

# СТРУКТУРА, РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ДЕСАТУРАЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2001 г.

Д. А. ЛОСЬ

*Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева, РАН, Москва*

I. Введение. II. Типы десатураз жирных кислот. III. Структура десатураз жирных кислот. IV. Экспрессия генов десатураз. V. Роль десатураз в адаптации. VI. Текучесть мембран и экспрессия генов десатураз жирных кислот: обратная связь. VII. Температурные сенсоры и экспрессия генов десатураз. VIII. Аспекты практического применения знаний молекулярной биологии липидного обмена. IX. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Десатуразы жирных кислот (ЖК) – это ферменты, катализирующие превращение одинарной связи между атомами углерода в ацильных цепях (C-C) в двойные связи (C=C) [44, 163]. Образованные двойные связи часто называются ненасыщенными связями, а ферментные реакции – реакциями десатурации. Десатурация требует наличия молекулярного кислорода и происходит в аэробных условиях [59, 163]. Десатуразы ЖК были найдены практически во всех организмах, за исключением некоторых бактерий, например, *Escherichia coli* [47].

Десатурация ЖК в глицеролипидах является важнейшей реакцией, необходимой для поддержания физических свойств мембранных липидов. При нормальной (физиологической) температуре полярные глицеролипиды, содержащие только насыщенные ЖК, не образуют двойного слоя, т.е., основной структуры биологических мембран [158]. Образование определенного количества двойных связей в ЖК снижает температуру перехода из фазы геля (твердая фаза) в жидко-

---

*Принятые обозначения:* для десатураз:  $\Delta^9$ -десатураза,  $\omega^3$ -десатураза и т.д.; для позиции десатурации:  $\Delta^9$ ,  $\Delta^{6,9,12}$ ,  $\omega^3$  и т.д.; для жирных кислот: 16:0, 18:1 <sup>$\Delta^9$</sup> , 18:3 <sup>$\Delta^{6,9,12}$</sup>  и т.д.; АПБ – ацил-переносящий белок; ЖК – жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

*Адрес для корреспонденции:* e-mail: losnet@ippras.ru

кристаллическую фазу и придает мембранам необходимую степень текучести [46, 130]. Параметры текучести мембран, в свою очередь, являются определяющими для функционирования множества мембраносвязанных ферментных систем [56, 172]. Десатурация в *цис*-положении более эффективна для изменения физических свойств липидов, чем десатурация в *транс*-положении, и абсолютное большинство двойных связей в ЖК липидов биологических мембран находится в *цис*-положении.

ЖК синтезируются из ацетата многокомпонентными синтазами ЖК в хлоропластах растений [44, 45] и комплексными синтазами ЖК, отличающимися по компонентному составу от синтаз хлоропластов, в цитоплазме клеток животных, дрожжей и других грибов [144, 175]. Оба типа синтаз продуцируют насыщенные ЖК, которые затем превращаются в ненасыщенные благодаря активности десатураз. В прокариотических клетках, таких, например, как цианобактерии, насыщенные ЖК синтезируются синтазами, аналогичными хлоропластным [29, 67, 107]. Однако *E. coli* имеет уникальную синтазу, которая способна образовывать двойную связь в процесса синтеза цепи ЖК [47].

Живые организмы способны приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды, используя различную стратегию адаптации. В течение последних двух десятилетий большое внимание уделяется молекулярным механизмам холодоустойчивости растений. Низкие температуры вызывают значительную перестройку всего клеточного метаболизма. Изменения включают десатурацию жирных кислот, накопление полиолов, аминокислот, глицин-бетаина, сахарозы, многочисленных белков [112]. Низкие температуры индуцируют гены, активируемые абсцизовой кислотой, гены дегидринов, белков позднего эмбриогенеза, липид-переносящих белков, некоторых рибосомных и других РНК-связывающих белков. Мы сконцентрируем свое внимание на выяснении роли ПНЖК и десатураз в адаптации фотосинтезирующих организмов и клеток к низким температурам.

В 1973 году была предложена гипотеза, согласно которой первичная роль в холодостойкости растений отводилась мембранным липидам, в частности, их способности к фазовым переходам в зависимости от температуры окружающей среды [84, 125, 126].

Эта гипотеза основана на обнаружении феномена гомеовискозной или гомеофазной адаптации [148]. Под воздействием низких температур мембраны с разделенной липидной фазой не способны поддерживать ионные градиенты и нормальное функционирование мембраносвязанных ферментных систем, в результате чего нарушается клеточный метаболизм, что, в конце концов, приводит к гибели всего

организма. Способность клеток растений к адаптации в таких условиях связывается с возможностью изменять текучесть мембран посредством увеличения количества ненасыщенных ЖК в мембранных липидах. В связи с этим, важное значение имеют исследования структуры, свойств и регуляции десатураз ЖК — ферментов, отвечающих за образование двойных связей в их цепях, и, следовательно, за изменение физических свойств биологических мембран. Знания биохимии и молекулярной биологии десатураз открывают широкие перспективы в области биотехнологии и сельского хозяйства, делая возможным генно-инженерное конструирование сортов и видов растений, способных переносить температурные ограничения той или иной климатической зоны, а также организмов — продуцентов ЖК с заданной длиной цепи и фиксированным положением двойных связей.

## II. ТИПЫ ДЕСАТУРАЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Физические свойства липидов в мембранном бислое в большой степени определяются уровнем ненасыщенности их ЖК, т.е. количеством двойных связей, образуемых десатуразами [1, 124]. Десатуразы, в свою очередь, являются терминальным компонентом сложной цепи биохимических реакций, включающей в качестве электронных доноров цитохром  $b_5$  или ферредоксин, а также, соответственно, цитохром  $b_5$ -редуктазу [35, 85] или ферредоксин-NADP<sup>+</sup>-оксидоредуктазу [183, 185].

Десатуразы ЖК делят на три типа, в зависимости от переносчика субстрата. Ацил-КоА-десатуразы используют ЖК, присоединенные к коферменту А [51, 52-54, 85], ацил-АПБ-десатуразы — ЖК, связанные с ацил-переносящим белком (АПБ) [92]. И, наконец, ацил-липидные десатуразы используют в качестве субстрата ЖК, находящиеся в составе липидов [81, 106] (рис. 1, табл.1).

Для ацил-КоА-десатураз животных [85], донором электронов служит цитохром  $b_5$ , в то время как десатуразы цианобактерий [185], а также пластидные ацил-АПБ и ацил-липидные десатуразы растений [92] используют ферредоксин (рис. 1). Для реакции образования двойной связи необходимы два электрона. В растениях эти электроны предоставляют две различные системы, состоящие, по сути, из различных, но эквивалентных компонентов (рис. 2), одна из которых локализована в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), а другая в пластидах. Важно отметить, что компоненты электрон-переносящей цепи имеют специфическую внутриклеточную (ЭР или пластиды) локализацию независимо от того, является ли сама десатураза растворимой или мембраносвязанной. В этих цепях пары электронов

Таблица 1  
**Десатуразы жирных кислот из различных групп организмов**

Десатураза	Организм	Субстрат	Продукт	Источник
1	2	3	4	5
Δ5-	<i>Vacillus subtilis</i>	Фосфолипиды - 16:0/18:0	Фосфолипиды - 16:1/18:1	[2]
Ацил-липидная Δ9-	<i>Anabaena</i> <i>Spirulina</i> <i>Synechococcus</i> <i>Synechocystis</i>	Глицеролипиды/фосфолипиды/ сульфолипиды - 16:0/18:0 - "- - "-	Глицеролипиды/фосфолипиды/ сульфолипиды - 16:1/18:1	[24, 132, 134]
Ацил-липидная Δ6-	<i>Spirulina</i> <i>Synechocystis</i>	Глицеролипиды/фосфолипиды/ сульфолипиды - 18:2(3)	Глицеролипиды/фосфолипиды/ сульфолипиды - 18:3(4)	[24, 127]
Ацил-липидная Δ12-	<i>Anabaena</i> <i>Gloeobacter</i> <i>Spirulina</i> <i>Synechococcus</i> <i>Synechocystis</i>	Глицеролипиды/фосфолипиды/ сульфолипиды - 16:1/18:1 - "- - "- - "-	Глицеролипиды/фосфолипиды/ сульфолипиды - 16:2/18:2	[24, 72, 135, 184]
Ацил-липидная ω3-	<i>Synechococcus</i> <i>Synechocystis</i>	Глицеролипиды/фосфолипиды/ сульфолипиды - 18:2(3)	Глицеролипиды/фосфолипиды/ сульфолипиды - 18:3(4)	[132, 133]
Δ9-стеароил-АПБ-	<i>Arabidopsis</i> <i>Ricinus</i>	18:0-АПБ	18:1-АПБ	[146]
Δ9-пальмитоил-АПБ-	<i>Asclepias</i>	16:0-АПБ	16:1-АПБ	[13]
Δ9-миристоил-АПБ-	<i>Pelargonium</i>	14:0-АПБ	14:1-АПБ	[142]
Δ6-пальмитоил-АПБ-	<i>Thunbergia</i>	16:0-АПБ	16:1-АПБ	[14]
Δ4-пальмитоил-АПБ-	<i>Coriandrum</i>	16:0-АПБ	16:1-АПБ	[18]

см. продолжение табл. 1

окончание табл. 1				
1	2	3	4	5
Ацил-липидная Δ9-	<i>Rose</i>	Неизвестно	Не известно	[33, 34]
	<i>Arabidopsis</i>			
Микросомальная Δ12- Fad2	<i>Arabidopsis</i>	Фосфолипиды - 18:1	Фосфолипиды - 18:2	[118]
Пластидная Δ12- Fad6	<i>Spinach</i>	Пластидные глицеролипиды - 18:1	Пластидные глицеролипиды - 18:2	[27]
	<i>Arabidopsis</i>			
Микросомальная ω3- Fad3	<i>Arabidopsis</i>	Фосфолипиды - 18:2	Фосфолипиды - 18:3	[4]
Пластидная ω3- Fad7/Fad8	<i>Spinach</i>	Пластидные глицеролипиды - 18:2	Пластидные глицеролипиды - 18:3	[57]
	<i>Arabidopsis</i>			
Микросомальная Δ6- Cytochrome b5- fusion	<i>Borago</i>	Фосфолипиды - 18:2	Фосфолипиды - 18:3	[141]
	<i>Helianthus</i>	Неизвестно	Не известно	[58, 156]
	<i>Cyanidioschyzon</i>			
<b>Животные</b>				
Δ9-стеароил-КоА-	<i>Homo/Mouse</i>	18:0-КоА	18:1-КоА	[12, 89, 121, 167]
	<i>Rat</i>			
Δ5- ω3- (fat-1)	<i>Homo</i>	Фосфолипиды - 20:3	Фосфолипиды - 20:4	[77]
	<i>Saenorhabditis</i>	Фосфолипиды - 18:2(20:2)	Фосфолипиды - 18:3(20:2)	[186]
<b>Грибы/дрожжи</b>				
Δ9-стеароил-КоА-	<i>Saccharomyces</i>	18:0-КоА	18:1-КоА	[36, 93, 102, 137, 160, 188]
	<i>Histoplasma</i>			
	<i>Aspergillus</i>			
	<i>Cryptococcus</i>			
Микросомальная Δ5-	<i>Mortierella</i>	Фосфолипиды - 20:3	Фосфолипиды - 20:4	[73, 96, 131]
	<i>Dictyostelium</i>			
Микросомальная Δ6-	<i>Mortierella</i>	Фосфолипиды - 18:2	Фосфолипиды - 18:3	[138]
Микросомальная Δ12-	<i>Mortierella</i>	Фосфолипиды - 18:1	Фосфолипиды - 18:2	[136]



от NADPH или NADH одновременно переносятся на флавопротеин, который затем передает электроны по одному на следующий переносчик, способный переносить только по одному электрону (рис. 2). Пара восстановленных таким образом переносчиков передают электроны последовательно на десатуразу, которая осуществляет свою реакцию, требующую двух электронов.

