ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ КАЗАНСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Сулкарнаева Альбина Гарифулловна

СОСТАВ СТЕРИНОВ И АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ С24-СТЕРИН МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ *TRITICUM AESTIVUM* ПРИ СТРЕССЕ

03.01.05. – физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: доктор биологических наук Минибаева Фарида Вилевна

Казань – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ИСПОЛЬ	30BA	ННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ	
ВВЕДЕНИЕ7			
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ14			
1.1.	Растит	сельные стерины: химическая структура и многообразие	
	молеку	улярных видов14	
1.2.	Функц	ии стеринов в растениях	
	1.2.1.	Стерины как компонент мембран22	
	1.2.2.	Роль стеринов в трансдукции сигнала	
	1.2.3.	Роль стеринов в росте и развитии растений	
	1.2.4.	Роль стеринов в стрессовом ответе растительных клеток	
1.3.	Стери	н-связывающие агенты: нистатин и метил-β-циклодекстрин34	
	1.3.1.	Нистатин	
	1.3.2.	Метил-β-циклодекстрин36	
1.4.	Биосинтез растительных стеринов		
1.5.	С24-ст	терин метилтрансфераза растений45	
	1.5.1.	Общая характеристика ферментов семейства SMT45	
	1.5.2.	Гены <i>SMT</i> : структура и транскрипционная активность49	
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ54			
2.1.	 Объект исследования		
2.2.	Анализ липидов		
	2.2.1.	Экстракция липидов из растительного материала54	
	2.2.2.	Анализ фосфо- и гликолипидного состава проростков пшеницы	
		методами высокоэффективной тонкослойной хроматографии и	
		денситометрии	
	2.2.3.	Анализ стеринового состава проростков пшеницы методами	
		тонкослойной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии с	
		ионизацией электронным ударом56	

2.3. Определение проницаемости плазмалеммы для ионов калия и
протонов
2.4. Определение выхода электролитов и индекса мембранной
стабильности
2.5. Анализ размера ($D_{\rm eff}$) и ζ -потенциала частиц М β CD, β -ситостерина и
комплекса М <i>β</i> CD/ <i>β</i> -ситостерин58
2.6. Определение окислительно-восстановительного статуса
2.6.1. Содержание перекиси водорода
2.6.2. Уровень перекисного окисления липидов
2.6.3. Активность пероксидазы
2.7. Определение уровня жизнеспособности клеток
2.8. Флуоресцентная визуализация аутофагосом
2.9. Выделение тотальной РНК и синтез кДНК при помощи ОТ-ПЦР60
2.9.1. Амплификации участков кДНК с помощью ПЦР в реальном
времени61
2.9.2. Анализ относительного уровня экспрессии генов
2.10.Выделение геномной ДНК растений64
2.10.1. Амплификация участков гомеологичных генов
2.10.2. Амплификация и секвенирование промоторных областей
гомеологичных генов
2.11.Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле
2.12.Молекулярное клонирование ДНК67
2.13.Определение нуклеотидной последовательности ДНК
2.14.Биоинформатический анализ нуклеотидных и аминокислотных
последовательностей
2.15.Статистическая обработка данных69
ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ
3.1. Действие стерин-связывающих агентов М _β CD и нистатина на корни
проростков пшеницы70

3.1.1. Изменения липидного состава корней пшеницы при действии		
MβCD73		
3.1.2. Влияние стерин-связывающих агентов на физиологические		
параметры клеток корней пшеницы		
3.2. Действие низкой положительной температуры на проростки		
пшеницы		
3.2.1. Изменения индекса мембранной стабильности и редокс-статуса в		
корнях и листьях84		
3.2.2. Изменения липидного состава в корнях и листьях проростков		
пшеницы: стерины, гликолипиды, фосфолипиды		
3.3. Характеристика С24-стерин метилтрансферазы пшеницы		
3.3.1. Биоинформатический анализ белка TaSMT1		
3.3.2. Идентификация и характеристика гомеологичных генов пшеницы		
<i>TaSMT1</i> 102		
3.3.3. Экспрессия генов <i>TaSMT1</i> в условиях холодового стресса107		
3.3.4. Клонирование и секвенирование промоторных областей генов		
<i>TaSMT1</i> 109		
ЗАКЛЮЧЕНИЕ113		
ВЫВОДЫ116		
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		
ПРИЛОЖЕНИЕ154		

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

- АБК абсцизовая кислота
- АФК активные формы кислорода
- БР брассиностероиды
- БС брассинолид
- ГлЦер гликоцерамиды
- ДГДГ дигалактозилдиацилглицерид
- ДМСО диметилсульфоксид
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДФГ дифосфатидилглицерин
- ЖК жирные кислоты
- кДНК комплементарная ДНК
- МВК мевалоновая кислота
- МДА малоновый диальдегид
- МГДГ моногалактозилдиацилглицерид
- ОТ обратная транскрипция
- ПМ плазматическая мембрана
- ПОЛ перекисное окисление липидов
- ПЦР полимеразная цепная реакция
- ПЦР РВ полимеразная цепная реакция в реальном времени
- РНК рибонуклеиновая кислота
- ТБК тиобарбитуровая кислота
- ТСХ тонкослойная хроматография
- ФГ фосфатидилглицерин
- ФИ фосфатидилинозит
- ФК фосфатидная кислота
- ФЛ фосфолипиды
- $\Phi C \phi$ осфатидилсерин
- ФХ фосфатидилхолин

- $\Phi \Theta \phi$ осфатидилэтаноламин
- ЭПР эндоплазматический ретикулум
- ARF фактор АДФ-рибозилирования
- ATG аутофагические белки
- HMGR 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктаза
- Н₂О₂ перекись водорода
- LB среда Luria-Bertani
- LT LysoTracker Red
- МβCD метил-β-циклодекстрин
- OSBP оксистерин-связывающие белки
- РОХ пероксидаза
- RLI ингибитор РНКазы L-подобный белок
- SMT C24-стерин метилтрансфераза

введение

Постановка проблемы и ее актуальность. Стерины являются важным структурным элементом биологических мембран. В настоящее время исследование функций растительных стеринов вышло на новый уровень. Стеринам отводится не только структурная, но и регуляторная роль. Известно, что стерины являются гормонов предшественниками растительных брассиностероидов (БР). регулирующих рост и развитие растений (Clouse, 2000; Bishopa, Koncz, 2002; He et al., 2003; Lindsey, 2003; Benveniste, 2004; Wang, 2006; Ikekawa et al., 2013). Выявлена роль стеринов при растяжении клеток, их полярности, пролиферации, при формировании сосудов, тканей и органов, в развитии зародыша, фертильности растений, гравитропизме, гормональном сигналинге (Carland et al., 2002; Souter et al., 2002; Betts, Moore, 2003; Schrick et al., 2004; Titapiwatanakun et al., 2009; Vriet et al., 2013). Предполагают, что стерины участвуют в клеточном сигналинге, являясь основным компонентом мембранных микродоменов, так называемых «липидных рафтов» (Jacobson et al., 2007; Mongrand et al., 2010; Cacas et al., 2012; Zauber et al., 2014). Стериновый состав растений, в отличие от такового животных и грибов, весьма сложен и многообразен. Преобладающими мембранными стеринами высших растений являются β-ситостерин, кампестерин и стигмастерин, показано также наличие холестерина (Schaller, 2003; Benveniste, 2004; Valitova et al., 2011). Несмотря на имеющуюся в литературе информацию о роли стеринов и их жизнедеятельности растений, производных В молекулярные механизмы вовлечения стеринов в стрессовые ответы растений остаются малоизученными. В частности, в настоящее время острым вопросом является выявление вклада ключевых ферментов биосинтеза растительных стеринов в изменение соотношения различных видов стеринов в условиях стресса.

Биосинтез растений стеринов y многоступенчатый процесс, характеризующийся наличием множества альтернативных путей. Многие ферменты синтеза растительных стеринов В настоящее время еще не охарактеризованы. Ключевым ферментом в биосинтезе стеринов, определяющим образование конечных продуктов синтеза, является С24-стерин метилтрансфераза (SMT). Показано, что данный фермент необходим для нормального роста и развития растений, и активность SMT меняется при действии различных стрессовых факторов (Carland et al., 2002; Luo et al., 2008; Neelakandan et al., 2009). Для растений характерно два типа SMT, участвующих в первичном (SMT1) и во вторичном (SMT2) метилировании 24-го атома углерода боковой цепи стеринов (Shi et al., 1996; Bouvier-Navé et al., 1997, 1998). Продуктом реакции первичного метилирования является кампестерин (24-метилстерин), а конечными продуктами являются β -ситостерин вторичного метилирования И стигмастерин (24 этилстерины). В геномах различных растений (арабидопсис, табак, соя) аннотированы и охарактеризованы гены, кодирующие SMT1 и SMT2 (Diener et al., 2000; Nes et al., 2003; Carland et al., 2010; Haubrich et al., 2015). В 1997 г. был секвенирован ген пшеницы, кодирующий SMT, который получил название ген Triticum aestivum дельта-24-стерин метилтрансферазы (TaSMT) (Subramaniam et al., 1999), однако точное количество генов *TaSMT* в геноме пшеницы до настоящего времени не установлено.

Важным шагом к пониманию функций белков является анализ промоторной области генов, кодирующих эти белки, С целью выявление участков, активирующихся при определенных стрессовых воздействиях и индуцирующих связывание с РНК-полимеразой и дальнейшую экспрессию гена. Информация о промоторной области гена TaSMT чрезвычайно ограничена, в базе данных NCBI есть лишь короткая последовательность регуляторной области гена TaSMT размером в 266 нуклеотидов. Отсутствует информация о последовательностях стресс-чувствительных мотивов. Можно полагать, что наличие таких мотивов позволяет регулировать активность гена *TaSMT* и, в конечном итоге, обуславливает изменения в биосинтезе стеринов в стрессовых условиях. Таким образом, анализ стресс-индуцированных изменений активности генов, ответственных за синтез стеринов растительной клетки, исключительно актуален.

