинакового у различных организмов. Выше мы рассмотрели общность структуры, функции и регуляции синтеза БТШ у всех живых организмов. Восстановление термотолерантности у мутантов дрожжей под действием гена БТШ растений доказывает генетическое единство устойчивости их клеток к тепловому шоку.

Обнаружение общих осмопротекторов при обезвоживании клеток и действии на них засоления у бактерий, дрожжей и растений также подчеркивает существование сходных путей защиты клеток разных организмов при стрессах. Открытие у растений белка аквапорина говорит об общих молекулярных механизмах снабжения клеток разных организмов водой.

Ни в коем случае не забывая специфику структуры и функции клеток растений и растительного организма в целом, важно констатировать, что системы стресс-резистентности растений на клеточном и молекулярном уровнях имеют общие черты с другими организмами. Это открывает перспективы использования подходов, разработанных на других организмах, для изучения стресс-резистентности растений и поиска в геноме растений генов, входящих в программы устойчивости у других организмов. Наряду с изучением генов и белков, определяющих особую толерантность представителей дикой флоры, исследования в рассмотренном направлении должны способствовать получению высокорезистентных трансгенных растений, то есть растений

с введенным в геном чужеродным геном, придающим растению новые свойства. На этом пути предстоят большие трудности, хотя бы потому, что, как правило, стресс-резистентность — мультигенный признак, и тем не менее работа в этом направлении принесет в будущем успех, масштабы которого сейчас невозможно предсказать.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лозовская Е.Р., Левин А.В., Евгеньев М.Б. Тепловой шок у дрозофилы и регуляция активности генома // Генетика. 1982. Т. 18, № 2. С. 1749–1762.
2. Nover L., Hellmund D., Neumann D. et al. Heat Shock Response of Eucaryotic Cells // Biol. Zentr.-Bl. 1984. Bd. 103, H. 4. S. 357–435.
3. Кулаева О.Н., Микулович Т.П., Хохлова В.А. Стрессовые белки растений. В кн.: Современные проблемы биохимии / Под ред. Г.К. Скрыбина, М.С. Одинцовой. М.: Наука, 1991. С. 174–190.
4. Georgopoulos C., Welch W.J. Role of the Major Heat Shock Proteins as Molecular Chaperones / Annu. Rev. Cell Biol. 1993. Vol. 9. P. 901–934.
5. Наградова Н.К. Внутриклеточная регуляция формирования нативной пространственной структуры белков / Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 7. С. 10–18.
6. Войников В.К., Иванова Г.Г., Рудиковский А.В. Белки теплового шока растений // Физиология растений. 1984. Т. 31. С. 970–979.
7. Кулаева О.Н., Микулович Т.П., Веселова Т.В. и др. Белки теплового шока и фотосинтетическая активность при длительном температурном воздействии на семена тыквы // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300, № 5. С. 1277–1279.
8. Glick B.S. Can Hsp70 Proteins Act as Force – Generating Motors? // Cell. 1995. Vol. 80. P. 11–14.
9. Bohnert H., Nelson D., Jensen R.G. Adaption to Environmental Stresses // Plant. Cell. 1995. Vol. 7. P. 1099–1111.

* * *

Ольга Николаевна Кулаева, доктор биологических наук, профессор, вице-президент Общества физиологов растений России, зав. лабораторией экспрессии генома растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, специалист в области регуляторных систем растений, включая фитогормоны и ответ растений на стресс. Читает спецкурс «Регуляторные системы растений» на кафедре физиологии растений Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и спецкурс «Фитогормоны» в Пушкинском государственном университете. Автор 251 печатной работы, в том числе двух монографий. Награждена премией им. К.А. Тимирязева РАН.