Для растворимых и мембранных десатураз пластидной локализации донором электронов является NADPH, флавопротеином — ферредоксин-NADP<sup>+</sup> оксидоредуктаза и переносчиком электронов — 2Fe-2S ферредоксин [92]. Этот путь транспорта электронов характерен для десатурации в нефотосинтетических тканях растений или для фотосинтетических — в темноте. В фотосинтезирующих органах на свету электроны генерируются фотосистемой I и передаются на ферредоксин напрямую, минуя ферредоксин-NADP<sup>+</sup> оксидоредуктазу [92]. В ЭР восстанавливающими агентами являются NADH, цитохром  $b_5$  редуктаза в качестве флавопротеина и цитохром  $b_5$  [60] в качестве переносчика электронов к активному центру десатуразы (рис. 1).

Десатуразы цианобактерий относятся к типу ацил-липидных десатураз [81, 106]. В настоящее время клонированы гены четырех типов десатураз, специфически образующих двойные связи в положениях  $\Delta^6$  [24, 127],  $\Delta^9$  [133],  $\Delta^{12}$  [26, 135] и  $\omega^3$  [133, 134] цепей  $C_{18}$ -ЖК (см. табл. 1). Десатурация ЖК осуществляется в строгой последовательности: первая двойная связь образуется только в положении  $\Delta^9$ , вторая образуется в положении  $\Delta^{12}$  только в моноеновых ЖК, 16:1 $\Delta^9$  или 18:1 $\Delta^9$ ; дальнейшая десатурация осуществляется с использованием диеновых ЖК, преимущественно 18:2 $\Delta^9,12$ .

Специфичность десатурации может быть рассмотрена с двух позиций: 1) отношения к положению ЖК на глицериновой молекуле (*sn*-положение); 2) узнавания позиции десатурации в углеродной цепи ЖК. Глицеролипиды цианобактерий включают остатки двух ЖК в положениях *sn*-1 и *sn*-2 [49, 139, 140]. *Synechocystis* sp. PCC 6803 десатурирует  $C_{18}$ -ЖК преимущественно в положении *sn*-1.

Специфика образования двойных связей в цепях ЖК в *Synechocystis* sp. PCC 6803 была изучена путем добавления в среду для роста гептановой ( $C_{7:0}$ ), либо гексановой кислот ( $C_{6:0}$ ). Добавление  $C_{6:0}$  не изменяло жирнокислотный состав цианобактерии, а добавление  $C_{7:0}$  приводило к синтезу  $C_{15}$ ,  $C_{17}$  и  $C_{19}$  ЖК и их производных: 15:0, 15:1 $\Delta^9$ , 17:0, 17:1 $\Delta^9$ , 17:2 $\Delta^{6,9}$ , 17:2 $\Delta^{9,12}$ , 17:3 $\Delta^{6,9,12}$ , 17:3 $\Delta^{9,12,14}$  и 17:4 $\Delta^{6,9,12,14}$ , а также 19:0, 19:1 $\Delta^9$ , 19:2 $\Delta^{6,9}$ , 19:2 $\Delta^{9,12}$ , 19:3 $\Delta^{6,9,12}$ , 17:3 $\Delta^{9,12,16}$  и 19:4 $\Delta^{6,9,12,16}$  [49]. Эти данные показывают, что четвертая двойная связь образуется в  $\omega$ -положении, т.е. “отсчет” положения десатурации происходит от метиль-

ного конца. Поэтому положение двойной связи  $\Delta^{15}$  в  $C_{18}$ -ЖК, вероятно следует обозначать как  $\omega^3$ , а соответствующий фермент называть  $\omega^3$ -десатуразой [49]. В дальнейшем будут использованы именно эти обозначения.

*Десатуразы высших растений* по механизму действия делятся на ацил-АПБ- и ацил-липидные десатуразы, отличающиеся между собой по структуре и свойствам (см. табл. 1). Данные генетического анализа показывают, что в клетках растений присутствует несколько типов  $\Delta^9$ -десатураз [11, 101]. Известно, что образование олеиновой кислоты ( $18:1^{\Delta^9}$ ) происходит только в строме хлоропластов [153, 154, 161, 162, 164]. Олеиновая кислота, связанная с АПБ, может транспортироваться в мембраны как хлоропластов, так и ЭР для последующей десатурации в липид-связанной форме [129, 151, 152, 162, 165]. Впоследствии липиды, содержащие ПНЖК, транспортируются в плазмалемму [4, 9]. Считается, что плазмалемма не имеет собственных десатураз для образования ПНЖК [52]. Однако последние данные по клонированию генов десатураз и локализации этих ферментов делают необходимым пересмотр сложившихся представлений о местах биосинтеза полиненасыщенных ЖК в клетках растений. Так, в эндосперме семян *Thunbergia alata* была обнаружена активность растворимой  $\Delta^6$ -ацил-АПБ-десатуразы [14]. Клонирование соответствующего гена показало, что его продукт гомологичен другим известным растворимым ацил-АПБ-десатуразам растений:  $\Delta^9$ -(18:0) из *Spinacia oleracea*, *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa* и  $\Delta^4$ -(16:0) — из *Coriandrum sativum*. Это свидетельствует о том, что образование первой двойной связи в ЖК некоторых высших растений может происходить не только в положении  $\Delta^9$ , как у цианобактерий, но и в положениях  $\Delta^4$  и  $\Delta^6$  (см. табл. 1) [14, 15, 18, 142].

Из лепестков розы и семян *Arabidopsis* были клонированы гены ацил-липидных  $\Delta^9$ -десатураз непластидной локализации (табл. 1) [33, 34], что говорит о возможности десатурации ЖК в мембранах клеток растений без обязательного участия ацил-АПБ-десатураз.

*Десатуразы животных и дрожжей* относятся к классу ацил-КоА-десатураз [70, 85, 110, 111] и обычно состоят из 300–350 остатков аминокислот. Они образуют двойные связи в цепях ЖК, связанных с КоА. В отличие от растворимых  $\Delta^9$ -ацил-АПБ-десатураз растений,  $\Delta^9$ -,  $\Delta^5$ -,  $\Delta^6$ - и  $\omega^3$ -десатуразы животных являются гидрофобными мембранными белками, сходными по своим свойствам с ацил-липидными десатуразами цианобактерий [62, 184]. Особенностью  $\Delta^9$ -стеариол-КоА-десатуразы дрожжей является ее необычно длинная аминокислотная последовательность (510 ак) [102] за счет удлинения карбоксильного конца. Структурный анализ полипептида показал,



что карбоксильный конец этой десатуразы гомологичен цитохрому  $b_5$ . Таким образом, этот фермент состоит из двух доменов — собственно десатуразы и “сшитой” с ней структурной части цитохрома  $b_5$  [3, 94, 102]. Такую же структуру имеет  $\Delta 9$ -десатураза красной водоросли *Cyanidioschyzon merolae* [58]. Подобная доменная организация белка была недавно обнаружена у ацил-липидной  $\Delta 6$ -десатуразы из подсолнечника [141], однако в последнем случае последовательность, структурно и функционально родственная цитохрому  $b_5$ , была расположена в N-концевом участке.

### III. СТРУКТУРА ДЕСАТУРАЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Предполагается, что активные десатуразы связывают два атома трехвалентного железа, которые формируют активный комплекс с атомом кислорода: Fe-O-Fe [30,31] (рис. 3, А, Б). Этот комплекс способен разрывать неактивированные -С-Н- связи, приводя, в конечном итоге, к образованию двойных связей -С=С- в цепях ЖК (рис. 3, В).

Структура активного центра была определена только для рекомбинантной растворимой  $\Delta 9$ -стеароил-(18:0)-АПБ-десатуразы (ЕС 1.14.99.6) [78, 145]. Кристаллизация десатуразы показала, что функциональный фермент состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых связывает два атома железа в активном центре. Один из атомов железа взаимодействует с глутаминовой кислотой E196 и гистидином H232. Второй атом железа также связан с глутаминовой кислотой и гистидином, E105 и H146, соответственно [78]. Кроме того, два дополнительных остатка глутаминовой кислоты, E143 и E229, находятся рядом с атомами железа и, в свою очередь, могут участвовать в формировании активного центра десатуразы (рис. 3, Б). Структурный анализ этого белка выявил наличие глубокого канала, уходящего от поверхности вглубь кристаллической структуры. Видимо, этот канал является местом расположения стеарата (рис. 4). Этот канал формирует изгиб на ацильной цепи в месте десатурации, между углеродными атомами 9 и 10. Такая конформация соответствует цис-положению двойной связи в молекуле олеоил-(18:1<sup>Δ9</sup>)-АПБ и обеспечивает расположение сайта десатурации рядом с активными атомами железа. При этом необходимо иметь в виду, что каждая субъединица димера, по-видимому, обладает независимой ферментативной активностью [78, 145]. Таким образом, конфигурация канала связывания жирнокислотной цепи и расположение каталитического сайта в этом канале определяют и специфичность десатуразы по отношению к субстрату (длина цепи ЖК), и положение, в котором образуется двойная связь [16, 78].

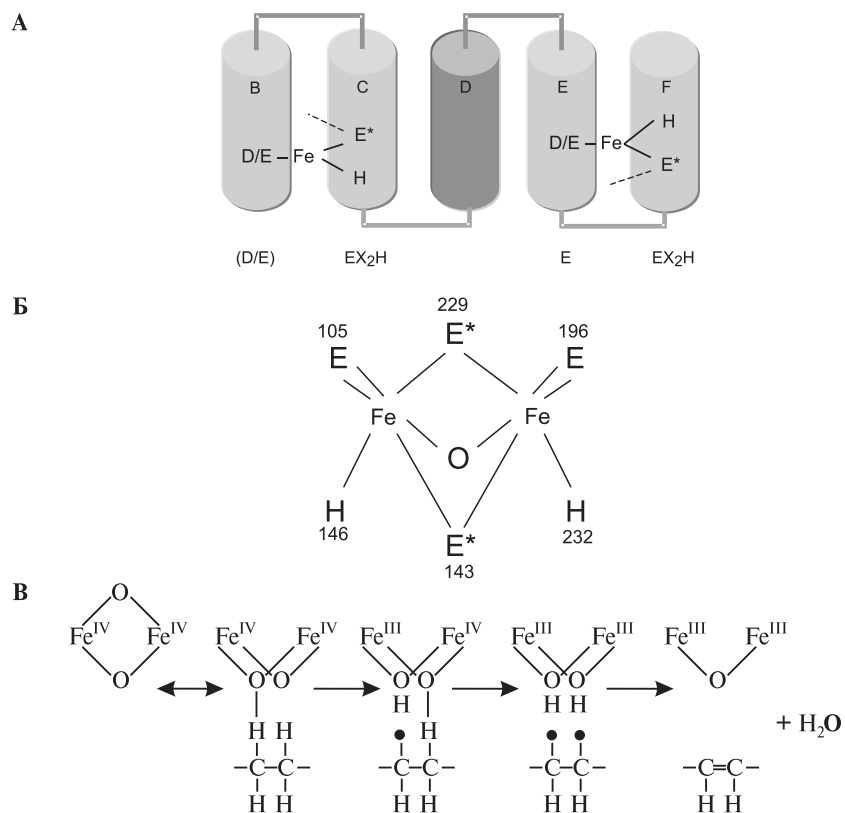


Рис. 3. Организация железосодержащих кластеров в ацил-АПБ-десатуразе.

А. Расположение кластеров по отношению к спиральным участкам белка. Вращение относительно спирали D формирует четырех-доменную структуру, в которой атомы железа оказываются друг над другом.

Б. Схема железосвязывающего центра десатуразы. Остатки глутамата (E\*), координирующие положение обоих атомов железа в активном центре, отмечены звездочками.

В. Предполагаемый путь десатурации ЖК.

Применение сайт-направленного мутагенеза позволило определить специфические аминокислотные остатки в активном центре десатураз, отвечающие за место десатурации. Так, замещение аминокислот в активном центре  $\Delta 6$ -пальмитоил-(16:0)-АПБ-десатуразы на аналогичные аминокислоты  $\Delta 9$ -стеароил-(18:0)-АПБ-десатуразы привело к изменению специфичности рекомбинантного фермента в отношении как длины узнаваемого субстрата, так и пози-



аминокислот (A188G/Y189F) приводили к тому, что десатураза узнавала в равной степени 16:0- и 18:0-АПБ, образуя двойную связь на этих субстратах в положении  $\Delta 6$  (рис. 5). Мутации шести аминокислот (A181T/A177G//Y189F/S205N/L206T/G207A) приводили к частичной утрате специфичности фермента к субстрату и, кроме того, к появлению  $\Delta 9$ -десатуразной активности. И, наконец, мутации пяти аминокислот (A181T/A200F/S205N/L206T/G207A), четыре из которых повторяли предыдущие мутации, приводили к полному превращению активности фермента из  $\Delta 6$ -16:0-АПБ-десатуразы в  $\Delta 9$ -(18:0)-АПБ-десатуразу (рис. 5).