Эффективным подходом в изучении роли стеринового компонента во внутриклеточных процессах является связывание эндогенных стеринов

(истощение) с применением специфических агентов (амфотерицин В, нистатин, кандицидин, пимарицин, метил-β-циклодекстрин (МβCD)). Однако специфичность этих агентов для растительных стеринов и физиологические последствия их применения для клеток растений практически не изучены.

Знание закономерностей стресс-индуцированных изменений в биосинтезе растительных стеринов и соотношения их молекулярных видов в стрессовых условиях является необходимой фундаментальной основой для направленного изменения процессов роста растений, формирования их устойчивости к различным неблагоприятным факторам и, в конечном итоге, повышения качества урожая и сохранения биоразнообразия.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования – изучение изменений состава стеринов и других мембранных липидов в проростках пшеницы при действии низкой положительной температуры, а также анализ структуры и активности генов С24-стерин метилтрансферазы.

Были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать изменения липидного состава и физиологобиохимических параметров в корнях пшеницы в условиях стеринового истощения, вызванного действием стерин-связывающих агентов нистатина и МβCD;

2. Изучить изменения проницаемости мембран для электролитов, редоксстатуса и индукцию аутофагии в клетках проростков пшеницы при действии низкой положительной температуры и совместном действии гипотермии и стеринсвязывающего агента МβCD;

3. Провести анализ состава и содержания стеринов, гликоцерамидов и фосфолипидов в корнях и листьях проростков пшеницы в условиях низкотемпературного стресса;

4. Секвенировать и проанализировать структуру генов *TaSMT1* пшеницы, кодирующих фермент стеринового биосинтеза C24-стерин метилтрансферазу 1;

5. Провести секвенирование *de novo* промоторных последовательностей генов *TaSMT1* и осуществить поиск стресс-чувствительных *цис*-элементов.

Оценить уровень экспрессии генов *TaSMT1* пшеницы в условиях низкотемпературного стресса.

Научная новизна работы. Впервые обнаружено, что специфические механизмы связывания стерин-связывающих агентов со стеринами определяют различия физиологических эффектов этих агентов в клетках растений. В отличие от нистатина, токсичность которого обусловлена истощением стеринов в сочетании с образованием пор в мембранах, физиологические последствия истощения стеринов при действии олигосахарида М β CD *in vivo* проявляются лишь в стрессовых условиях.

Выявлено, что действие низкой положительной температуры индуцирует изменения в соотношениях 24-метил-/этилстерины, общего содержании стеринов, гликоцерамидов и фосфолипидов и их соотношениях в корнях и листьях проростков пшеницы. Поддержание баланса основных мембранных липидов способствует повышению стабильности мембран в листьях. Нарушение этого баланса, а также сдвиги редокс-статуса приводят к меньшей устойчивости корней к действию низкой положительной температуры.

Впервые идентифицированы три копии гомеологичных генов *TaSMT1*, расположенные на хромосомах A, B, D гексаплоидного генома *T. aestivum*, проведен детальный биоинформатический анализ этих генов и первичной структуры белка SMT1 пшеницы. Проведено секвенирование *de novo* промоторных последовательностей генов *TaSMT1*, выявлены стресс-чувствительные *цис*-элементы. Получены новые экспериментальные данные об изменении профиля экспрессии генов *TaSMT1* в корнях и листьях в условиях холодового стресса.

Научно-практическая значимость. Разработан комплекс методических подходов для анализа мембранных стеринов в клетках растений с целью выяснения роли этих липидов при стрессе. Эффективным подходом является изучение состава стеринов, экспрессии генов стеринового биосинтеза в сочетании с универсальными стрессовыми маркерами, в том числе проницаемостью мембран, уровнем активных форм кислорода (АФК) и жизнеспособностью клеток. Данные параметры могут быть использованы при оценке стрессовой устойчивости растений. На основе

проведенного сравнительного анализа действия на растения двух стеринсвязывающих агентов нистатина и М β CD, имеющих различные механизмы связывания со стеринами, показана меньшая токсичность для растений М β CD. Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть применены в учреждениях сельскохозяйственного, биологического и биотехнологического профиля, а также при чтении курсов лекций по физиологии и биохимии растений и молекулярной биологии в ВУЗах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа проводилась с 2012 по 2016 г.г. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Молекулярные механизмы антиоксидантной защиты растительных клеток» (государственный регистрационный № 01201357062). Исследования автора, как руководителя и исполнителя, поддержаны грантами РФФИ, ФЦП, ВНШ, МКБ, стипендиями Биохимического общества (Великобритания) и Правительства Франции. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Положения, выносимые на защиту.

1. Вовлечение стеринов в стрессовый ответ растительной клетки реализуется через изменение общего содержания стеринов, соотношения их молекулярных видов, соотношения стеринов с другими мембранными липидами.

2. Ген стеринового биосинтеза *TaSMT1* представлен в геноме пшеницы в виде трех гомеологичных копий, которые характеризуются высокой степенью сходства кодирующих областей, существенными различиями в структуре промоторов, дифференциальной экспрессией при стрессе.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались автором на III и VI всероссийских с международным участием конгрессах молодых ученыхбиологов «Симбиоз-Россия» (Нижний Новгород, 2010; Иркутск, 2013); XVIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2011); третьем международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, Россия, 2011); VII съезде физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, Россия, 2011); II всероссийской школе-конференции молодых ученых Уфимского научного центра PAH И Волго-Уральского региона по физико-химической биологии И биотехнологии «БИОМИКА – наука XXI века» (Уфа, Россия, 2011); IV азиатском симпозиуме «The 4th Asian Symposium on Plant Lipids» (Покфулам, Гонконг, 2011); 15-ой и 16-ой международных Пущинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – Наука XXI века» (Пущино, Россия, 2011, 2012); 11-ой международной конференции «Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants» (Варшава, Польша, 2013); международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Казань, Россия, 2013); международной конференции, проводимой совместно FEBS и Biochemical Society «Membrane, Morphology and Function» (Фара-Сан-Мартино, Абруццо, Италия, 2014); годичном собрании Общества физиологов растений России и международной научной конференции и школы молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, Россия, 2014); международной конференции «Plant Abiotic Stress Tolerance III» (Вена, Австрия, 2015); 18-ом Европейском симпозиуме студентов-биологов «Symbiose 2015» (Александруполис, Греция, 2015); VI совместном азиатском симпозиуме «6th Internatinal Singapore Lipid Symposium and 6th Asian Symposium on Plant Lipids» (Сингапур, 2015); а также на итоговых конференциях КИББ КазНЦ РАН (2012, 2013, 2014, 2015, 2016).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях (FEBS Journal, ДАН – 2 статьи), рекомендуемых ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. В работе представлено 13 таблиц, 33 рисунка. Список литературы включает 331 источника, из которых 305 – иностранных.

Благодарности. Выражаю глубокую благодарность и признательность д.б.н. Минибаевой научному руководителю Фариде Вилевне моему 3a всестороннюю поддержку, неоценимую помощь, огромное терпение и понимание. Выражаю искреннюю благодарность к.б.н. Валитовой Юлии Наилевне за помощь в проведении экспериментов и плодотворное обсуждение результатов при выполнении данной работы. Особо хочу поблагодарить своих коллег к.х.н. Мухитову Фаиму Киямовну, к.б.н. Пономареву Анастасию Анатольевну, к.б.н. Дмитриеву Светлану Анатольевну, к.б.н. Котлову Екатерину Робертовну и к.х.н. Муртазину Ляйсан Ильсуровну за помощь в проведении экспериментов. Особую благодарность выражаю Рябовол Виктории Вадимовне, Топорковой Яне Юрьевне и Осиповой Елене Валентиновне за помощь в приобретении экспериментальных сотрудникам лаборатории навыков, a также всем окислительновосстановительного метаболизма Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Растительные стерины: химическая структура и многообразие молекулярных видов

В настоящее время известно, что ключевую роль в функционировании биологических мембран играет их липидный состав. Липидный состав плазматической мембраны (ПМ) клеток растений специфичен для конкретного вида, ткани и органа (Sandstrom, Cleland, 1989; Rozentsvet *et al.*, 2014). Основными мембранными липидами являются фосфолипиды (ФЛ), гликолипиды, а также стерины. Примерное процентное содержание липидов в плазмалемме составляет 37–47% ФЛ, 28–37% свободные стерины и 25–29% гликолипиды, которые отличаются физико-химическими свойствами (Bohn *et al.*, 2007; Furt *et al.*, 2007). Структурное разнообразие известных липидов возникает из-за множества возможных альтернативных путей их биосинтеза.

Важным компонентом мембран, оказывающим упорядочивающее воздействие на структуру мембран, являются стерины, уровень содержания которых регулируется на клеточном и организменном уровнях (Bretscher, Munro, 1993; London, 2002; Mukherjee, Maxfield, 2004). В отличие от животных и грибов, где доминирующими стеринами являются холестерин и эргостерин, высшие растения обладают сложным стериновым составом (Benveniste, 2004). Более 250 видов стеринов описаны в растениях, например, в проростках кукурузы (Zea mays L.) идентифицирован 61 вид стеринов и пентациклических тритерпенов (Akihisa et al., 1991; Guo et al., 1995; Hartmann, 1998). Стерины в растениях присутствуют в трех формах: свободные стерины, стериновые эфиры и стерилгликозиды. Преобладающими свободными стеринами высших растений являются β-ситостерин, стигмастерин и кампестерин. Ранее в нашей лаборатории было показано наличие основных типов стеринов в корнях пшеницы (Valitova et al., 2011). Примечательно, что в растительных клетках показано наличие холестерина, содержание которого может достигать в корнях пшеницы 10% от общего содержания стеринов (Valitova et al., 2011), в клетках арабидопсиса

(Arabidopsis thaliana L.) – 19%, соответственно (Jang et al., 2000; He et al., 2003; Schaller, 2003; Laloi et al., 2007). Холестерин, как правило, содержится в растениях в минорных количествах, хотя, как показано, он может быть основным стериновым компонентом мембран красных водорослей и некоторых семейств высших растений, таких как *Solanaceae*, *Liliaceae* и *Scrophylariaceae* (Noda et al., 1988; Govindan et al., 1993; Hobbs et al., 1996; Nasir et al., 2011). Количество стеринов в клетках растений постоянно для отдельного вида и составляет в среднем 1-3 мг общих стеринов на 1 г сухого веса (Schaeffer et al., 2001; Holmberg et al., 2002).

Структура растительных стеринов

Стерины представляют собой полициклические спирты, имеющие в своем составе алифатические и циклические фрагменты и относящиеся по химической природе к изопреноидам, основой структуры которых является циклопентанопергидрофенантрен. Все стерины в своей структуре имеют ядро, образованное гидрированным фенантреном (кольца A, B и C) и циклопентаном (кольцо D) (рис. 1), и боковую цепь при 17-ом атоме углерода. Стерины содержат *β*-гидроксильную группу при C3 и одну или несколько двойных связей в кольце B и боковой цепи.



Рис. 1. Химическая структура стеринов. Кольца А, В и С – гидрированный фенантрен, кольцо D – циклопентан. Углеродные атомы пронумерованы.

Отличительной структурной особенностью основных растительных стеринов, по сравнению с холестерином, является наличие метильных или этильных групп при 24-ом атоме углерода боковой цепи (Benveniste, 1986). По этому признаку растительные стерины делят на 24-метил- и этилстерины. Кампестерин содержит только одну метильную группу при C24, β -ситостерин характеризуется наличием этильной группы при C24, а стигмастерин имеет этильную группу при C24 и двойную связь при C22 (рис. 2) (Schaller *et al.*, 1998). Растительные стерины содержат больше углеродных атомов, чем холестерин, что делает их более гидрофобными (Sikorski, Kolakowska, 2002).



Рис. 2. Структурные формулы растительных стеринов: **А** – кампестерин, **Б** – *β*-ситостерин, **B** – стигмастерин. Выделены области структурных отличий.

Соотношение различных молекулярных видов стеринов

Соотношение преобладающих стеринов растений составляет примерно 70% β -ситостерина, 5% стигмастерина и 20% кампестерина (или >70% 24-этилстеринов и <30% 24-метилстеринов). В сельскохозяйственных растениях на 24-метил- и 24этилстерины обычно приходится более 85% от общего содержания стеринов (Jayasimha *et al.*, 2006). Например, стериновый профиль арабидопсиса включает β ситостерин (64%) в качестве основного соединения, кампестерин (11%), стигмастерин (6%), изофукостерин (3%) и брассикастерин (2%), а также минорное количество других стеринов (Schaeffer et al., 2001). На популярной модели растений, арабидопсисе, было показано, что стебли, листья и корни имеют различный стериновый профиль (Morikawa et al., 2006; Schaeffer et al., 2001). В работе Villette с соавт. (2015) было показано разнообразие стеринового состава в пыльцевых зернах различных растений в период цветения (Villette et al., 2015). Большое разнообразие стеринов обеспечивается боковой цепью при 17-ом атоме углерода. К основным ферментам, модифицирующим боковую цепь стеринов, стерин- Δ^{24} -С24-стерин метилтрансферазы (SMT1 SMT2), относятся: И изомераза/редуктаза (DIM/DWF1), C22-стерин десатураза (CYP710A) (Benveniste, 2004). Баланс между 24-метил- и этилстеринами является специфичным для отдельного вида растений, и регуляция состава и соотношения различных типов стеринов, как предполагается, является ключевым звеном многих клеточных процессов (Schaller, 2003).

Многообразие стеринов

В растениях помимо свободных стеринов присутствуют значительные количества эфиров, гликозидов и ацилгликозидов стеринов, наличие которых не характерно для животных. Стерины могут находиться в сопряжении с высшими жирными кислотами (ЖК) с образованием сложных эфиров стеридов, углеводами (в основном, с глюкозой) с образованием стероидных гликозид стеролинов или с теми и другими одновременно. При взаимодействии стеринов с глюкозой и последующем ацилировании ЖК образуются стерилгликозиды И ацилстерилгликозиды (рис. 3) (Wojciechowski, 1991; Nyström et al., 2007; Grille et al., 2010). Показано, что конъюгаты стеринов, стерилгликозиды, могут служить в качестве транспортера сахара или для хранения стеринов, а также возможна их роль в передаче сигналов (Grille et al., 2010). Стерины также могут выступать субстратами для синтеза широкого спектра вторичных метаболитов, обладающих защитными свойствами, таких как фитоалексины, гликоалкалоиды, карденолиды и стероидные сапонины (Ginzberg et al., 2009).



Рис. 3. Примеры различных конъюгатов стеринов (Piironen et al., 2000).

Растительные стерины, в частности, β -ситостерин, входят в состав многих лекарственных и витаминных препаратов, нормализующих липидный обмен и снижающих уровень холестерина у людей. В сочетании с сапонинами стерины растений проявляют гиполипидемическую и ангиопротекторную активность (Rao, Koratkar, 1997; Normén *et al.*, 2000).

Брассиностероиды

Во многих организмах стерины являются предшественниками соединений с высокой физиологической активностью, таких как стероидные гормоны животных (половые гормоны, кортикостероиды И дp.), регулирующих процессы жизнедеятельности у животных и человека (Frye, 2009); витамины группы D; экдистероиды насекомых, регулирующие процессы развития личинок и линьку (Dulta, 1991); грибов половые гормоны антеридиолы И оогониолы;

18

брассиностероиды растений, важнейший класс фитогормонов, вовлеченных в рост и развитие растений (Hartmann, 1998; Clouse, 2000; Bishopa, Koncz, 2002; He *et al.*, 2003; Lindsey, 2003; Benveniste, 2004; Wang, 2006). Брассиностероиды (БР) обладают сильной ростостимулирующей активностью и способны проявлять физиологические эффекты в очень низких концентрациях. Известно, что БР принимают активное участие в элонгации клеток растений, морфогенезе органов, клеточном делении, модуляции гормональных ответов, а также в ответной реакции клеток на стрессовые воздействия, в том числе при атаке патогенов (Nakashita *et al.*, 2003). БР являются гидроксилированными производными холестана, и их структуры включают вариации в кольцах A и B, а также в боковой цепи при C17. Эти соединения могут быть классифицированы как C27, C28, и C29 БР в зависимости от длины боковой цепи (Bajguz, Tretyn, 2003). В растениях было охарактеризовано 65 свободных БР и 5 конъюгатов (Piotrowska, Bajguz, 2011). Брассинолид (БС) – один из наиболее активных представителей БР (рис. 4), впервые выделенный из пыльцы рапса (*Brassica napus*) (Grove *et al.*, 1979).



Рис. 4. Структурная формула брассинолида.

В настоящее время в сельском хозяйстве в качестве удобрения широко применяется синтетический аналог БС «Эпин» – антистрессовый препарат, обладающий сильной ростостимулирующей активностью.

Оксистерины

Стерины могут быть подвергнуты автоокислению с образованием оксистеринов, в результате чего образуются кольцевые продукты, такие как гидрокси-, кето-, эпокси- и триолпроизводные. Исследование биологических эффектов оксистеринов проводится, в основном, на мембранах животного происхождения (Russell, 2000; Schroepfer, 2000; Björkhem, Diczfalusy, 2002). Информация о растительных оксистеринах и их роли в метаболизме растительных клеток практически отсутствует. Было выдвинуто предположение, что, поскольку растительные стерины имеют большое структурное сходство с холестерином, аналогичные продукты окисления могут быть образованы и из растительных стеринов (Daly et al., 1983). В растениях было обнаружено минорное количество различных производных оксистеринов (рис. 5) (Hartmann, 1998; Schroepfer, 2000; Plat et al., 2001). Предполагается, что окисление растительных стеринов возможно как путем ферментативных, так и неферментативных реакций в естественных условиях (Li, Przybylski, 1995). Кроме того, в результате ферментативных реакций могут быть окислены не только циклические кольца, но и боковая цепь. В зависимости от природы и местоположения кислородной группы, оксистерины поразному воздействуют на биофизические свойства мембраны, изменяя ее текучесть и проницаемость для катионов, аминокислот и моносахаров (Boissonneault et al., 1991; Luu et al., 1991). Показано, что в клетках животных оксистерины обладают цитотоксичностью и индуцируют окислительный стресс (Leonarduzzi et al., 2006). Во многих исследованиях показано, что оксистерины являются сигнальными молекулами, выполняющими разнообразные регуляторные функции в клетке (Schroepfer, 2000; Björkhem, Diczfalusy, 2002; Leonarduzzi et al., 2006). Оксистерины вовлечены в регуляцию таких процессов как поглощение Ca²⁺, апоптоз, клеточная дифференцировка и транскрипционная активность (Jaworski et al., 2001). Продукты автоокисления холестерина могут служить в качестве потенциальных эндогенных биомаркеров окислительного стресса (Iuliano et al., 2003; Ferderbar et al., 2007).



Рис. 5. Оксипроизводные β -ситостерина (Plat *et al.*, 2001).

По сравнению с холестерином, оксистерины имеют бо́льшую подвижность и полярность, что позволяет им функционировать в качестве транспортных форм холестерина. Синтез растительных стеринов происходит в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), однако стерины там не накапливаются, а транспортируются через комплекс Гольджи в ПМ (Boutté, Grebe, 2009). В отличие от клеток животных и грибов, где транспорт стеринов осуществляется с помощью оксистеринсвязывающих белков (OSBP), мало что известно о механизмах транспорта вновь синтезированных стеринов из ЭПР к ПМ в растительных клетках (Beh *et al.*, 2001; Levine, Murno, 2001; Olkkonen, Lehto, 2004). Оксистерин-связывающие белки – цитозольные белки, имеющие высокое сродство к оксистеринам, являются прямыми транспортерами оксистеринов в клетке. Кроме того, они вовлечены в метаболизм стеринов, везикулярный транспорт и трансдукцию сигнала (Björkhem *et al.*, 2002; Fairn, McMaster, 2008). Помимо оксистеринов, OSBP также могут связывать различные липиды, в том числе фосфоинозитиды, эргостерин и холестерин (Fairn, McMaster, 2005; Im *et al.*, 2005). В арабидопсисе был обнаружен подобный OSBP, который напрямую связывается с β -ситостерином и, возможно, участвует в экспорте стеринов из ЭПР в ПМ (Boutté, Grebe, 2009). В настоящее время в арабидопсисе обнаружено 12 OSBP белков, в рисе – 6 OSBP белков, также гомологичный белок был обнаружен в сое (Li *et al.*, 2008; Umate, 2011). Таким образом, большое разнообразие производных растительных стеринов и их конъюгатов может свидетельствовать о многообразии выполняемых ими функций в растениях.