Основа изменений специфичности десатуразы, видимо, обусловлена геометрией субстрат-связывающего канала. Так, например, фермент A188G/Y189F, в котором аланин и тирозин заменены на меньшие по размеру аминокислоты глицин и фенилаланин, имеет удлиненный канал, способный «принять» ЖК на два углеродных атома больше, чем фермент дикого типа. В результате мутантный фермент осуществляет десатурацию 16:0 и 18:0 с одинаковой эффективностью.

Эти данные важны для понимания как механизма биохимической реакции, так и способа узнавания ферментом специфического положения десатурации. Хотя кристаллизованный белок относится к растворимым ацил-АПБ-десатуразам, полученные результаты могут быть использованы для более точного предсказания положения активных центров в ацил-липидных десатуразах. При этом необходимо иметь в виду, что активные центры последних скорее всего расположены в гидрофобных участках белков [81, 135], поскольку все ацил-липидные десатуразы являются мембранными белками с четырьмя выраженными гидрофобными доменами, пронизывающими мембраны. По-видимому, в ацил-липидных десатуразах в связывании атомов железа принимают участие аминокислотные остатки гистидинов, а не глутаминовой кислоты.

Важной общей особенностью первичной структуры ацил-липидных десатураз является наличие постоянного мотива в их аминокислотных последовательностях — трех консервативных гистидиновых кластеров (табл. 2), предположительно участвующих в связывании атомов железа в активном центре десатуразы [5, 81, 135, 147]. Сайт-направленный мутагенез стеароил-КоА-десатуразы из печени крысы [147] и  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 [5] показал, что замещение консервативных гистидинов какой-либо другой аминокислотой приводит к полной потере десатуразной активности. Вероятно, это происходит из-за неспособности мутантного фермента сформировать активный центр для связывания атомов железа [147] и присоединения необходимого для реакции атома

Таблица 2  
**Консервативные гистидиновые кластеры  
 ацил-КоА- и ацил-липидных десатураз**

Десатураза, организм	Гистидиновый кластер			Источник
<i>Δ9 ацил-КоА</i> животные, грибы	НххххН	НххНН	ЕххНххНН	[93, 110, 159, 173]
<i>Δ9 ацил-липидные</i> цианобактерии	НххххН	ЕххххНН	ЕГВННННН	[72, 132, 134]
высшие растения	НххххН	ЕххххНН	ЕГВННННН	[33, 34]
<i>Δ12 ацил-липидные</i> цианобактерии	НДСГН	НхххххНххНН	НххНН	[135]
высшие растения	НхСГН	ЕхххххНххНН	НххНН	[27, 50, 118]
<i>ω3 ацил-липидные</i> цианобактерии	НДСГН	НхххххННННН	ННххххННВАНН	[132, 133]
высшие растения	НДСГН	НхххххННННН	ННххххННННН	[32, 37, 41, 43, 74, 37]
<i>Δ6 ацил-липидные</i> цианобактерии	НДхНН	НхххНН	QхххНН	[127]
высшие растения	НДхГН	НхххНН	QхххНН	[141]

кислорода [5]. Замещение «неконсервативных» гистидинов к потере активности не приводило.

Особый интерес вызывает эволюционное родство ферментов, отвечающих за десатурацию ЖК, гидроксилирование, ацетиленирование и эпоксидацию [145]. Так, аминокислотная последовательность олеил-гидроксилазы *Lesquerella fendlerii* на 81% гомологична олеил-десатуразе *Arabidopsis*, относящемуся к тому же семейству. Все ферменты, отвечающие за вышеперечисленные реакции, как и ацил-липидные десатуразы, являются интегральными белками, имеют два атома железа в активном центре и, предположительно, могут проявлять свою активность способом, описанным выше для десатураз ЖК. Экспериментальные данные, подтверждающие это предположение, получены на примере растительной олеил-Δ12-десатуразы, активность которой была конвертирована в гидроксилазную путем точечного мутагенеза шести аминокислотных остатков или наоборот, когда гидроксилаза была превращена в десатуразу [8]. Предполагается, что первый этап реакций десатурации и гидроксилирования (отрыв водородного атома в положении C<sub>12</sub>) является универсальным для обоих типов ферментов. Дальнейшие расхождения биохимических

путей, один из которых приводит к отрыву второго атома водорода, а второй — к переносу кислорода, определяется целиком геометрией активного сайта, так же как и узнавание специфического положения образования двойной связи [8, 16].

#### IV. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ДЕСАТУРАЗ

Изучение условий, в которых индуцируются и экспрессируются гены десатураз, важно для понимания механизмов адаптации биологических мембран и организмов в целом. Липидный состав мембран, а также степень ненасыщенности ЖК варьируют в широких пределах при изменении температуры, интенсивности освещения, диеты, концентрации осмотических веществ и солей [70, 71, 81, 100, 115–117].

Включение в питательную среду для культивирования *Saccharomyces cerevisiae* насыщенных ЖК приводило к возрастанию десатуразной активности [61, 95]. Напротив, при насыщении этой среды моноеновыми ЖК, 16:1<sup>Δ9</sup> или 18:1<sup>Δ9</sup>, активность стеароил-КоА-десатуразы снижалась, а содержание мембранных фосфолипидов увеличивалось. Гибридизация РНК с геном стеароил-КоА-десатуразы показала, что снижение активности этого фермента связано с репрессией транскрипции [7]. Репрессию гена вызывало и добавление в среду линолевой кислоты, 18:2<sup>Δ9,12</sup>, которая не синтезируется *Saccharomyces*, но, тем не менее, быстро замещает нативные 16:1<sup>Δ9</sup> и 18:1<sup>Δ9</sup> в мембранных липидах [159, 160]. Действие этих экзогенных ненасыщенных ЖК на Δ9-десатуразу дрожжей очень специфично, поскольку добавление других ЖК, таких как 17:1<sup>Δ10</sup>, 18:1<sup>Δ5</sup> или 18:1<sup>Δ11</sup>, не влияло на транскрипцию соответствующего гена и активность его промотора, хотя эти ЖК эффективно встраивались в мембранные липиды [159, 171]. Таким образом, была установлена регуляторная связь между экспрессией гена десатуразы и уровнем мононенасыщенных ЖК.

Изучение регуляции экспрессии генов десатураз необходимо еще и потому, что продукты десатуразной реакции — ненасыщенные ЖК — не только регулируют десатуразы посредством обратной связи, но и способны контролировать экспрессию других белков, как структурных, так и регуляторных. Это, например, относится к участникам многокомпонентной системы каскадной регуляции дифференцировки клеток [87]. Так, добавление олеата (18:1<sup>Δ9</sup>) в культуру клеток преадипоцитов стимулировало транскрипцию фактора Fra1, одного из регуляторов гена P2-адипоцита, который принадлежит к семейству генов, определяющих синтез липидных переносчиков и белков, связывающих ЖК в клетках почек, желудка, печени и сердца [25].

В клетках растений и цианобактерий десатуразы играют важную роль в адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды [81, 82, 106]. Клонирование генов десатураз из этих объектов в последние годы сделало возможным изучение их экспрессии и роли ЖК в процессах адаптации. Наиболее полно изучена экспрессия генов десатураз ЖК цианобактерий.

*Экспрессия генов десатураз цианобактерий.* На рис. 6 приведена схема последовательности десатурации ЖК у *Synechocystis* sp. PCC 6803 с указанием ЖК, и соответствующих генов десатураз. Ген *desC*, кодирующий  $\Delta 9$ -десатуразу, превращает стеарат в олеат; ген *desA*, кодирующий  $\Delta 12$ -десатуразу, образует из олеата линолеовую кислоту и т.д.  $\Delta 6$ -десатураза (*desD*) преимущественно использует линолеовую кислоту в качестве субстрата, однако в случае мутации гена *desA* возможно образование минорных количеств  $18:2^{\Delta 6,9}$  [40]. Образование ПНЖК, имеющих двойную связь в положении  $\omega 3$ , происходит в клетках *Synechocystis* только при низких температурах [82, 133].

Адаптивное изменение жирнокислотного состава мембранных липидов цианобактерий под действием низких температур известно давно и интенсивно изучается. Однако, вопрос о молекулярных механизмах этого процесса до последнего времени оставался открытым. Существовало несколько гипотез, объясняющих накопление ПНЖК. Так, считалось, что низкие температуры могут вызывать повышение активности пресинтезированных десатураз [64, 65, 150]. Альгернативная схема предполагала, что при снижении температуры замедляется синтез насыщенных ЖК *de novo*, в то время как активность десатураз остается без изменения, в результате чего соотношение насыщенных и ПНЖК изменяется в пользу последних [28]. Имелись

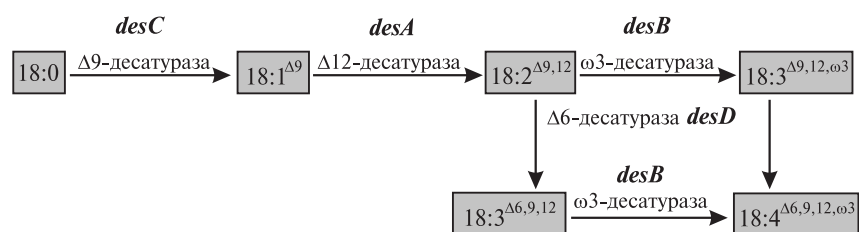


Рис. 6. Общая схема десатурации жирных кислот ацил-липидными десатуразами в цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803.

*desA*, *desB*, *desC*, *desD* — названия генов, кодирующих указанные на рисунке десатуразы. Названия генов основаны на сокращении *des* (*desaturase*). Буквенные обозначения (*A*, *B*, *C*, *D*) приняты по хронологии клонирования соответствующих генов.

также данные о подавлении десатурации рифампицином и хлорамфениколом — ингибиторами транскрипции и трансляции у прокариот [139, 184], что предполагало синтез самих десатураз *de novo* при низких температурах.

Клонирование генов десатураз ЖК и изучение их температурозависимой экспрессии показало, что при снижении температуры с 36–34 °С до 25–22 °С у *Synechocystis* происходит быстрое накопление мРНК генов *desA*, *desD* и *desB*, кодирующих Δ<sup>12</sup>-, Δ<sup>6</sup>- и ω<sup>3</sup>-десатуразы, соответственно [80, 82, 83] (рис. 7). При повышении температуры с 22 °С до 34 °С количество мРНК этих десатураз снижается до исходного уровня. Количество мРНК гена Δ<sup>9</sup>-десатуразы практически не зависит от температуры, что позволяет говорить о конститутивной экспрессии этого гена [83]. Высокий уровень транскрипта *desC* в клетках свидетельствует об избыточном количестве мРНК, которое может быть использовано для трансляции. Последнее наблюдение соответствует данным, согласно которым синтез Δ<sup>9</sup>-десатуразы в других организмах происходит очень интенсивно, а образование первой двойной связи в ЖК играет наиболее важную роль в изменении физических свойств мембранных липидов [105, 106]. Кроме того, Δ<sup>9</sup>-десатураза обеспечивает субстратом десатуразы, последовательно образующие вторую (положение Δ<sup>12</sup>), третью (Δ<sup>6</sup> или ω<sup>3</sup>) и четвертую (ω<sup>3</sup>) двойные связи (см. рис. 5).

Накопление мРНК генов тех десатураз, которые отвечают за синтез ПНЖК, говорит о том, что активация десатурации при снижении температуры является результатом индукции транскрипции этих генов. Это предположение было подтверждено в экспериментах по экспрессии репортерных конструкций: промоторы генов Δ<sup>12</sup>- и ω<sup>3</sup>-десатураз были «слиты» с каскадой генов, кодирующих люциферазу *Vibrio harveyi*, и введены в *Synechocystis*. При снижении темпе-

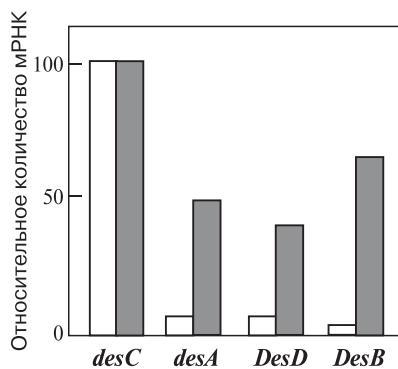


Рис. 7. Температурозависимые изменения количества мРНК четырех генов *Synechocystis*, кодирующих десатуразы ЖК.

Открытые колонки представляют мРНК из клеток, выращенных при нормальной температуре (34 °С), темные колонки показывают мРНК из клеток, выращенных при 34 °С и затем инкубированных при 22 °С в течение 1 ч. Количество мРНК гена *desC* при 34 °С принято за 100%. Гены *desC*, *desA*, *desD* и *desB* кодируют, соответственно, Δ<sup>9</sup>-, Δ<sup>12</sup>-, Δ<sup>6</sup>- и ω<sup>3</sup>-десатуразы.



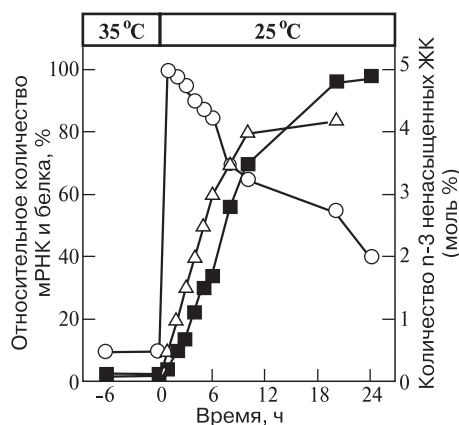
ратуры люминесценция возрастала, что свидетельствует об активации промоторов десатуразных генов [83]. Вместе с тем, при снижении температуры наблюдали увеличение времени жизни мРНК температурозависимых десатураз [83]. Таким образом, накопление транскриптов генов  $\Delta 6$ -,  $\Delta 12$ - и  $\omega 3$ -десатураз связано как с усилением транскрипции, так и с увеличением стабильности мРНК.

Температурозависимые изменения количества десатураз в клетках были впервые исследованы методом вестерн-блоттинга с использованием высоко специфичных антител, полученных против синтетических олигопептидов, которые соответствуют карбоксильным концам четырех индивидуальных десатураз *Synechocystis* [83, 109]. Блоттинг мембранных белков из клеток, выращенных при 36 °С, и из клеток, инкубированных при 25 °С, показал, что количество  $\Delta 9$ -десатуразы при снижении температуры не изменяется. Постоянный уровень белка соответствует ранее полученным данным о конститутивной транскрипции гена *desC*, кодирующего  $\Delta 9$ -десатуразу и еще раз подтверждает независимость экспрессии этого белка от изменения температуры. Как и предполагалось, при снижении температуры в мембранах цианобактерии наблюдается накопление  $\Delta 12$ -,  $\Delta 6$ - и  $\omega 3$ -десатураз. Увеличение количества этих белков заметно уже через два часа после изменения температуры и далее наблюдается накопление ПНЖК (рис. 8). Эти данные совпадают с результатами анализа накопления мРНК и активности промоторов десатуразных генов.

Определение температурной зависимости активности  $\Delta 12$ -десатуразы *in vitro* показало, что оптимум активности фермента лежит в области 30–35 °С (что соответствует оптимальной температуре роста цианобактерии), и активность уменьшается при понижении темпе-

Рис. 8. Изменения количества мРНК гена *desB*, продукта гена —  $\omega 3$ -десатуразы, и  $\omega 3$ -ненасыщенных ЖК в клетках *Synechocystis* во время снижения температуры с 35 до 25 °С.

О—О, мРНК *desB*;  $\Delta$ — $\Delta$ ,  $\omega 3$ -десатураза и  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ,  $\omega 3$ -ненасыщенные ЖК (сумма  $\alpha$ -18:3 и 18:4 относительно общего количества ЖК).



ратуры [120]. Эти данные исключают предположение о существовании отрицательного коэффициента активности десатураз при снижении температуры окружающей среды.

Таким образом, индукция синтеза ПНЖК при снижении температуры обусловлена активацией экспрессии генов десатураз ЖК, включающей усиление транскрипции генов и, как следствие, повышенный уровень синтеза соответствующих белков.

*Экспрессия генов десатураз высших растений* изучена менее подробно, чем у цианобактерий. Это связано, прежде всего, с методическими трудностями анализа экспрессии генов у высших растений и со значительно более сложными механизмами регуляции в эукариотических клетках. Известно, что ген стеароил-АПБ-десатуразы подвержен временной и тканеспецифичной регуляции: промотор этого гена наиболее активен в быстроразвивающихся лепестках и проростках. Показано также, что активность этого промотора индуцируется при повышении концентрации АБК [153, 154]. Уровень мРНК гена *fad2* из *Arabidopsis thaliana*, кодирующего  $\Delta 12$ -десатуразу цитоплазматической мембраны, не реагирует на снижение температуры [27, 118]. Недавно были клонированы родственные гены *fad2-1* и *fad2-2* из соевых бобов, кодирующие две формы  $\Delta 12$ -десатуразы [48]. Авторы считают, что это десатуразы ЭР, хотя возможно, что ферменты локализованы в цитоплазматической мембране, как и в случае с Fad2 из *A. thaliana*. Одна из этих десатураз, Fad2-1, экспрессируется интенсивно только в созревающих семенах, в то время как Fad2-2 экспрессируется конститутивно как в вегетативных тканях, так и в семенах. Возможно, что именно Fad2-1 отвечает за образование ПНЖК в запасных липидах растений [48].

Промотор гена *fad7* из *A. thaliana*, кодирующего одну из  $\omega 3$ -десатураз хлоропластов, включает последовательности нуклеотидов, гомологичные известным цис-элементам светорегулируемых генов (бокс П и G-бокс). Этот промотор индуцируется на свету, но не при снижении температуры [43, 57, 113, 114]. Напротив, ген *fad8* активируется низкими температурами, но не является светозависимым [37].

## V. РОЛЬ ДЕСАТУРАЗ В АДАПТАЦИИ

Значение ПНЖК в адаптации организмов к изменяющимся условиям окружающей среды рассматривалось многократно [20, 81, 82, 85, 106, 112]. Изучение роли индивидуальных десатураз в адаптации к низким температурам стало возможным благодаря данным о структуре их генов и возможности генетического и генно-инженерного подходов к манипуляции этими генами в клетках цианобактерий.

Путем направленного мутагенеза была получена серия мутантов, дефектных по одной или сразу нескольким десатуразам [169]. Введение в различные организмы генов десатураз дало возможность получить штаммы с измененным составом ЖК [38, 39, 133, 134, 184]. Таким образом, была открыта перспектива в исследовании роли индивидуальных десатураз и продуктов их реакции в процессах адаптации биологических систем к стрессовым воздействиям окружающей среды.

Мутанты, дефектные по десатуразам ЖК, ведут себя по-разному при снижении температуры, в зависимости от характера мутации. Так, нарушение генов  $\Delta 6$ - и  $\omega 3$ -десатураз не влияет на устойчивость цианобактерий к низким температурам. Несмотря на индукцию генов этих ферментов в диком типе и накопление  $\alpha$ -линоленовой и  $\gamma$ -линоленовой кислот ( $18:3^{\Delta 9,12,\omega 3}$  и  $18:3^{\Delta 6,9,12}$ ), а также  $18:4^{\Delta 6,9,12,\omega 3}$ , активность этих десатураз не является критическим фактором для выживания организма. В то же время, нарушение гена  $\Delta 12$ -десатуразы снижает холодостойкость [169, 184]. На рис. 9А показано изменение состава ЖК *Synechocystis* в результате направленного мутагенеза генов *desA*<sup>\*</sup> и *desD*<sup>\*</sup>, кодирующих  $\Delta 12$ - и  $\Delta 6$ -десатуразы. Клетки *Synechocystis* дикого типа способны к синтезу ПНЖК, в то время как клетки мутанта *desA*<sup>-</sup>/*desD*<sup>-</sup> синтезируют лишь мононенасыщенные ЖК. При 30 °С рост штамма *Synechocystis desA*<sup>-</sup>/*desD*<sup>-</sup> происходит как у клеток дикого типа. Однако при 25 °С рост мутанта сильно подавлен, а при 20 °С его клетки погибают, в отличие от клеток дикого типа, способных к адаптации и росту при указанных температурах (рис. 9, Б). Кроме того, мутантные клетки теряли способность восстанавливать активность фотосинтетического аппарата после низкотемпературного фотоингибирования [68]. Причина потери способности фотосистемы II адаптироваться к высоким интенсивностям света заключается в том, что мутантные клетки с измененными свойствами мембранных липидов не способны процессировать предшественник основного белка (D1) реакционного центра фотосистемы [68]. Поскольку у этих мутантов нарушены гены, кодирующие строго определенные десатуразы ЖК, можно утверждать, что способность клеток выживать при низких температурах в значительной степени определяется наличием именно этих генов и способностью клеток синтезировать диеновые (18:2) ЖК. Это утверждение подкрепляется данными по трансформации *Synechococcus* sp. PCC 7942 с помощью гена *desA*. Клетки *Synechococcus*, получившие возможность синтезировать диеновые ЖК, оказались способными, в отличие от дикого типа, расти при 20–22 °С [184].

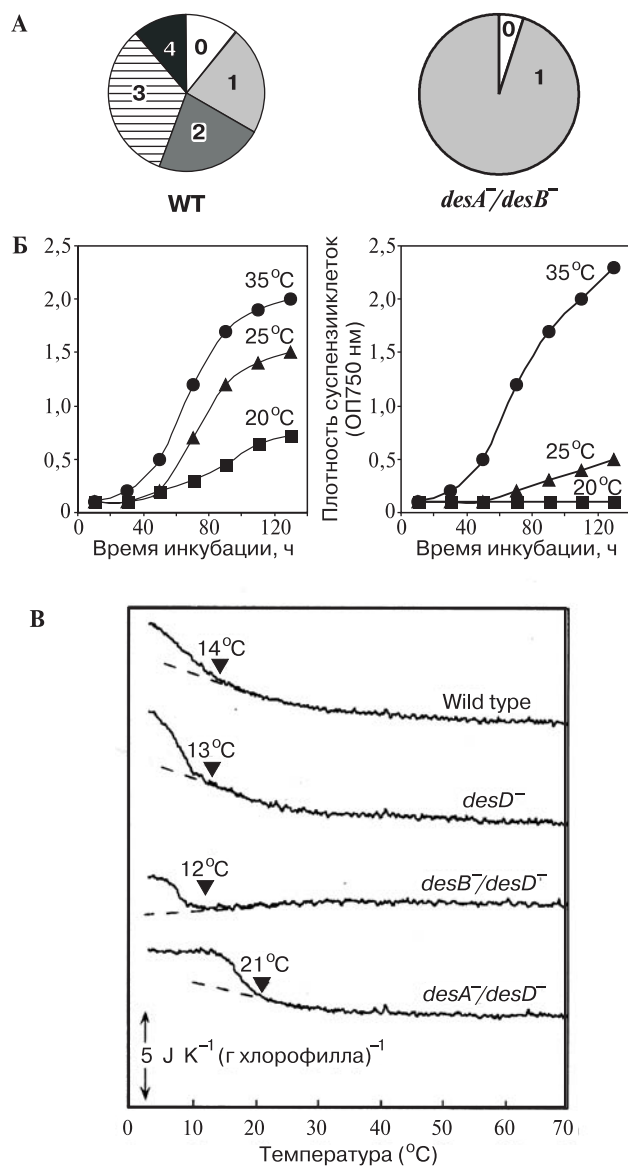


Рис. 9. Состав ЖК в глицеролипидах *Synechocystis*, выращенных при 25 °С (А), кривые роста клеток дикого типа (WT) и мутанта (*desA<sup>-</sup>/desD<sup>-</sup>*) при разных температурах (Б) и физические параметры мембран клеток дикого типа и различных мутантов, оцененные с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (В). 0, 1, 2, 3, 4 — насыщенные ЖК и ЖК с 1, 2, 3 и 4 двойными связями.