1.2. Функции стеринов в растениях

1.2.1. Стерины как компонент мембран

Как и в клетках животных и грибов, в растительной клетке свободные стерины локализованы преимущественно в ПМ. Стерины присутствуют в малых количествах в ЭПР (Hartmann, Benveniste, 1987), тонопласте (Yoshida, Uemura, 1986) и мембранах митохондрий (Méance et al., 1976). Показано, что относительно небольшая доля стеринов присутствует в мембранах хлоропластов, но они отсутствуют мембранах тилакоидов (Hartmann, Benveniste, 1987). По сравнению с другими мембранными системами, для ПМ характерно высокое содержание стеринов (Hartmann, Benveniste, 1987). В отличие от ПМ животной клетки, для ПМ растений характерна высокая вариабельность стеринового состава в зависимости от вида растения, органа и ткани (Bretscher, Munro, 1993). Например, у ячменя (Hordeum vulgare L.) в ПМ корневых клеток количество свободных стеринов превышает количество ФЛ более чем в 2 раза, тогда как в листьях ФЛ больше, чем стеринов почти в 1,5 раза (Rochester et al., 1987). В листьях шпината (Spinacia oleracia) соотношение ФЛ/свободные стерины почти на порядок выше – 9:1 (Rochester et al., 1987). Клеточная концентрация свободных стеринов и их факторы, внутриклеточное распределение жестко регулируются, но поддерживающие количество стеринов в ПМ, пока не ясны.

Ранее были выявили некоторые структурные особенности стеринов,

необходимые для их встраивания в мембраны и выполнения ими структурной функции: это свободная З*β*-гидроксильная группа, плоский тетрациклический скелет и алифатическая боковая цепь с 8-10 атомами углерода (Bloch, 1983). Основные растительные стерины (β -ситостерин, стигмастерин и кампестерин) обладают этими характеристиками. Эксперименты на модельных мембранах из фосфатидилхолина (ФХ) и стеринов сои показали, что все растительные стерины могут регулировать текучесть мембран, но с разной эффективностью (Schuler et al., 1990, 1991; Krajewsky-Bertrand et al., 1992). β-Ситостерин и кампестерин способны регулировать текучесть и проницаемость мембран путем взаимодействия с насыщенными алкильными цепями ФЛ и сфинголипидов, ограничивая их подвижность таким же образом, как и холестерин в клетках млекопитающих По сравнению с *β*-ситостерином, стигмастерин (Hartmann, 1998). имеет дополнительную двойную связь при С22 в боковой цепи (рис. 2 В), что делает алкильную цепь менее гибкой из-за жесткости двойной связи и, следовательно, влияет на встраивание и размещение стигмастерина в липидном бислое. Экспериментально встраивание доказано. что стигмастерина между динасыщенными и мононенасыщенными цепями ЖК имеет меньшую степень упорядоченности по сравнению с β -ситостерином (Hodzic *et al.*, 2008). Этот эффект ДЛЯ полиненасыщенных липидов, еше значительнее выражен имеющих более двойной одной связи. Например, особенностью пальмитоилолеилфосфатидилхолина является наличие цис-двойной связи в положении С9 ненасыщенной цепи, которая приводит к «негибкому излому» цепи. Следовательно, снижение взаимодействия может быть объяснено несоответствием между транс-двойной связью молекулы стерина и цис-двойными связями липидной углеводородной цепи, образующими своего рода стереохимическую конформацию несовместимости (Hodzic et al., 2008). Возможно, стигмастерин выполняет не основную структурную функцию в ПМ, а несколько другую, есть предположение, что он играет регуляторную роль в клетке (Hartmann, 1998). Например, было показано, что стигмастерин стимулирует активность Н⁺-АТФазы ПМ в корнях кукурузы, в отличие от его С22-насыщенного аналога β-ситостерина (Grandmougin-Ferjani et al., 1997).

Таким образом, свободные стерины, входящие в состав ПМ, регулирует текучесть и проницаемость мембран, а также функционирование мембраносвязанных ферментов и рецепторов (Hartmann, 1998; Lee, 2004). Небольшие различия в молекулярной структуре стеринов могут влиять на мембранные свойства и связаны с их различной ролью в биологических системах. Растительные *в*-ситостерин кампестерин, стерины И вероятно, являются основными структурными компонентами биологических мембран и играют ту же роль, что и холестерин в клетках животных. Стигмастерин, а также холестерин в клетках растений, возможно, вовлечены в другие процессы. Известно, что некоторые виды растений используют холестерин в качестве предшественника для защитных веществ, таких как, гликоалкалоиды в картофеле (Ginzberg et al., 2009). Информация о структурных особенностях растительных стеринов способствует пониманию механизмов регуляции физико-химического состояния И функционирования мембран растительных клеток. За последнее десятилетие исследование функций растительных стеринов вышло на новый уровень. Помимо основной структурной роли, которая приписывалась им изначально, в настоящее время стеринам отводятся также регуляторная и сигнальная функции (He et al., 2003).

1.2.2. Роль стеринов в трансдукции сигнала

Взаимосвязь стеринов и сфинголипидов

В литературе имеются свидетельства участия стеринов в трансмембранной трансдукции сигналов внутрь клетки. Это осуществляется посредством специфических липидных формирования микродоменов рафтов (от или английского слова «raft» - плот), обогащенных стеринами и сфинголипидами (Mongrand et al., 2004; Bhat, 2005; Martin et al., 2005; Jacobson et al., 2007; Cacas et al., 2012). Часто в литературе эти два класса липидов, стерины и сфинголипиды, называют «рафтообразующими». Рафты могут служить платформами, на которых локализуются ферментные и сигнальные комплексы (Laloi et al., 2007; Zauber et al.,

2014). Липидные микродомены представляют собой гетерогенные и нестабильные структуры размером от 50 до 200 нм, обогащенные стеринами, сфинголипидами, насышенными ФЛ и белками (рис. 6) (Mongrand *et al.*, 2004; Bhat, 2005; Martin *et al.*, 2005; Jacobson *et al.*, 2007). Первоначально липидные микродомены были обнаружены и хорошо изучены в животных и дрожжевых клетках (Harder, Simons, 1997; Brown, London, 2000; Martin, Konopka, 2004; Pike, 2009; Lingwood, Simons, 2010). Однако в последние годы появились данные, свидетельствующие о том, что в клетках растений также образуются липидные микродомены (Bhat, 2005; Martin *et al.*, 2005; Beck *et al.*, 2007; Laloi *et al.*, 2007).

Гликозилинозитол-фосфоцерамиды являются основными сфинголипидами ПМ растительной клетки (Markham *et al.*, 2006; 2013), а также липидных рафтов (Borner *et al.*, 2005). Они встречаются только в растениях и грибах, в том числе дрожжах (Sperling, Heinz, 2003; Sperling *et al.*, 2005).



Рис. 6. Схема организации липидного микродомена. В состав микродомена входят стерины, сфинголипиды, насыщенные ФЛ и белки (Bhat, 2005).

Показано, что гликозилинозитол-фосфоцерамиды имеют повышенное сродство к растительным стеринам, обусловленное Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями боковых цепей стеринов с насыщенными алкильными цепями сфинголипидов, что определяет их плотную упаковку и способствует образованию липидных микродоменов (Borner *et al.*, 2005).Биологическими функциями липидных микродоменов являются рецепция и трансдукция клеточного сигнала, регуляция экзоцитоза, эндоцитоза и апоптоза, внутриклеточный транспорт и др. (Simons, Toomre, 2000; Garcia *et al.*, 2003; Parton, 2003; Wickstrom *et al.*, 2003; Falk *et al.*, 2004; Salaun *et al.*, 2004). Показано различное участие свободных и конъюгированных стеринов в формировании упорядоченных доменов (Furt *et al.*, 2007; Mongrand *et al.*, 2010). Есть предположение, что соотношение β -ситостерин/стигмастерин может влиять на физико-химические свойства упорядоченных микродоменов и, тем самым, модулировать защитные ответы растиви (Griebel, Zeier, 2010).

липидомике дают возможность получить Современные подходы в информацию о разнообразии функций стеринов и сфинголипидов у эукариот. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что эти два класса липидов функционируют вместе (Holmberg et al., 2003). Показано, что оба класса липидов принимают участие в регуляции мембранного транспорта (Guan et al, 2009; Hannich et al., 2011). Промежуточные соединения биосинтеза и деградации сфинголипидов участвуют в сигнальных путях (Worrall et al., 2003). Кроме того, начальный этап мевалонатного пути синтеза изопреноидов является точкой пересечения путей биосинтеза стеринов и сфинголипидов. Это было продемонстрировано в экспериментах с использованием мириоцина, специфического ингибитора серин пальмитоилтрансферазы, первого фермента сфинголипидного биосинтеза. В частности, обработка A. thaliana мириоцином приводила не только к подавлению синтеза сфинголипидов, но и понижала активность 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы (HMGR) и содержание стеринов, что может свидетельствовать о перекрестной регуляции двух путей биосинтеза липидов (Nieto et al., 2009).

В работах Валитовой с соавт. (2010, 2011) было показано, что при действии стерин-связывающего агента нистатина происходило значительное уменьшение

содержания стеринов в клетках корней пшеницы, которое сопровождалось двукратным увеличением общего содержания ГлЦер (Валитова и др., 2010; Valitova *et al.*, 2011). Кроме того, связывание стеринов нистатином в корнях пшеницы приводило к снижению концентрации молекулярных видов ГлЦер, содержащих длинноцепочечные ЖК, например, d18:1 Δ 8/h22:0 (Valitova *et al.*, 2011). Как показали исследования, проведеные на животных клетках, нарушение взаимодействия между стеринами и сфинголипидами может быть причиной различных заболеваний человека (Puri *et al.*, 1999; Pagano *et al.*, 2000; Vance *et al.*, 2006). Таким образом, данные современной литературы свидетельствуют о тесной физиологической взаимосвязи между стеринами и сфинголипидами.