У высших растений устойчивость к низким температурам также коррелирует с наличием в мембранах ПНЖК [155]. Так, у *A. thaliana* мутанты по генам *fad5* и *fad6* (дефектные по синтезу хлоропластных *sn*-2-пальмитолеил- $\Delta$ 12 и *sn*-1-олеоил- $\Delta$ 12-десатуразы, соответственно), характеризуются хлорозом листьев, замедлением роста и изменением формы хлоропластов при низких температурах. У мутанта по гену *fad2* при 16 °C снижается скорость удлинения стебля, а при 6 °C он погибает [10, 90, 101]. Экспрессия *Fad7* десатуразы *A. thaliana* в *Nicotiana tabacum* приводит к повышению устойчивости семян табака к низким температурам [42, 104]. В то же время, блокирование экспрессии *Fad7* и синтеза триеновых ЖК в хлоропластах позволяло растениям легче адаптироваться к повышенным температурам [104].

**Физические свойства мембран.** Как отмечалось выше, чувствительность организмов к холоду связывают со снижением текучести биологических мембран. Однако зависимость между степенью ненасыщенности ЖК, активностью генов специфических десатураз и изменением текучести мембран до недавнего времени оставалась экспериментально недоказанной. Чтобы продемонстрировать эту зависимость, был использован метод дифференциальной сканирующей калориметрии изолированных тилакоидных мембран (ТМ) из штаммов *Synechocystis* sp. PCC 6803, дефектных по разным десатуразам ЖК [169]. Фазовые переходы в ТМ клеток дикого типа *Synechocystis* и мутантов *desD*<sup>-</sup> и *desB*<sup>-</sup>/*desD*<sup>-</sup> (дефектных по  $\Delta$ 6-десатуразе, или  $\Delta$ 6- и  $\omega$ 3-десатуразам одновременно) происходят при 15, 13 и 12 °C, соответственно. Таким образом, отсутствие в мембранных липидах  $\gamma$ -линоленовой и  $\alpha$ -линоленовой кислот практически не влияет на физические свойства мембран. В то же время у мутанта *desA*<sup>-</sup>/*desD*<sup>-</sup> фазовый переход начинается уже при 21 °C (рис. 9, В). Таким образом, наличие в мембранных липидах *Synechocystis* линолевой кислоты является критическим для формирования характерной для организма структуры мембраны. Нарушение функции соответствующих десатураз приводит к сильным изменениям физических свойств мембран, выражающимся в смещении точки фазового перехода в область более высоких температур. Возможно, с этим связаны все фенотипические проявления мутантов по десатуразам ЖК, в частности, чувствительность к низким температурам мутанта *desA*<sup>-</sup>/*desD*<sup>-</sup>.

## VI. ТЕКУЧЕСТЬ МЕМБРАН И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ДЕСАТУРАЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ: ОБРАТНАЯ СВЯЗЬ

Термин «текучесть мембран» (в противоположность «вязкости») широко применяется для описания степени неупорядоченности или молекулярной подвижности внутри липидного бислоя [1, 88]. Однако, ни один термин не охватывает всех, очень разных динамических характеристик липидного бислоя, таких как латеральная диффузия молекул, молекулярная подвижность, вращение цепей ЖК и т.д. Тем не менее, текучесть мембран может быть оценена различными физическими методами – флуоресцентной поляризацией, электронным парамагнитным резонансом и инфракрасной Фурье-спектроскопией [69, 86, 91, 124, 157].

*Модель молекулярного механизма адаптации клеток к низким температурам.* Аспекты молекулярных механизмов регуляции экспрессии десатуразных генов связаны с общими проблемами регуляции экспрессии генов при стрессовых воздействиях: каким образом организм чувствует изменение температуры и каким образом этот сигнал передается на регуляторные области генов, приводя к их активации или репрессии. Данные, изложенные в предыдущих разделах, позволяют схематично обобщить представления о молекулярном механизме адаптации клеток к понижающимся температурам (рис. 10). При снижении температуры уменьшается текучесть мембран. Организм чувствует это изменение. Вопрос о сенсорах остается открытым, и мы показываем этот этап на рисунке знаком вопроса. Далее сигнал от сенсора передается к пока неизвестным регуляторным молекулам или непосредственно воспринимается регуляторными последовательностями генов десатураз. Вследствие этого индуцируется экспрессия этих генов, что приводит к усиленному синтезу

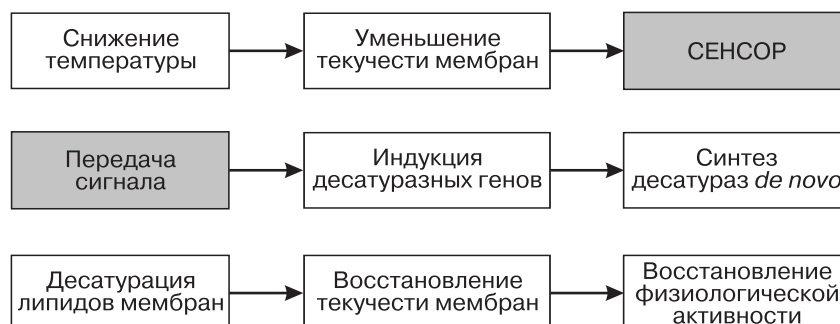


Рис. 10. Схема адаптации клетки к понижению температуры.

десатураз в клетке и к ускорению синтеза полиненасыщенных ЖК в мембранных липидах. В конечном итоге восстанавливаются исходная текучесть мембран и физиологическая активность связанных с ними систем, в частности, фотосистем и АТФ-синтезирующих комплексов.

В этой модели ведущая роль в запуске адаптационных механизмов отводится мембранам и их физическому состоянию, выражаемому вязкостью или текучестью, зависящих от степени ненасыщенности ЖК в мембранных липидах. Свойства биологических мембран можно рассматривать с двух позиций. С одной стороны, мембрану можно представить как макросистему, реагирующую на воздействия окружающей среды как единое целое. С другой стороны, мембраны можно рассматривать как совокупность интегрированных подсистем, состоящих из индивидуальных классов липидов со специфическим набором ЖК, а также из многих белковых комплексов, по-разному взаимодействующих со своим микроокружением. Здесь мы рассматриваем макропараметры мембраны, такие как состав ЖК и фазовые переходы.

*Текучесть мембран и экспрессия генов температурного стресса.* Если экспрессия генов десатураз действительно индуцируется при изменении жирнокислотного состава мембранных липидов или текучести мембран, то индукцию этих генов можно вызвать и искусственным путем, снизив концентрацию ненасыщенных ЖК и уменьшив тем самым текучесть мембран. Для этой цели был использован метод каталитической гидрогенизации ЖК мембранных липидов в клетках *Synechocystis*, выращенных при 36 °С. Этот метод широко используется в различных модельных клеточных системах, включая прокариотические и эукариотические организмы [6, 66, 79, 119, 124, 174, 178, 179], поскольку техника гомогенной каталитической гидрогенизации позволяет осуществить контролируемое насыщение двойных связей в цепях ЖК мембранных липидов.

Каталитическая гидрогенизация практически не затронула тилакоидные мембраны и коснулась лишь липидов цитоплазматической мембраны. При этом уровень стеариновой кислоты увеличивался, в то время как уровень линолевой кислоты пропорционально снижался. Определение жирнокислотного состава в индивидуальных классах липидов показало, что наиболее подверженным насыщению двойных связей при гидрогенизации оказался фосфатидилглицерин, составляющий не более 10% от общего количества глицеролипидов [180].

Исходя из схемы, приведенной на рис. 10, можно предположить, что в ответ на снижение текучести мембран произойдет индукция генов десатураз, активность которых необходима для возвращения физических параметров мембраны в нормальное состояние. Действительно, после гидрогенизации наблюдается индукция транскрипции

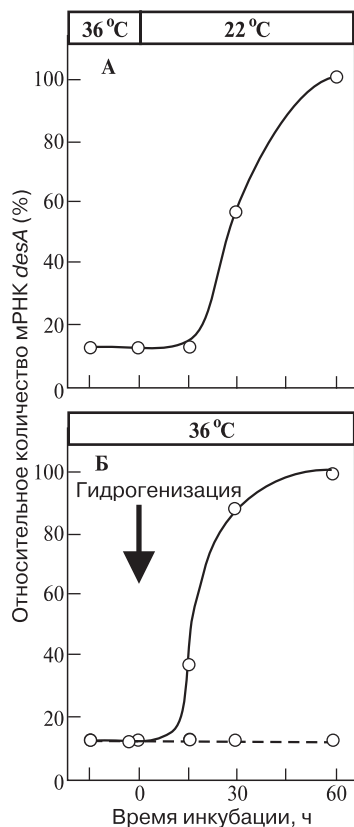


Рис. 11. Индукция транскрипции гена *desA* *Synechocystis* при снижении температуры и при каталитической гидрогенизации.

А. Клетки выращивали при 36 °С и инкубировали при 22 °С в течение 1 ч.

Б. Клетки выращивали при 36 °С и подвергали каталитической гидрогенизации при 36 °С в течение 4 мин.

За экспрессией гена *desA* наблюдали с помощью метода РНК-ДНК гибридизации в течение 1 ч.

гена *desA*. В течение 30 мин после гидрогенизации мРНК *desA* достигает того же уровня, что при низкотемпературной индукции (рис. 11) [80, 88, 105, 180]. Таким образом, каталитическая гидрогенизация и снижение температуры, приводящие к снижению текучести мембран, вызывают один и тот же ответ — индукцию генов десатураз, участвующих в формировании оптимальной физической структуры мембран. Поскольку и снижение температуры и каталитическая гидрогенизация вызывают активацию экспрессии гена десатуразы, можно предположить, что существует механизм регуляции, основанный на обратной связи — изменения текучести мембран приводят к модуляции экспрессии генов десатураз ЖК, регулирующих текучесть самих мембран.

Таким образом можно утверждать, что физические параметры биологических мембран (текучесть/вязкость) контролируют экспрессию, по крайней мере, некоторых генов. Еще одним подтверждением этого предположения являются данные о регуляции экспрессии гена теплового шока *hsp90* в дрожжах. Мутантные клетки *S. cerevisiae*, дефектные по  $\Delta 9$ -десатуразе, были трансформированы геном  $\Delta 9$ -десатуразы под контролем промоторов различной силы [19]. Таким образом был получен ряд трансформантов, отличающихся по относительному соотношению насыщенных и ненасыщенных ЖК и, соответственно, по параметрам текучести мембран. Экспрессия гена *hsp90* при 36 °С была тем



сильнее, чем был выше уровень ненасыщенных кислот. Эти данные показали, что экспрессия гена теплового шока находилась в прямой зависимости от степени ненасыщенности ЖК в мембранных липидах и от текучести биологических мембран.

Альтернативный подход был использован для изучения влияния изменений текучести мембран на экспрессию генов теплового шока в клетках *Synechocystis*. Исследования температурозависимой экспрессии гена, кодирующего шаперон Hsp17, показали, что этот ген индуцируется как тепловым воздействием, так и бензиловым спиртом — агентом, взаимодействующим с полярными группами липидов цитоплазматической мембраны и повышающим их текучесть [55].