1.2.3. Роль стеринов в росте и развитии растений

Анализ биохимических и фенотипических характеристик множества растительных мутантов с нарушением биосинтеза стеринов пост-скваленового сегмента способствовал расширению представлений относительно роли стеринов в развитии растений. Летальность мутаций на ранних стадиях развития показывает, что стерины являются незаменимыми клеточными компонентами (Schaller, 2003). Кроме того, у мутантов наблюдалось аномальное эмбриогенное клеточное деление, приводящее к нарушениям в морфологии семядолей, гипокотиля, корешков. Известно также, что *β*-ситостерин и стигмастерин играют определящую роль в клеточной дифференциации и пролиферации (Piironen, 2000). Показано, что при прорастании семян происходит активный синтез стеринов, о чем свидетельствует увеличение общего содержания свободных стеринов. В процессе созревания семян скорость синтеза стеринов постепенно уменьшается (Guo et al., 1995). Имеются также данные о важной роли стеринов в биосинтезе целлюлозы в процессе формирования клеточной стенки (Peng et al., 2002; Schrick et al., 2004). Все эти данные свидетельствует о том, что стерины служат сигнальными и/или регуляторными молекулами, вовлеченными в процессы роста и развития растения.

Большую роль в росте и развитии растений играют производные стеринов – гормоны БР. Брассиностероиды являются важными регуляторами роста растений,

действующие в нано- и микромолярных концентрациях. В больших дозах БР ингибируют рост и повышают устойчивость к неблагоприятным внешним инфекции, действие факторам (перегрев, заморозки, затопление, засуха, пестицидов, засоление почвы и др.). Известно, что БР принимают активное участие в элонгации клеток растений и морфогенезе органов, клеточном делении, модуляции гормональных ответов, экспрессии генов и в реализации ответных реакций клеток на стрессовые воздействия (Hartmann, 1998; Clouse, 2000; Bishopa, Koncz, 2002; He et al., 2003; Lindsey, 2003; Benveniste, 2004; Wang, 2006). Фитогормон БС – один из наиболее активных представителей БР, структурно сходных со стероидными гормонами животных, оказывает большое влияние на различные процессы жизнедеятельности растений, в том числе рост, прорастание семян, активность фотосинтеза, фиксацию азота, повышение устойчивости к холоду, патогенам, засолению (Шакирова, 2001; Khripach et al., 2000). Существует предположение о вовлечении БР в передачу светового сигнала – фотоморфогенез (Clouse, 2011; Gudesblat, Russinova, 2011). Кроме того, БР индуцируют переход от вегетативного к репродуктивному росту растений, стимулируя тем самым цветение (Domagalska et al., 2007). Другие функции БР включают регуляцию биосинтеза этилена путем активации синтеза 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, гиперполяризации мембран, индукции синтеза ДНК, РНК и белка, увеличения активности инвертазы, стимулирования активности фотосинтеза и изменения в балансе других эндогенных фитогормонов (Sasse, 2003).

Изучение мутантов арабидопсиса позволило выявить два типа брассиностероидных мутантов. К первому типу относятся мутанты с нарушениями в биосинтезе (например, *dwarf*), фенотип которых может восстанавливаться экзогенной обработкой БС. Второй тип брассиностероидных мутантов связан с нарушением процессов рецепции (например, *BRI1* – BRassinosteroid-Insensitive1 receptor) (Li, Chory, 1997; Nomura *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Kinoshita *et al.*, 2005) и/или прередачи гормонального сигнала (например, *BAK1* – BRI1-Associated receptor Kinase1) (Li *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002), поэтому обработка экзогенным гормоном не оказывала на них влияния. Интересно отметить, что все мутанты характеризуются карликовостью, темно-зеленой окраской листовой пластинки, частичной или полной утратой фертильности, задержкой старения, изменением ответных защитных реакций (Clouse, Sasse, 1998; Clouse, 2002). Помимо арабидопсиса, мутации в генах, кодирующих ключевые биосинтетические ферменты, обнаружены и изучены в томатах (Bishop *et al.*, 1999), горохе (Jager *et al.*, 2007), рисе (Hong *et al.*, 2003).

В настоящее время показано, что стерины играют важную роль в процессе эндоцитоза, в частности, при формировании клеточной полярности. Множество работ посвящено исследованию зависимости эндоцитоза и транспорта PIN белков - трансмембранных переносчиков ауксина - от стеринового состава мембран (Carland et al., 2002; Souter et al., 2002). Обнаружено, что в мутантах арабидопсиса *smt1*^{orc} с нарушенным биосинтезом стеринов наблюдалось нарушение полярности клеток корней, что приводило к изменениям в морфологии растения и гравитропизма (Souter et al., 2002; Betts, Moore, 2003; Willemsen et al., 2003; Titapiwatanakun et al., 2009). Было сделано предположение, что формирование полярности зависит от транспорта ауксина. Действительно, с использованием GFP (green fluorescence protein) меченого PIN белка показано, что у данного мутанта с нарушенным биосинтезом стеринов происходило изменение локализации и встраивания данного PIN белка в конкретные участки базальных и апикальных мембран клеток (Carland et al., 2002; Souter et al., 2002). Было сделано предположение, что PIN белок входит в состав липидных рафтов, и его встраивание зависит от стеринового окружения (Carland et al., 2002; Betts, Moore, 2003). Эти данные свидетельствуют о том, что сбалансированный стериновый состав является необходимым условием для полярности клеток, транспорта ауксина И гравитропизма корней (Souter *et al.*, 2002; Beck *et al.*, 2007).

1.2.4. Роль стеринов в стрессовом ответе растительных клеток

Мембранные липиды растительной клетки в силу своей лабильности динамично реагируют на любые воздействия и изменения, происходящие с клеткой (Чиркова, 1997, 2002; Смирнов, Богдан, 2007; Макаренко и др., 2010). При воздействии абиотических стрессовых факторов окружающей среды на растение, клеточные мембраны выступают в роли своеобразной мишени, принимая удар на себя, что зачастую это может привести к их повреждению и нарушению деятельности растительной клетки в целом (Campos *et al.*, 2003). Нарушение целостности клеточной мембраны и последующая утечка ионов являются неспецифическими последствиями действия различных неблагоприятных фактораов внешней среды, особенно температурных колебаний (Larkindale, Knight, 2002). В связи с этим, анализ стабильности клеточных мембран и изменений в липидном составе обычно используются для оценки устойчивости растений при различных абиотических стрессах (Senthil-Kumar *et al.*, 2003; Farooq, Azam, 2006).

Известно, что содержание структурных липидов, в том числе стеринов, и текучести мембран сооветствующее изменение играют важную роль В формировании адаптации растений (Dufourc, 2008; Wang et al., 2012; Senthil-Kumar et al., 2013). Наличие стеринов оказывает стабилизирующее воздействие на мембраны и способствует упорядочению структурных компонентов мембран. Как известно, модуляция стеринового компонента мембран приводит к изменениям в составе других мембранных липидов и, как следствие, влияет на проницаемость и функционирование мембран (Валитова и др., 2010; Wang, Faust, 1990). В ряде работ имеются сведения об увеличении степени насыщенности ЖК остатков ФЛ и содержания стеринов в мембранах растений при раневом стрессе (Лыгин и др., 1990; Гордон, 1992; Алексеева и др., 2006; Vu et al., 2014). В частности, при раневом стрессе в клетках активируются фосфолипазы D и A, окисляются ЖК галактолипидов и происходит ацилирование моногалактозилдиацилглицеридов (МГДГ) (Narváez-Vásquez et al., 1999; Zien et al., 2001; Ryu, 2004; Buseman et al., 2006; Vu et al., 2014). Под влиянием гипо- и аноксии содержание ФЛ, а также интенсивность их метаболизма снижаются (Чиркова, 2002). Показано, что растения, выращенные на засоленных почвах, характеризуются измененным содержанием стеринов и ФЛ в мембранах. Эти изменения в липидном составе приводят к нарушениям активного и пассивного транспорта через мембрану, снижению активности мембранных ферментов (Klahre et al., 1998). В работе Khan

с соавт. (2009) было показано токсическое действие алюминия на проростки риса, которое приводило в первую очередь в увеличении проницаемости ПМ, связанному с уменьшением общего содержания стеринов и увеличением ФЛ сопровождалось ингибированием роста корней (Khan *et al.*, 2009).

Пониженная или повышенная температура также является стрессовым воздействием, влияющим на физико-химическое состояние мембран растительных клеток. Известно, что холодовой стресс значительно изменяет липидный состав мембраны, в том числе степень ненасыщенности фосфо- и гликолипидов и относительное соотношение стеринов, цереброзидов и ФЛ, в частности, ФХ (Макаренко и др., 2010; Uemura, Steponkus, 1999; Bohn et al., 2007). Холодовая акклиматизация проростков пшеницы в течение трех недель при +2° С приводила к увеличению на 13-16% уровня свободных стеринов. В отличие от стеринов, уровень всех гликолипидов снижался. Кроме того, наблюдалось значительное снижение содержания стерилгликозидов и ацилстерилгликозидов. Эффекты холодовой акклиматизации на фосфолипидный состав были незначительными, в наблюдалось ΦХ частности, заметное увеличение количества И фосфатидилэтаноламина (Φ Э) (Bohn *et al.*, 2007). Во фракции ПМ арабидопсиса холодовая акклиматизация в течение двух дней приводила к увеличению содержания ФЛ и свободных стеринов и уменьшению доли сфинголипидов (Minami et al., 2010). Было показано, что в растениях ржи концентрация мембранных стеринов увеличивается в холодное время, и этот эффект более выражен у устойчивых сортов ржи (Uemura, Steponkus, 1994). При холодовом стрессе происходит сверхэкспрессия ряда ферментов липидного, в том числе стеринового, биосинтеза (Badea, Basu, 2009; Byun et al., 2014). Интересно, что при акклиматизации к холоду проростков сои содержание β -ситостерина увеличивалось, а кампестерина оставалось неизменным, что, возможно, обусловлено сверхэкспрессией SMT2 (Neelakandan et al., 2010).

Известно, что холодовой стресс характеризуется активацией окислительных процессов в клетке (Kendall, McKersie, 1989; Chinnusamy *et al.*, 2007). Окислительный стресс возникает в результате действия практически всех

неблагоприятных факторов внешней среды, включая засуху, почвенное засоление, загрязнение воздуха токсическими соединениями, такими как озон, оксиды серы, при действии тяжелых металлов, неблагоприятных температур и др. (Hung *et al.*, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2007). В настоящее время известно, что важную роль в ответной реакции клеток на действие прооксидантов играют стерины. В работах многих исследователей было показано, что β -ситостерин обладает высокой антиоксидантной активностью (Weng, Wang, 2000; Wang *et al.*, 2002; Vivancos, Moreno, 2005; Pose *et al.*, 2009), в частности, он способен нейтрализовать свободные радикалы дифенилпикрилгидразила (донора супероксид аниона). Мутанты с повышенным содержанием β -ситостерина обладали большей устойчивостью к окислительному стрессу, по сравнению с диким типом (Wegener *et al.*, 1997). Было показано, что при экзогенном добавлении АФК-генерирующих соединений индуцируется биосинтез стигмастерина в листьях арабидопсиса (Griebel, Zeier, 2010).

Наряду с незначительными изменениями в составе фосфо- и гликолипидов, изменения состава стеринового компонента в растительных клетках в стрессовых условиях являются важным фактором формирования стрессового ответа. Было высказано предположение, что, в отличие от животных, уникальная способность растений к синтезу 24-этилстеринов (β-ситостерина и стигмастерина) может быть частью эволюционного процесса адаптации к стрессовым условиям и поддержания важных мембранно-связанных процессов метаболизма (Dufourc, 2008). Кроме того, важным показателем состояния растительных мембран является отношение стигмастерина к β -ситостерину. Соотношение стигмастерина и β -ситостерина в мембране может влиять на ответ растительных клеток на различные биотические и абиотические стрессовые воздействия (Hartmann, 1998; Arnqvist et al., 2008; Griebel, Zeier, 2010; Wang et al., 2012; Senthil-Kumar et al., 2013). Так, было показано, что мутанты арабидопсиса (AtCYP710A1) со сверхэкспрессией гена C22-стерин катализирующей реакцию образования стигмастерина вдесатуразы, ИЗ ситостерина, характеризуются большим содержанием стигмастерина И повышенной устойчивостью к низким и высоким температурам (Senthil-Kumar et al., 2013). В растениях арабидопсиса показано патоген-индуцированное увеличение содержания стигмастерина, что, в свою очередь, приводило к мембран, уменьшению проницаемости И, как следствие, к повышению устойчивости растения к неспецифическому патогену. Мутанты арабидопсиса с нуль-мутацией того же гена (Atcyp710a1) имели повышенную чувствительность к бактериальным патогенам (Griebel, Zeier, 2010; Wang et al., 2012). Кроме того, показано, что растения Vicia faba, предварительно обработанные экзогенным стигмастерином, обладали повышенной устойчивостью к засолению за счет активации антиоксидантной системы. В частности, наблюдалось увеличение аскорбат пероксидазы активности каталазы И И повышение уровня восстановленного глутатиона, а также уменьшение окислительных повреждений мембран (снижение уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) и повышение индекса стабильности мембран) (Hassanein et al., 2012). Таким образом, высокое содержание стигмастерина в ПМ может изменять ее текучесть и проницаемость и ограничивать, тем самым, выход веществ в апопласт (Schuler et al., 1991; Hartmann, 1998; Wang et al., 2012). На основании данных литературы можно предположить, что стигмастерин, который находится в минорных количествах в ПМ растений, является «стрессовым» стерином.

Таким образом, характерной особенностью растений является богатый и многообразный стериновый что состав, имеет, по-видимому, большое физиологическое значение для роста и развития растительного организма и его устойчивости и адаптации к стрессовым условиям (Schaller, 2004). Можно заключить, что многообразие видов растительных стеринов и вариабельность их соотношений с другими мембранными липидами лежит в основе механизма участия стеринового компонента в ответных реакциях растений на стрессовые воздействия. Однако биохимические механизмы вовлечения стеринов В функционирование растительных мембран остаются недостаточно изученными. Изучение функционирования клеток при модуляции стеринового компонента способствовать может пониманию стерин-опосредованных регуляторных механизмов.

1.3. Стерин-связывающие агенты: нистатин и метил-*β*-циклодекстрин

Изменения стеринового компонента влекут за собой значительные изменения в функционировании мембран, метаболизма клетки и организма в целом. Показано, что изменение в содержании мембранных стеринов в проростках арабидопсиса вызывает генерацию АФК и этилена и, в конечном итоге, приводит к преждевременному старению клеток (Kim *et al.*, 2010). Истощение стеринов может привести к разрушению микродоменов и высвобождению их содержимого из мембран (Pike, Miller, 1998). В работе Cheng с соавт. (2006) было обнаружено, что истощение мембранного холестерина в фибробластах млекопитающих, вызванное М β CD, индуцирует макроаутофагию (Cheng *et al.*, 2006).

Существует множество подходов для исследования роли стеринового компонента во внутриклеточных процессах, например, с помощью добавления экзогенных (насыщения) или связывания эндогенных стеринов (истощения). Искусственная модификация стеринового компонента может быть осуществлена путем применения различных специфических агентов. К ним относятся такие стерин-связывающие агенты, как полиеновый антибиотик нистатин и макроциклический олигосахарид МβCD.

1.3.1. Нистатин

Впервые нистатин был выделен из *Streptomyces noursei* в 1950 году. Этот полиеновый антибиотик специфически связывается с эндогенными стеринами с образованием пор (каналов) (рис. 7) (Andreoli, Monahan, 1968; Marty, Finkelstein, 1975).



Рис. 7. Структурная формула нистатина.

«Нистатиновые» поры состоят двух субъединиц, содержащих ИЗ гидрофильные гидроксильные группы вдоль поверхности поры и гидрофобный гептановый сегмент, который взаимодействует со стеринами и гидрофобным окружением бислоя. Были предложены молекулярные модели пор, образующихся в мембранах, обработанных нистатином (рис. 8) (Finkelstein, Holz, 1973). Как известно, нистатин увеличивает ионную проницаемость стерин-содержащих биологических и искусственных мембран, вызывая вытекание из клетки ионов, воды, аминокислот и белков (Гордон и др., 2005; Coutinho et al., 2004). Образование таких пор приводит к закислению внутриклеточного содержимого посредством K^+/H^+ - или K^+ - углеводного обмена, потере эфиров фосфора, органических кислот, нуклеотидов и белков. Показано, что нистатин легко проникает в монослой холестерина или эргостерина, но не взаимодействует с ФЛ (Coutinho et al., 2004). Мутанты с дефектами на поздних этапах биосинтеза стеринов характеризуются пониженной чувствительностью к полиенам, таким как нистатин, которые нарушают целостность мембраны, хотя прямой связи между устойчивостью к нистатину и дефектами в биосинтезе эргостерина не выявлено (Molzahn, Woods, 1972). Применение нистатина является эффективным инструментом для изучения роли стеринового компонента в различных процессах, протекающих в живых клетках. Исследования с использованием нистатина проводились, в основном, на животных клетках или модельных мембранах. Влияние нистатина на растительные клетки остается, однако, малоизученным.



Рис. 8. Модель «нистатиновой» поры (Finkelstein, Holz, 1973).

Ранее в нашей лаборатории было показано, что при нарушении ионной наблюдается проводимости плазмалеммы нистатином активизация энергетического обмена, что выражается в усилении дыхания и теплопродукции, увеличиваются энергетические затраты на активацию протонной АТФазы и на синтез липидных компонентов мембраны (Гордон и др., 2005). Оба этих процесса направлены на «ликвидацию» нарушения ионного гомеостаза клеток. Предполагается следующая цепь событий в клетке в ответ на действие нистатина: формирование нистатиновых каналов – вход протонов в клетки – деполяризация плазмалеммы – выход из клетки ионов К⁺, приводящий к нарушению ионного гомеостаза, – активация работы H⁺-АТФазы, осуществляющей выброс протонов из клетки, – возрастание «запросов» энергии для функционирования Н⁺-АТФазы – увеличение интенсивности потребления кислорода и теплопродукции (Гордон и др., 2005). Проведенный в нашей лаборатории анализ состава мембранных липидов показал, что при действии нистатина содержание в корнях растительных стеринов, в частности β-ситостерина, уменьшается, в то время как содержание комплексных представленных преимущественно сфинголипидов, ГлЦер, увеличивается (Валитова и др., 2010; Valitova et al., 2011). В ходе исследования качественного состава ГлЦер методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением установлено, что под действием нистатина изменяется соотношение молекулярных видов ГлЦер. Было сделано предположение, что модификация стеринового компонента может влиять на функционирование мембран посредством изменения сфинголипидного состава липидных рафтов (Валитова и др., 2010).

Таким образом, можно заключить, что нарушение целостности мембран клеток и увеличение мембранной проницаемости для различных ионов, а также изменение липидного компонента мембран (стериновое истощение) может приводить к нарушению нормального функционирования клеток.

1.3.2. Метил-β-циклодекстрин

Циклодекстрины – углеводы, циклические олигомеры глюкозы, получаемые ферментативным путем из крахмала. Впервые циклодекстрины были
обнаружены в 1891 г. М. Вилльерсом (М.А. Villiers), исследовавшим продукты метаболизма бактерий *Clostridium butyricum* и давшим первое описание этих кристаллических углеводов под названием «целлюлозин» (cellulosine). Наибольший вклад в исследование циклодекстринов в 1903–1911 годах внёс Ф. Шардингер (F. Schardinger), в честь которого они длительное время назывались декстринами Шардингера.