## VII. ТЕМПЕРАТУРНЫЕ СЕНСОРЫ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ДЕСАТУРАЗ

Результаты экспериментов по гидрогенизации мембран и индукции десатураз позволили предположить, что гипотетический сенсор, восприимчивый к снижению температуры окружающей среды, может быть локализован в цитоплазматической мембране и реагировать на изменение ее текучести [105, 180]. Однако снижение температуры на 10 °С приводит лишь к 3%-ному изменению молекулярной подвижности липидов, т.к. молекулярная подвижность пропорциональна абсолютной температуре в случае, если не происходит фазового перехода. В рамках же физиологических температур (35–20 °С) фазовых переходов в липидном бислое не происходит [180]. Маловероятно, что гипотетический сенсор «чувствует» такие незначительные изменения в молекулярной подвижности. Вполне возможно, что этот сенсор реагирует на фазовые переходы в микродоменах цитоплазматической мембраны, например, переходы из жидкокристаллической в гелевую фазу. Возможно, что этот сенсор может менять свою конформацию при изменении физических свойств в мембранном окружении, вызванном снижением температуры, и проходить через стадии фосфорилирования — дефосфорилирования, передавая таким образом сигнал об изменении температуры. Гипотетический сенсор вполне мог бы удовлетворять параметрам гистидин-киназ по аналогии с сенсорами изменения осмотического давления, которые были обнаружены в клетках бактерий, дрожжей и растений [26, 122, 123, 128, 143, 168, 176]. Чтобы определить природу гипотетического температурного сенсора, был проведен случайный картриджный мутагенез клеток *Synechocystis*, несущих кассету из генов бактериальной люциферазы, находящихся под контролем температурозависимого промотора гена *desB*, кодирующего ω3-десатуразу [83]. Наблюдения за изменениями

люминесценции люциферазы позволили, в конечном итоге, определить и клонировать ряд генов, экспрессия которых влияет на активность промотора *desB* (рис. 12). Среди этих генов обнаружилось несколько представителей семейства гистидин-киназ. Поэтому была осуществлена систематическая инактивация 43 генов, кодирующих гипотетические гистидин-киназы в геноме *Synechocystis* [166]. Случайный и направленный мутагенез штамма, несущего репортерный ген под контролем промотора десатуразы привели к идентификации двух генов гистидин-киназ (мембраносвязанной *Hik33* и растворимой *Hik19*) и одного регулятора ответа (*Reg1*), контролирующих экспрессию *desB*. *Hik33* характеризуется наличием консервативного киназного домена на карбоксильном конце, двух трансмембранных доменов в N-концевом участке и, так называемого, Р-линкера посередине. Подобный линкер был обнаружен в домене восприятия сигнала и киназном домене некоторых мембраносвязанных гистидин-киназ в различных группах организмов [187].

Как предполагалось, уменьшение текучести мембраны может служить первичным сигналом для индукции экспрессии генов десатураз [105, 180]. Параметры гистидин-киназы *Hik33* вполне отвечают тем характеристикам, которыми должен обладать сенсор, воспринимающий изменения текучести мембран. Повышение вязкости мембранных липидов видимо оказывает влияние на конформацию белка на уровне трансмембранных доменов *Hik33*, что может привести к димеризации сенсорного белка и последующему каскаду фосфорилирования [166, 170, 187] (рис. 13).

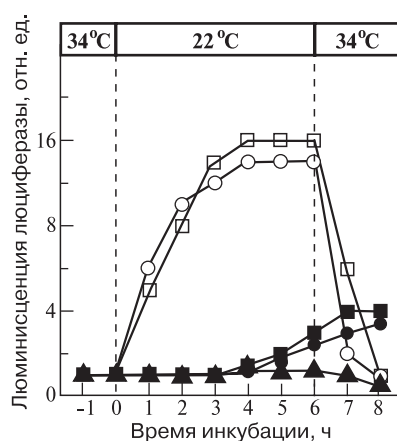


Рис. 12. Температурозависимые изменения активности промотора гена *desB* в клетках контрольного штамма *Synechocystis* (*pdesB::lux*) и мутантов по гистидинкиназам *Hik33* (*pdesB::lux/ΔHik33*), *Hik19* (*pdesB::lux/ΔHik19*), и регулятору ответа *Reg1* (*pdesB::lux/ΔReg1*), ▲—▲.

Клетки выращивали при 34 °C и переносили на 22 °C, а затем снова на 34 °C. Дополнительным «контролем» служил штамм *pdesB::lux/ΔHik10* (□—□), мутантный по гистидин-киназе *Hik10*, не принимающей участия в регуляции температурного ответа и в экспрессии генов десатураз.

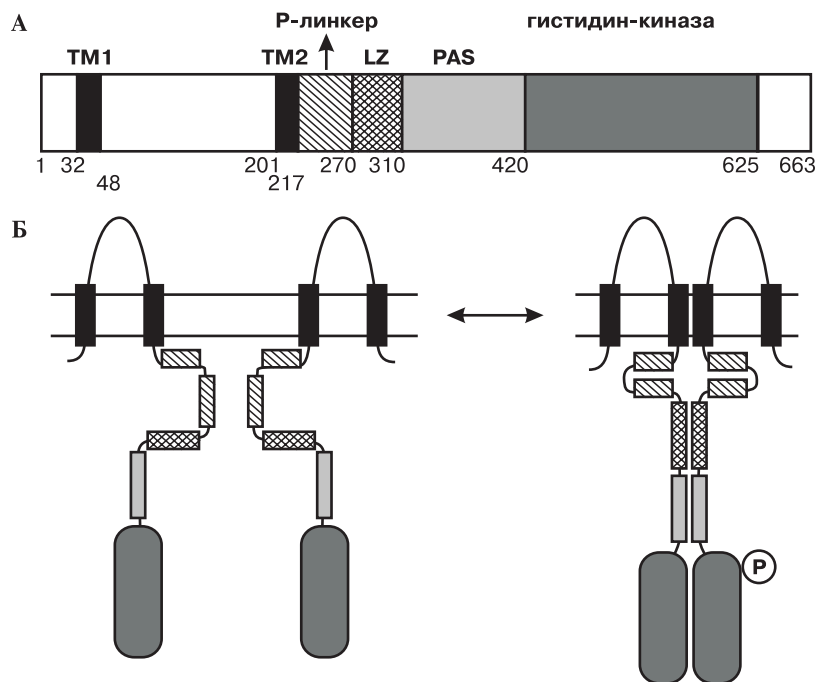


Рис. 13. Модельная схема активации сенсорной гистидин-киназы Nik33 при снижении температуры и уменьшении текучести мембран.

А. Домены Nik33: TM1 и TM2 — трансмембранные домены, LZ — лейциновый zipper, PAS — домен включает характерные последовательности *Reg*, *Δgnt*, *Sim* и фитохрома [170]. Цифры показывают аминокислотные остатки по отношению к первой N-концевой аминокислоте.

Б. Гипотетическая модель, демонстрирующая возможные изменения конформации Nik33 при снижении температуры и уменьшении текучести мембран (см. текст).

### VIII. АСПЕКТЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЗНАНИЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

Исследования механизмов десатурации ЖК, структуры и принципов функционирования десатураз и других ферментов липидного обмена позволяют применить их результаты на практике. Гипотеза, объясняющая механизмы устойчивости растений к низким температурам, предполагает, что растения, способные синтезировать повышенные количества ПНЖК, оказываются более устойчивыми к холодовому стрессу и заморозкам. Применение этой идеологии на практике привело к созданию новых трансгенных линий, как модель-

ных, с использованием фотосинтезирующих клеток цианобактерий [38, 68, 149, 184], так и пригодных для сельскохозяйственного использования [42]. Генетическая модификация растений с использованием генов ацил-трансфераз также привела к получению линий, более устойчивых к низким температурам [103].

Напротив, снижение доли ПНЖК, обеспечивающее уменьшение молекулярной подвижности липидного бислоя, должно приводить к повышенной устойчивости клеток растений к высоким температурам. Это предположение подтвердилось получением трансгенных растений табака, в котором снижена экспрессия хлоропластной  $\omega 3$ -десатуразы и, следовательно, блокировано образование триеновых ЖК [104]. Полученные растения оказались более устойчивыми к высоким температурам, чем представители дикого типа.

Данные о кристаллической структуре растворимой ацил-АПБ-десатуразы позволили осуществить работу по изменению как специфичности этого фермента, так и по модификации его функций (изменение десатуразной активности на гидроксилазную) [8, 13, 16, 78, 145]. Эти эксперименты, а также результаты клонирования генов десатураз различной специфичности к длине ацильной цепи и позиции десатурации, являются предвестниками широкого применения данного подхода в биотехнологии растений для получения и модификации линий — продуцентов ЖК с заданными параметрами.

Еще одним направлением исследований в области липидного обмена является изучение структуры и специфичности растительных тиоэстераз и элонгаз жирных кислот, определяющих длину цепи ЖК при синтезе. Так, из различных видов растений клонированы гены тиоэстераз, отвечающие за терминацию удлинения ацильной цепи и обеспечивающие преимущественный синтез  $C_{8-10}$  [23],  $C_{12}$  [21],  $C_{14}$  [22],  $C_{16-18}$  [63, 177] ЖК. Кроме того, клонирование генов кето-ацилтрансфераз (элонгаз) ЖК позволило удлинять цепи ЖК до 20, 22 и 24 углеродных атомов [76, 97–99]. Генетическая модификация различных видов растений с использованием этих генов позволила получить линии, накапливающие масла, которые содержат насыщенные триглицериды с определенной длиной ЖК [75, 108, 181, 182, 189]. Эти исследования позволяют получать в промышленных масштабах натуральные растительные липиды, содержащие каприловую ( $C_{8:0}$ ) кислоту, используемую в добавках к спортивному питанию, лауриловую кислоту ( $C_{12:0}$ ), применяемую в производстве детергентов, пальмитиновую ( $C_{16:0}$ ) и стеариновую ( $C_{18:0}$ ) кислоты для производства маргарина, олеиновую ( $C_{18:1}$ ), линолевую ( $C_{18:2}$ ) и линоленовую ( $C_{18:3}$ ) кислоты для производства пищевого растительного масла, эруковую кислоту ( $C_{22:1}$ ) для производства полиэтилена, и ранее с трудом полу-

чаемые миристиновую ( $C_{14:0}$ ) и нервоновую ( $C_{24:1}$ ) кислоты для нужд фармацевтики [75, 108, 182].

## IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Десатуразы ЖК являются высокоспецифичными ферментами, обеспечивающими формирование оптимального физического состояния биологических мембран, как в нормальных условиях, так и в условиях температурного стресса.

2. Специфическое узнавание десатуразами длины углеродной цепи ЖК и положения десатурации определяется геометрией кислородсвязывающего активного центра фермента.

3. Десатуразы ЖК эволюционно близки ферментам гидроксиглирования, ацетиленирования и эпоксидации, имеющим аналогичные десатуразам активные центры. Единичные аминокислотные замены способны конвертировать десатуразную активность в гидроксиглирование и наоборот.

4. При низкотемпературном стрессе накопление ненасыщенных ЖК в мембранных липидах и компенсация снижения текучести мембран происходит за счет индукции генов десатураз ЖК и *de novo* образования ненасыщенных липидов.

5. Индукция генов десатураз ЖК зависит от физического состояния мембран: чем ниже содержание ненасыщенных ЖК в мембранных липидах и текучесть мембран, тем быстрее активируются гены десатураз. Существует обратная связь между текучестью мембраны и экспрессией генов, отвечающих за поддержание оптимальных физических свойств мембран.

6. Сигналом изменения температуры окружающей среды, по-видимому, являются физические изменения подвижности мембранных липидов (текучесть), которые воспринимаются мембраносвязанной сенсорной гистидин-киназой Nik33, и сигнал передается далее к промоторам генов десатураз через каскад фосфорилирования-дефосфорилирования с участием растворимой гистидин-киназы Nik19 и регулятора ответа Reg1.

7. Наиболее интересными вопросами в изучении регуляции экспрессии генов десатураз, восприятии сигнала об изменении температуры и молекулярных механизмов температурной адаптации являются следующие:

— Универсальна ли природа температурных сенсоров в различных группах организмов?

— Каким образом меняется структура сенсорных белков при изменении физических свойств мембран?

— Какова природа вторичных мессенджеров, передающих сигнал от сенсорных белков к промоторам индуцируемых генов?

— Существуют ли мембранные микродомены вокруг сенсорных белков, и каков молекулярный состав липидов в таких микродоменах?

— Каков минимальный порог изменения температуры, воспринимаемый сенсорами и способный вызвать в организме ответную реакцию?