Циклодекстрины различают по количеству остатков глюкозы, содержащихся в одной их молекуле. Так, простейший представитель – αциклодекстрин – состоит из 6 глюкопиранозных звеньев. β-циклодекстрин содержит 7, а γ-циклодекстрин – 8 звеньев. Именно эти три типа циклодекстринов наиболее распространены и исследованы.

Форма молекул циклодекстринов в грубом приближении представляет собой тор, также напоминающий полый усечённый конус. Данная форма стабилизирована водородными связями между ОН-группами, а также *α*-D-1,4-гликозидными связями. Все ОН-группы в циклодекстринах находятся на внешней поверхности молекулы. Поэтому внутренняя полость циклодекстринов является гидрофобной и способна образовывать в водных растворах комплексы включения с другими молекулами органической и неорганической природы. В комплексах включения кольцо циклодекстрина является «молекулой-хозяином», включённое вещество называют «гостем».

Широкое распространение получили экспериментальные подходы с использованием метил- β -циклодекстрина (М β CD) (Zidovetzki, Levitan. 2007). М β CD – циклический олигосахарид, имеющий полярную гидрофильную внешнюю поверхность и неполярную липофильную внутреннюю полость (рис. 9). Он известен как вещество, способствующее извлечению стеринов из мембраны (Singh *et al.*, 2002). В настоящее время использование М β CD является одним из наиболее часто применяемых методических подходов для изучения функциональной роли стеринов и стерин-связанных мембранных белков, как в животных, так и растительных клетках (Ilangumaran, Hoessli, 1998; Foster *et al.*, 2003; Zidovetzki, Levitan, 2007; Kierszniowska *et al.*, 2009).



Рис. 9. Структурная формула МβCD.

Показано, что обработка препарата синаптосом $M\beta CD$ приводит к дозозависимому уменьшению содержания мембранного холестерина до 25% (Крысанова и др., 2007). В работе Kierszniowska с соавт. (2009) МВСD использовался для идентификации стерин-связанных белков липидных рафтов у арабидопсиса. Выделенные липидные рафты разрушали с помощью MβCD и тем самым индуцировали извлечение белков, связанных со стеринами (Kierszniowska et al., 2009). В клетках ВУ-2 суспензионной культуры табака показано, что при действии MβCD содержание кампестерина, β-ситостерина и изофукостерина снижалось на 66, 54 и 47% соответственно, а содержание стигмастерина изменялось только на 35%, что, возможно, связано с большей устойчивостью к М β CD (Roche *et al.*, 2008). После обработки М β CD количество белков и общих Φ Л, связанных с мембраной фракцией, не изменялось, что подтверждает стеринспецифичность действия МВСD. Однако подходы с применением МВСD подвергались немалой критике, так как искусственная модификация in vitro вызывает нарушение структуры изолированной ПМ, что, в свою очередь, ведет к искажению результатов исследования (Tanner et al., 2011; Zauber et al., 2013).

Необходимый уровень стеринов регулируется ферментами их биосинтеза. В связи с многообразием стеринов и их функций, исследование биосинтеза этих соединений представляет большой теоретический и практический интерес. Таким образом, другим важным информативным подходом является изучение особенностей биосинтеза стеринов у растений, в том числе анализ активности генов, кодирующих ключевые белки-ферменты стеринового биосинтеза.

1.4. Биосинтез растительных стеринов

Биосинтез растительных стеринов сложен И представляет собой многоступенчатый процесс. Наиболее хорошо он изучен у модельного объекта растений арабидопсиса (Benveniste, 2004). Внутри клетки биосинтез стеринов осуществляется в цитоплазме и представляет собой последовательность более 30 ферментативных реакций, которые ассоциированы с мембранами (Benveniste, 1986; Nes, Venkatramesh, 1999; Suzuki, Muranaka, 2007; Nes, 2011; Vriet et al., 2013). Стерины производными циклопентанпергидрофенантрена являются И синтезируются по изопреноидному пути. Недавние исследования показали, что компартментация изопреноидных ферментов и совместное регулирование их активности могут влиять на стериновый метаболизм и развитие растений в целом (Benveniste, 2004; Jayasimha et al., 2006). Биосинтез стеринов у высших растений консервативен и осуществляется в три основных этапа: образование основного С₅Н₈-скелета – изопрена, циклизация сквалена, конечные модификации боковой цепи (рис. 10). Необходимо отметить, что для всех клеток животных, грибов и растений биосинтез стеринов на начальных этапах от ацетил-КоА до сквалена характеризуется образованием одинаковых промежуточных соединений (изопентенилпирофосфат, геранилпирофосфат, фарнезилпирофосфат) И осуществляется через мевалонатный путь метаболизма изопреноидов, который проходит в цитоплазме. Однако в настоящее время показано, что у некоторых бактерий и растений образование С5-единицы изопрена также вносит вклад мевалонат-независимый путь (Benveniste, 2004; Rohmer, 2008).

Ключевым ферментом изопреноидного пути растений, приводящего к синтезу разнообразных стеринов и их производных, является 3-гидрокси-3метилглютарил-кофермент A редуктаза (англ. HMG-CoA reductase, 3-hydroxy-3methyl-glutaryl-CoA reductase, HMGR, КФ 1.1.1.88).



Рис. 10. Схема основного пути биосинтеза стеринов у растений. HMGR – 3гидрокси-3-метилглютарил-КоА редуктаза; SQE1 – сквален эпоксидаза; CAS1 – циклоартенол синтаза; LAS1 – ланостерин синтаза; SMT1/2 – C24-стерин метилтрансфераза; DIM/DWF1 – стерин-Δ²⁴-изомераза/редуктаза; CYP710A – C22стерин десатураза. Пунктирные стрелки обозначают несколько ферментативных реакций.

Этот фермент катализирует реакцию превращения 3-гидрокси-3-метилглютарилкофермента А в мевалоновую кислоту (МВК) (рис. 10). Данный этап является стадией метаболического лимитирующей мевалонатного пути синтеза изопреноидов (Bach, Lichtenthaler, 1983). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей клонированных генов HMGR Saccharomyces cerevisiae и A. thaliana показал, что консервативные концевые участки, соответствующие каталитическому центру белка, имеют высокую степень гомологии (Caelles et al., 1989). Сверхэкспрессия гена *HMGR* в мутантах табака не приводила к изменениям содержания свободных стеринов в мембранах, в то время как наблюдалось избыточные образование промежуточных продуктов неосновного пути, которые накапливались в липидных каплях (Schaller et al., 1995). Функционирование фермента HMGR является определяющим в запуске биосинтеза стеринов растений и поддержании необходимого уровня стеринов в клетках растений. Далее происходит образование из МВК С5-изопрена, который полимеризуются с образованием 2,3-оксидосквалена. Большинство ферментов, участвующих в постскваленовом этапе биосинтеза стеринов, связаны с мембранами ЭПР (Hartmann, Benveniste, 1987), но участие ПМ в заключительных этапах пути синтеза (например, в синтезе стигмастерина) также не исключено. Дальнейшей специфической реакцией биосинтеза стеринов у растений является циклизация 2,3оксидосквалена с образованием циклоартенола (рис. 10). Данный этап является первым этапом расхождения путей биосинтеза стеринов у фотосинтезирующих и нефотосинтезирующих организмов (Benveniste, 1986). Основными отличиями биосинтеза стеринов у растений от биосинтеза стеринов у грибов и животных являются следующие:

1. Первым циклическим соединением, образующимся у фотосинтезирующих эукариот, является циклоартенол, а у нефотосинтезирующих – ланостерин. До недавнего времени считалось, что растения синтезируют стерины только через образование циклоартенола, в отличие от грибов и млекопитающих, у которых путь биосинтеза эргостерина и холестерина осуществляется через образование ланостерина. Однако, исследование с использованием мутантов

арабидопсиса с нокаутом гена циклоартенол синтазы (*CAS1*), в сочетании с анализом субстратов и последующим обнаружением метаболитов показало, что синтез около 1,5% стеринов происходит через ланостерин (Boutté, Grebe, 2009). Этот путь является несущественным при нормальных условиях роста (Ohyama *et al.*, 2009).

2. Фермент, раскрывающий циклопропановое кольцо (циклоэукаленол обтузифолиол изомераза), обнаружен только у высших растений.

3. Последовательность реакций деметилирования в положениях C4 и C14 отличается у животных и грибов от таковой у растений. Порядок биологического деметилирования ланостерина у грибов и животных следующий: сначала отщепляется метильная группа при C14, затем β -метильная группа при C4 и, наконец, α -метильная группа при C4. А при деметилировании стеринов у растений одна из метильных групп при C4 теряется раньше, чем происходит деметилирование при атоме C14.

4. Важнейшим этапом, определяющим образование конечных продуктов синтеза стеринов растений, является реакция С24-метилирования. Данную реакцию катализирует фермент – С24-стерин метилтрансфераза (Nes *et al.*, 2000). Этот фермент характерен для растений и грибов и отсутствует в клетках животных. Показано наличие двух типов SMT, катализирующих два последовательных этапа метилирования 24-го атома углерода боковой цепи стеринов, соответственно SMT1 и SMT2 (рис. 10) (Shi *et al.*, 1996; Bouvier-Navé *et al.*, 1997). Подробному описанию этого фермента посвящена следующая глава 1.5.

5. Стереохимическая ориентация боковых цепей при C24 (α , β -конфигурации) противоположна и строго специфично для растений и грибов (Benveniste, Rahier, 1992).

После реакции первичного метилирования основной путь биосинтеза стеринов расходится на две ветви. Одна ветвь приводит к образованию 24этилстеринов – β -ситостерина и стигмастерина, а другая к синтезу брассиностероидов через кампестерин (Diener *et al.*, 2000; Schaeffer *et al.*, 2001). Стигмастерин образуется из β -ситостерина в ходе реакции десатурации, катализируемой C22-стерин десатуразой. В ряде работ показано, что данная реакция является важной точкой, влияющей на соотношение β -ситостерина и стигмастерина, значительные изменения которого происходят в стрессовых условиях (Griebel, Zeier, 2010; Wang *et al.*, 2012; Senthil-Kumar *et al.*, 2013). В мутантных растениях CYP710A1 со сверхэкспрессией гена C22-стерин десатуразы уровень стигмастерина увеличивался в 30 раз (Morikawa *et al.*, 2006). Другая ветвь, где кампестерин после ряда последовательных реакций гидроксилирования боковой цепи с C6-окислением и эпимеризацией колец преобразуется в брассинолид (Nomura *et al.*, 1999; Vriet *et al.*, 2013).