Работа поддержана грантом РФФИ 00-04-48421а.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Temperature adaptation of biological membranes / Ed. A.R.Cossins. London: Portland Press. 1994. P. 1—227.
2. Aguilar P.S., Cronan J.E., Jr., de Mendoza D. // J. Bacteriol. 1998. Vol. 180. P. 2194—2200.
3. Anamart S., Tomita T., Fukui F., Fujimori K., Harashima S., Yamada Y., Oshima Y. // Gene. 1997. Vol. 184. P. 299—306.
4. Arondel V., Lemieux B., Hwang I., Gibson S., Goodman H.M., Somerville C.R. // Science. 1992. Vol. 258. P. 1353—1355.
5. Avelange-Macherel M.H., Macherel D., Wada H., Murata N. // FEBS Lett. 1995. Vol. 361. P. 111—114.
6. Benko S., Hilkmann H., Vigh L., van Blitterswijk W.J. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 896. P. 129—135.
7. Bossie M.A., Martin C.E. // J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. P. 6409—6413.
8. Broun P., Shanklin J., Whittle E., Somerville C. // Science. 1998. Vol. 282. P. 1315—1317.
9. Browse J., McConn M., James D., Jr., Miquel M. // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. P. 16345—16351.
10. Browse J., McCourt P.J., Somerville C.R. // Anal. Biochem. 1986. Vol. 152. P. 141—145.
11. Browse J., Warwick N., Somerville C.R., Slack C.R. // Biochem. J. 1986. Vol. 235. P. 25—31.
12. Cadena D.L., Kurten R.C., Gill G.N. // Biochemistry. 1997. Vol. 36. P. 6960—6967.
13. Cahoon E.B., Coughlan S.J., Shanklin J. // Plant Mol. Biol. 1997. Vol. 33. P. 1105—1110.
14. Cahoon E.B., Cranmer A.M., Shanklin J., Ohlrogge J.B. // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 27519—27526.
15. Cahoon E.B., Dormann P., Ohlrogge J.B. // Prog. Lipid Res. 1994. Vol. 33. P. 155—163.
16. Cahoon E.B., Lindqvist Y., Schneider G., Shanklin J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 4872—4877.
17. Cahoon E.B., Shah S., Shanklin J., Browse J. // Plant Physiol. 1998. Vol. 117. P. 593—598.
18. Cahoon E.B., Shanklin J., Ohlrogge J.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 11184—11188.
19. Carratu L., Franceschelli S., Pardini C.L., Kobayashi G.S., Horvath I., Vigh L., Maresca B. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996. Vol. 93. P. 3870—3875.
20. Cossins A.R. // Biochem. Soc. Trans. 1983. Vol. 11. P. 332—333.
21. Dehesh K., Edwards P., Fillatti J., Slabaugh M., Byrne J. // Plant J. 1998. Vol. 15. P. 383—390.
22. Dehesh K., Edwards P., Hayes T., Cranmer A.M., Fillatti J. // Plant Physiol. 1996. Vol. 110. P. 203—210.

23. *Dehesh K., Jones A., Knutzon D.S., Voelker T.A.* // *Plant J.* 1996. Vol. 9. P. 167–172.
24. *Deshnium P., Paithoonrangsarid K., Suphatrakul A., Meesapyodsuk D., Tanticharoen M., Cheevadhanarak S.* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2000. Vol. 184. P. 207–213.
25. *Distel R.J., Robinson G.S., Spiegelman B.M.* // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 5937–5941.
26. *Egger L.A., Inouye M.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. Vol. 231. P. 68–72.
27. *Falcone D.L., Gibson S., Lemieux B., Somerville C.* // *Plant Physiol.* 1994. Vol. 106. P. 1453–1459.
28. *Farkas T.* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1984. Vol. 79. P. 531–535.
29. *Fernandes N.D., Kolattukudy P.E.* // *Gene.* 1996. Vol. 170. P. 95–99.
30. *Fox B.G., Shanklin J., Ai J., Loehr T.M., Sanders-Loehr J.* // *Biochemistry.* 1994. Vol. 33. P. 12776–12786.
31. *Fox B.G., Shanklin J., Somerville C., Munck E.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. Vol. 90. P. 2486–2490.
32. *Fujiwara H., Tanaka Y., Yonekura-Sakakibara K., Fukuchi-Mizutani M., Nakao M., Fukui Y., Yamaguchi M., Ashikari T., Kusumi T.* // *Plant J.* 1998. Vol. 16. P. 421–431.
33. *Fukuchi-Mizutani M., Savin K., Cornish E., Tanaka Y., Ashikari T., Kusumi T., Murata N.* // *Plant Mol. Biol.* 1995. Vol. 29. P. 627–635.
34. *Fukuchi-Mizutani M., Tasaka Y., Tanaka Y., Ashikari T., Kusumi T., Murata N.* // *Plant Cell Physiol.* 1998. Vol. 39. P. 247–253.
35. *Fukushima H., Takeda T., Sasaki N., Watanabe T., Nozawa Y.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983. Vol. 115. P. 456–462.
36. *Gargano S., Di Lallo G., Kobayashi G.S., Maresca B.* // *Lipids.* 1995. Vol. 30. P. 899–906.
37. *Gibson S., Arondel V., Iba K., Somerville C.* // *Plant Physiol.* 1994. Vol. 106. P. 1615–1621.
38. *Gombos Z., Wada H., Murata N.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. P. 9959–9963.
39. *Gombos Z., Wada H., Murata N.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. P. 8787–8791.
40. *Gombos Z., Wada H., Varkonyi Z., Los D.A., Murata N.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. Vol. 1299. P. 117–123.
41. *Hamada T., Kodama H., Nishimura M., Iba K.* // *Gene.* 1994. Vol. 147. P. 293–294.
42. *Hamada T., Kodama H., Takeshita K., Utsumi H., Iba K.* // *Plant Physiol.* 1998. Vol. 118. P. 591–598.
43. *Hamada T., Nishiuchi T., Kodama H., Nishimura M., Iba K.* // *Plant Cell Physiol.* 1996. Vol. 37. P. 606–611.
44. *Harwood J.L.* // *The Biochemistry of Plants* / Ed. P.K. Stumpf. New York: Acad. Press. 1980. P. 1–55.
45. *Harwood J.L.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. Vol. 1301. P. 7–56.
46. *Hazel J.R.* // *Annu. Rev. Physiol.* 1995. Vol. 57. P. 19–42.
47. *Heath R.J., Rock C.O.* // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 1833–1836.
48. *Heppard E.P., Kinney A.J., Stecca K.L., Miao G.H.* // *Plant Physiol.* 1996. Vol. 110. P. 311–319.
49. *Higashi S., Murata N.* // *Plant Physiol.* 1993. Vol. 102. P. 1275–1278.
50. *Hitz W.D., Carlson T.J., Booth J.R., Jr., Kinney A.J., Stecca K.L., Yadav N.S.* // *Plant Physiol.* 1994. Vol. 105. P. 635–641.
51. *Holloway C.T., Holloway P.W.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1975. Vol. 167. P. 496–504.
52. *Holloway P.W.* // *Biochemistry.* 1971. Vol. 10. P. 1556–1560.
53. *Holloway P.W., Katz J.T.* // *Biochemistry.* 1972. Vol. 11. P. 3689–3696.

54. Holloway P.W., Wakil S.J. // *J. Biol. Chem.* 1970. Vol. 245. P. 1862—1865.
55. Horvath I., Glatz A., Varvasovszki V., Torok Z., Pali T., Balogh G., Kovacs E., Nadasdi L., Benko S., Joo F., Vigh L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 3513—3518.
56. Houslay M.D., Gordon L.M. // *Curr. Top. Membr. Transp.* 1984. Vol. 18. P. 179—231.
57. Iba K., Gibson S., Nishiuchi T., Fuse T., Nishimura M., Arondel V., Hugly S., Somerville C. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 24099—24105.
58. Itoh R., Toda K., Takahashi H., Takano H., Kuroiwa T. // *Curr. Genet.* 1998. Vol. 33. P. 165—170.
59. Jaworski J.G. *The Biochemistry of Plants* / Ed. P.K. Stumpf. Orlando: Acad. Press. 1987. P. 159—174.
60. Jaworski J.G., Tai H., Ohlrogge J.B., Post-Beittenmiller D. // *Prog. Lipid Res.* 1994. Vol. 33. P. 47—54.
61. Jeffcoat R. // *Biochem. Soc. Trans.* 1977. Vol. 5. P. 811—818.
62. Jeffcoat R., Dunton A.P., James A.T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1978. Vol. 528. P. 28—35.
63. Jones A., Davies H.M., Voelker T.A. // *Plant Cell.* 1995. Vol. 7. P. 359—371.
64. Jones A.L., Hann A.C., Harwood J.L., Lloyd D. // *Biochem. J.* 1993. Vol. 290 (Pt. 1). P. 273—278.
65. Jones A.L., Lloyd D., Harwood J.L. // *Biochem. J.* 1993. Vol. 296 (Pt 1). P. 183—188.
66. Joo F., Balogh N., Horvath L.I., Filep G., Horvath I., Vigh L. // *Anal. Biochem.* 1991. Vol. 194. P. 34—40.
67. Kaneda T., Smith E.J. // *Can. J. Microbiol.* 1980. Vol. 26. P. 893—898.
68. Kanervo E., Tasaka Y., Murata N., Aro E.M. // *Plant Physiol.* 1997. Vol. 114. P. 841—849.
69. Kasai R., Kitajima Y., Martin C.E., Nozawa Y., Skriver L., Thompson G.A., Jr. // *Biochemistry.* 1976. Vol. 15. P. 5228—5233.
70. Kim Y.C., Ntambi J.M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. Vol. 266. P. 1—4.
71. Kis M., Zsiros O., Farkas T., Wada H., Nagy F., Gombos Z. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 4209—4214.
72. Kiseleva L.L., Serebriiskaya T.S., Horvath I., Vigh L., Lyukevich A.A., Los D.A. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2000. Vol. 2. P. 331—338.
73. Knutzon D.S., Thurmond J.M., Huang Y.S., Chaudhary S., Bobik E.G., Jr., Chan G.M., Kirchner S.J., Mukerji P. // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 29360—29366.
74. Kodama H., Akagi H., Kusumi K., Fujimura T., Iba K. // *Plant Mol. Biol.* 1997. Vol. 33. P. 493—502.
75. Lassner M.W. // *Lipid Technology.* 1997. Vol. 9. P. 5—9.
76. Lassner M.W., Lardizabal K., Metz J.G. // *Plant Cell.* 1996. Vol. 8. P. 281—292.
77. Leonard A.E., Kelder B., Bobik E.G., Chuang L.T., Parker-Barnes J.M., Thurmond J.M., Kroeger P.E., Kopchick J.J., Huang Y.S., Mukerji P. // *Biochem. J.* 2000. Vol. 347. Pt 3. P. 719—724.
78. Lindqvist Y., Huang W., Schneider G., Shanklin J. // *EMBO J.* 1996. Vol. 15. P. 4081—4092.
79. Logue J.A., Vigh L., Joo F., Cossins A.R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1368. P. 41—51.
80. Los D., Horvath I., Vigh L., Murata N. // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 318. P. 57—60.
81. Los D.A., Murata N. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1394. P. 3—15.
82. Los D.A., Murata N. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1999. Vol. 1. P. 221—230.
83. Los D.A., Ray M.K., Murata N. // *Mol. Microbiol.* 1997. Vol. 25. P. 1167—1175.
84. Lyons J.M. // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1973. Vol. 24. P. 445—466.



85. *Macartney A.I., Maresca B., Cossins A.R.* Temperature Adaptation of Biological Membranes / Ed. A.R.Cossins. London: Portland Press. 1994. P. 129—139.
86. *Macdonald A.G., Cossins A.R.* // Symp. Soc. Exp. Biol. 1985. Vol. 39. P. 301—322.
87. *MacDougald O.A., Lane M.D.* // Annu. Rev. Biochem. 1995. Vol. 64. P. 345—373.
88. *Maresca B., Cossins A.R.* // Nature. 1993. Vol. 365. P. 606—607.
89. *Marquardt A., Stohr H., White K., Weber B.H.* // Genomics. 2000. Vol. 66. P. 175—183.
90. *McConn M., Browse J.* // Plant J. 1998. Vol. 15. P. 521—530.
91. *McElhaney R.N.* // Biomembranes. 1977. Vol. 12. P. 249—276.
92. *McKeon T.A., Stumpf P.K.* // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 12141—12147.
93. *Meesters P.A., Eggink G.* // Yeast. 1996. Vol. 12. P. 723—730.
94. *Meesters P.A., Springer J., Eggink G.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. Vol. 47. P. 663—667.
95. *Mercuri O., Peluffo R.O., De Tomas M.E.* // Biochim. Biophys. Acta. 1974. Vol. 369. P. 264—268.
96. *Michaelson L.V., Lazarus C.M., Griffiths G., Napier J.A., Stobart A.K.* // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 19055—19059.
97. *Millar A.A., Kunst L.* // Plant J. 1997. Vol. 12. P. 121—131.
98. *Millar A.A., Kunst L.* // Phytochemistry. 1999. Vol. 52. P. 1029—1033.
99. *Millar A.A., Wrischer M., Kunst L.* // Plant Cell. 1998. Vol. 10. P. 1889—1902.
100. *Miller C.W., Waters K.M., Ntambi J.M.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. Vol. 231. P. 206—210.
101. *Miquel M., Browse J.* // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 1502—1509.
102. *Mitchell A.G., Martin C.E.* // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 29766—29772.
103. *Moon B.Y., Higashi S., Gombos Z., Murata N.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 6219—6223.
104. *Murakami Y., Tsuyama M., Kobayashi Y., Kodama H., Iba K.* // Science. 2000. Vol. 287. P. 476—479.
105. *Murata N., Los D.A.* // Plant Physiol. 1997. Vol. 115. P. 875—879.
106. *Murata N., Wada H.* // Biochem. J. 1995. Vol. 308 (Pt 1). P. 1—8.
107. *Murata N., Wada H., Gombos Z.* // Plant Cell Physiol. 1992. Vol. 33. P. 933—941.
108. *Murphy D.J.* // Curr. Opin. Biotechnol. 1999. Vol. 10. P. 175—180.
109. *Mustardy L., Los D.A., Gombos Z., Murata N.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 10524—10527.
110. *Nakashima S., Zhao Y., Nozawa Y.* // Biochem. J. 1996. Vol. 317 (Pt 1). P. 29—34.
111. *Napier J.A., Hey S.J., Lacey D.J., Shewry P.R.* // Biochem. J. 1998. Vol. 330 (Pt 2). P. 611—614.
112. *Nishida I., Murata N.* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1996. Vol. 47. P. 541—568.
113. *Nishiuchi T., Kodama H., Yanagisawa S., Iba K.* // Plant Physiol. 1999. Vol. 121. P. 1239—1246.
114. *Nishiuchi T., Nakamura T., Abe T., Kodama H., Nishimura M., Iba K.* // Plant Mol. Biol. 1995. Vol. 29. P. 599—609.
115. *Ntambi J.M.* // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 10925—10930.
116. *Ntambi J.M.* // Prog. Lipid Res. 1995. Vol. 34. P. 139—150.
117. *Ntambi J.M.* // J. Lipid Res. 1999. Vol. 40. P. 1549—1558.
118. *Okuley J., Lightner J., Feldmann K., Yadav N., Lark E., Browse J.* // Plant Cell. 1994. Vol. 6. P. 147—158.

119. Pak Y., Joo F., Vigh L., Katho A., Thompson G.A., Jr. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. Vol. 1023. P. 230—238.
120. Panpoom S., Los D.A., Murata N. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1390. P. 323—332.
121. Parimoo S., Zheng Y., Eilertsen K., Ge L., Prouty S., Sundberg J., Stenn K. // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 1999. Vol. 4. P. 320—322.
122. Posas F., Wurgler-Murphy S.M., Maeda T., Witten E.A., Thai T.C., Saito H. // *Cell.* 1996. Vol. 86. P. 865—875.
123. Qin L., Dutta R., Kurokawa H., Ikura M., Inouye M. // *Mol. Microbiol.* 2000. Vol. 36. P. 24—32.
124. Quinn P.J., Joo F., Vigh L. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1989. Vol. 53. P. 71—103.
125. Raison J.K. // *J. Bioenerg.* 1973. Vol. 4. P. 258—309.
126. Raison J.K. // *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1973. Vol. 27. P. 485—512.
127. Reddy A.S., Nuccio M.L., Gross L.M., Thomas T.L. // *Plant Mol. Biol.* 1993. Vol. 22. P. 293—300.
128. Roberts D.L., Bennett D.W., Forst S.A. // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 8728—8733.
129. Roughan G., Slack C.R. // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1982. Vol. 33. P. 97—132.
130. Russel N.J. // *Trends Biochem. Sci.* 1984. Vol. 9. P. 108—112.
131. Saito T., Ochiai H. // *Eur. J. Biochem.* 1999. Vol. 265. P. 809—814.
132. Sakamoto T., Bryant D.A. // *Mol. Microbiol.* 1997. Vol. 23. P. 1281—1292.
133. Sakamoto T., Los D.A., Higashi S., Wada H., Nishida I., Ohmori M., Murata N. // *Plant Mol. Biol.* 1994. Vol. 26. P. 249—263.
134. Sakamoto T., Wada H., Nishida I., Ohmori M., Murata N. // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 25576—25580.
135. Sakamoto T., Wada H., Nishida I., Ohmori M., Murata N. // *Plant Mol. Biol.* 1994. Vol. 24. P. 643—650.
136. Sakuradani E., Kobayashi M., Ashikari T., Shimizu S. // *Eur. J. Biochem.* 1999. Vol. 261. P. 812—820.
137. Sakuradani E., Kobayashi M., Shimizu S. // *Eur. J. Biochem.* 1999. Vol. 260. P. 208—216.
138. Sakuradani E., Kobayashi M., Shimizu S. // *Gene.* 1999. Vol. 238. P. 445—453.
139. Sato N., Murata N. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. Vol. 619. P. 353—366.
140. Sato N., Murata N., Miura Y., Ueta N. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. Vol. 572. P. 19—28.
141. Sayanova O., Smith M.A., Lapinskas P., Stobart A.K., Dobson G., Christie W.W., Shewry P.R., Napier J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. P. 4211—4216.
142. Schultz D.J., Cahoon E.B., Shanklin J., Craig R., Cox-Foster D.L., Mumba R.O., Medford J.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996. Vol. 93. P. 8771—8775.
143. Schumacher M.M., Enderlin C.S., Selitrennikoff C.P. // *Curr. Microbiol.* 1997. Vol. 34. P. 340—347.
144. Schweizer E., Werkmeister K., Jain M.K. // *Mol. Cell Biochem.* 1978. Vol. 21. P. 95—107.
145. Shanklin J., Cahoon E.B. // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1998. Vol. 49. P. 611—641.
146. Shanklin J., Somerville C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. Vol. 88. P. 2510—2514.
147. Shanklin J., Whittle E., Fox B.G. // *Biochemistry.* 1994. Vol. 33. P. 12787—12794.
148. Sinensky M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1974. Vol. 71. P. 522—525.
149. Sippola K., Kanervo E., Murata N., Aro E.M. // *Eur. J. Biochem.* 1998. Vol. 251. P. 641—648.
150. Skriver L., Thompson G.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. Vol. 572. P. 376—381.

151. Slack C.R., Roughan P.G., Browse J. // *Biochem. J.* 1979. Vol. 179. P. 649—656.
152. Slack C.R., Roughan P.G., Terpstra J. // *Biochem. J.* 1976. Vol. 155. P. 71—80.
153. Slocombe S.P., Cummins I., Jarvis R.P., Murphy D.J. // *Plant Mol. Biol.* 1992. Vol. 20. P. 151—155.
154. Slocombe S.P., Piffanelli P., Fairbairn D., Bowra S., Hatzopoulos P., Tsiantis M., Murphy D.J. // *Plant Physiol.* 1994. Vol. 104. P. 1167—1176.
155. Somerville C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 6215—6218.
156. Sperling P., Schmidt H., Heinz E. // *Eur. J. Biochem.* 1995. Vol. 232. P. 798—805.
157. Stubbs C.D. // *Essays Biochem.* 1983. Vol. 19. P. 1—39.
158. Stubbs C.D., Smith A.D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. Vol. 779. P. 89—137.
159. Stuke J.E., McDonough V.M., Martin C.E. // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 16537—16544.
160. Stuke J.E., McDonough V.M., Martin C.E. // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 20144—20149.
161. Stumpf P.K. // *Biochem. J.* 1972. Vol. 128. P. 3—5.
162. Stumpf P.K. // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1975. Vol. 52. P. 4844—4900.
163. Stumpf P.K. *Biochemistry of Plants* / Ed. P.K. Stumpf. New York: Acad. Press. 1980. P. 177—204.
164. Stumpf P.K., Porra R.J. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1976. Vol. 176. P. 63—70.
165. Stumpf P.K., Vijay I., Harwood J.L. // *Biochem. Soc. Symp.* 1972. Vol. 57—63.
166. Suzuki I., Los D.A., Kanesaki Y., Mikami K., Murata N. // *EMBO J.* 2000. Vol. 19. P. 1327—1334.
167. Tabor D.E., Xia Y.R., Mehrabian M., Edwards P.A., Lusic A.J. // *Mamm. Genome.* 1998. Vol. 9. P. 341—342.
168. Tanaka T., Saha S.K., Tomomori C., Ishima R., Liu D., Tong K.I., Park H., Dutta R., Qin L., Swindells M.B., Yamazaki T., Ono A.M., Kainosho M., Inouye M., Ikura M. // *Nature.* 1998. Vol. 396. P. 88—92.
169. Tasaka Y., Gombos Z., Nishiyama Y., Mohanty P., Ohba T., Ohki K., Murata N. // *EMBO J.* 1996. Vol. 15. P. 6416—6425.
170. Taylor B.L., Zhulin I.B. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. Vol. 63. P. 479—506.
171. Tebbey P.W., Van Cleave S., Buttke T.M. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1994. Vol. 33. P. 991—1000.
172. Thompson G.A., Jr. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1989. Vol. 21. P. 43—60.
173. Tiku P.E., Gracey A.Y., Macartney A.I., Beynon R.J., Cossins A.R. // *Science.* 1996. Vol. 271. P. 815—818.
174. Torok Z., Szalontai B., Joo F., Wistrom C.A., Vigh L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. Vol. 192. P. 518—524.
175. Tsukamoto Y., Wong H., Mattick J.S., Wakil S.J. // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 15312—15322.
176. Urao T., Yakubov B., Satoh R., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M., Hirayama T., Shinozaki K. // *Plant Cell.* 1999. Vol. 11. P. 1743—1754.
177. Val D., Banu G., Seshadri K., Lindqvist Y., Dehesh K. // *Structure. Fold. Des.* 2000. Vol. 8. P. 565—566.
178. Vigh L., Joo F., Cseplo A. // *Eur. J. Biochem.* 1985. Vol. 146. P. 241—244.
179. Vigh L., Joo F., Droppa M., Horvath L.I., Horvath G. // *Eur. J. Biochem.* 1985. Vol. 147. P. 477—481.
180. Vigh L., Los D.A., Horvath I., Murata N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. Vol. 90. P. 9090—9094.
181. Voelker T. // *Genet. Eng. (N.Y.).* 1996. Vol. 18. P. 111—133.
182. Voelker T.A., Worrell A.C., Anderson L., Bleibaum J., Fan C., Hawkins

- D.J., Radke S.E., Davies H.M.* // Science. 1992. Vol. 257. P. 72—74.
183. *Wada H., Avelange-Macherel M.H., Murata N.* // J. Bacteriol. 1993. Vol. 175. P. 6056—6058.
184. *Wada H., Gombos Z., Murata N.* // Nature. 1990. Vol. 347. P. 200—203.
185. *Wada H., Schmidt H., Heinz E., Murata N.* // J. Bacteriol. 1993. Vol. 175. P. 544—547.
186. *Watts J.L., Browse J.* // Arch. Biochem. Biophys. 1999. Vol. 362. P. 175—182.
187. *Williams S.B., Stewart V.* // Mol. Microbiol. 1999. Vol. 33. P. 1093—1102.
188. *Wongwathanarat P., Michaelson L.V., Carter A.T., Lazarus C.M., Griffiths G., Stobart A.K., Archer D.B., MacKenzie D.A.* // Microbiology. 1999. Vol. 145 (Pt 10). P. 2939—2946.
189. *Yuan L., Voelker T.A., Hawkins D.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 10639—10643.