Необходимо упомянуть, что ферменты, осуществляющие однотипные реакции, могут обладать разными свойствами в отношении субстратной специфичности или восприимчивости к действию ингибитора (Schaller *et al.*, 1991). Большинство SMT1 характеризуются монофункциональностью, катализируют конкретно первичное C24-метилирование и обладают очень высокой субстратной специфичностью. Однако есть бифункциональные ферменты, катализирующие реакции, имеющие схожие субстраты (многосубстратные реакции). Например, показано участие SMT2, катализирующий реакцию вторичного метилирования стеринов, также в первичном метилировании (Schaeffer *et al.*, 2001).

Таким образом, путь биосинтеза стеринов включает реакции циклизации, десатурации, ряд реакций окислительного деметилирования (двух метильных групп при C4 и одной при C14), метилирование при C24, дегидрогенирование, изомеризацию двойной связи и окисление (Nes, 2000). К основным ферментам биосинтеза растительных стеринов относятся 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктаза (HMGR), C24-стерин метилтрансферазы (SMT1, SMT2) и C22-стерин десатураза (CYP710A) (рис. 10) (Schaller *et al.*, 1995; Hemmerlin *et al.*, 2004). В настоящее время гены, кодирующие эти белки, клонированы и охарактеризованы у некоторых растений. В основном, исследования ведутся на таких модельных растениях, как арабидопсис, соя и табак (Diener *et al.*, 2000; Schaeffer *et al.*, 2000; Neelakandan *et al.*, 2009). Остается неясным вопрос, как именно изменяется

соотношение стеринов в случае сверхэкспрессии или инактивации определенного гена, кодирующего фермент стеринового биосинтеза.

Ранее изучение биосинтеза стеринов у растений было основано на применении ингибиторов синтеза стеринов и последующем анализе изменений в стериновом профиле. Действие ингибиторов биосинтеза стеринов приводит к накоплению промежуточных соединений и вызывает переключение биосинтеза с основного пути на дополнительные (Pang et al., 1996). Интересно отметить, что при ингибировании начальных этапов синтеза, до образования сквалена, наблюдается значительное уменьшение общего содержания стеринов, а ингибирование пути синтеза после циклизации сквалена не приводит к значительным изменениям общего содержания стеринов, что может свидетельствовать о различных промежуточных путях, однако профиль конечных продуктов может отличаться (Mercer, 1991). В работе Wentzinger с соавт. (2002) показано, что ингибирование ферментов сквален синтазы и сквален эпоксидазы в клетках табака сопровождалось повышением активности HMGR и снижение содержания стеринов (Wentzinger et al., 2002). Таким образом, биосинтез одного конкретного соединения может происходить разными взаимосвязанными путями. Наличие в клетке разнообразных биосинтеза стеринов у растений свидетельствует о важности путей И необходимости для клетки функций, выполняемых этими липидами.

Бурное развитие молекулярной биологии и генной инженерии позволило создать различные мутанты как с сверэкспрессией, так и с нуль-мутацией исследуемых генов. Нуль-мутации в генах стеринового биосинтеза приводят к структурным дефектам в клеточных мембранах, вызванных истощением стеринов, изменению гормонального сигнала (Souter *et al.*, 2002; Zauber *et al.*, 2014), делокализации полярных белков (Willemsen *et al.*, 2003; Men *et al.*, 2008), нарушению транспорта ауксина (Willemsen *et al.*, 2003) и дефекту биогенеза пластид (Babiychuk *et al.*, 2008). Учитывая, что стеринам отводится множество важных функций, не удивительно, что мутации в генах, кодирующих ферменты биосинтеза стеринов, могут иметь драматические последствия для клетки. Стоит отметить, что все мутанты характеризуются карликовостью и повышенной чувствительностью к действию стрессовых факторов (Willemsen *et al.*, 2003; Pose *et al.*, 2009). Фенотипы мутантов с нарушением ранних этапах биосинтеза стеринов не восстанавливаются экзогенным добавлением БР, однако нарушения на поздних этапах можно восстановить обработкой БР (Kim *et al.*, 2010).

Как отмечалось выше, баланс между 24-метил- и этилстеринами является специфичным для отдельного вида растения, органа и ткани, и регуляция состава и соотношения различных типов стеринов, как предполагается, является ключевым звеном многих клеточных процессов. В частности, соотношение кампестерина и β -ситостерина определяется активностью ферментов C24-стерин метилтрансфераз, которые катализируют реакцию метилирования 24-ого атома углерода боковой цепи стеринов. Этот фермент характерен для растений и отсутствует в клетках животных. В связи с этим, изучение функционирования этого фермента важно для понимания особенностей биосинтеза стеринов в растениях.

1.5. С24-стерин метилтрансфераза растений

1.5.1. Общая характеристика ферментов семейства SMT

S-аденозил-L-метионин-зависимая С24-стерин метилтрансфераза (КФ 2.1.1.41) является ключевым ферментом биосинтеза растительных стеринов. С24метилтрансфераза представляет собой интегральный стерин белок, локализованный в ЭПР (Boutté, Grebe, 2009). В качестве кофактора данного фермента выступает восстановленный глутатион, а донором метильной группы служит S-аденозил-L-метионин, как и для многих метилтрансфераз. Семейство белков SMT содержат высококонсервативные сайты, необходимые ЛЛЯ функциональной активности фермента, а именно три стерин-связывающих сайта (І - D/SFYEW/F/YGWG/SE/Q/SSFHF, III - IEATC/VHAP, IV - KPGQCFAVYEW) (Bouvier-Navé et al., 1997; Nes, 2000) и S-аденозил-L-метионин-связывающий сайт (II – LDVGCGV/IGGP) G-богатый мотив (Kagan, Clarke, 1994), имеющие достаточно высокую степень сходства среди известных белков этого семейства (Nes et al., 2002). Кроме того, SMT растений и грибов также содержат С-концевой сигнальный домен, необходимый для адресной доставки данного белка в мембрану

ЭПР, где происходит биосинтез стеринов (Benveniste, 2004; Boutté, Grebe, 2009). С помощью метода сайт-направленного мутагенеза были выявлены консервативные остатки аминокислот, непосредственно участвующих в связывании стерина и аденозил-метионина с ферментом за счет водородных связей: Glu_{82} , His_{90} , Asp_{125} , Glu/Asp_{152} , Glu_{195} , Glu_{224} , Asp_{276} (Nes *et al.*, 2004).

В связи с тем, что многие ферменты синтеза стеринов ассоциированы с ЭПР, в том числе SMT, это затрудняет их выделение и очистку, и тем самым изучение структурной организации и конформации белка. Однако, Zhou с соавт. (2004) выявив функционально значимые сайты и консервативные аминокислоты с посмощью сайт-направленого мутагенеза в первичной структуре белка, а также на кристаллографических AdoMet-зависимых основе известных структур метилтрансфераз предсказали вторичную С24-зимостерин структуру метилтрансферазы дрожжей (ERG6) (рис. 11, Zhou et al., 2004). Содержание αспиралей составило 43%, β -структур – 29%, β -поворотов – 7%, неупорядоченных структур – 21%.



Рис. 11. Вторичная структура С24-зимостерин метилтрансферазы, пространственное расположение элементов вторичной структуры по отношению к стеринам и AdoMet коферменту (Zhou *et al.*, 2004).

С24-стерин метилтрансфераза была хорошо изучена в дрожжах (Gaber et al., 1989; Mukhtar et al., 1994; Nes et al., 2004) и в таких растениях как арабидопсис, соя, табак и кукуруза (Janssen, Nes, 1992; Bouvier-Navé et al., 1997; Schaller et al., 1998; Neelakandan et al., 2009). Впервые данный фермент был обнаружен в дрожжах, и на основе идентичности последовательностей с геном ERG6 дрожжей, кодирующим С24-зимостерин метилтрансферазу (Gaber et al., 1989), были обнаружены транскрипты *SMT* в растениях. Белковые продукты были получены И охарактеризованы с помощью гетерологичной экспрессии в бактериальных системах (Shi et al., 1996; Bouvier-Navé et al., 1997; Grebenok et al., 1997; Bouvier-Navé et al., 1998). У арабидопсиса были обнаружены три аминокислотных последовательности SMT, множественное выравнивание которых позволило разделить их на различные типы: SMT1 (AtSMT1) и SMT2 (AtSMT2-1, AtSMT2-2), идентичность членов одной семьи составляла примерно 70% и не более 45% с членами другой семьи (Bouvier-Navé et al., 1998; Diener et al., 2000; Schaeffer et al., 2000). Аналогичные результаты были получены в растениях сои, табака и риса (Diener et al., 2000; Nes et al., 2000; Holmberg et al., 2002; Nes et al., 2003; Neelakandan et al., 2009; Carland et al., 2010). Дальнейшие эксперименты показали значительные различия в активности этих ферментов, субстрат специфичности и продуктах реакции. SMT1 участвует в первичном метилировании, а SMT2 катализирует реакцию вторичного метилирования стеринов (Shi et al., 1996; Bouvier-Navé et al., 1997; Schaller et al., 1998). Помимо консервативных сайтов, характерные для всех белков семейства SMT, SMT2 имеют гидрофобный домен приблизительно в 25 аминокислот на N-конце, SMT1 лишены такого гидрофобного домена (Bouvier-Navé et al., 1997; Nes, 2000). Таким образом, в растениях, в отличие от дрожжей, обнаружены два семейства SMT, катализирующие отдельные реакции в биосинтезе стеринов.

С24-стерин метилтрансфераза 1 (КФ 2.1.1.142) является ферментом биосинтеза растительных стеринов, локализованным в ЭПР (Boutté, Grebe, 2009). Он катализирует перенос метильной группы от S-аденозил-L-метионина на C24-

циклоартенол с образованием 24-метилен циклоартенола. В связи с этим, другое название этого фермента циклоартенол С24-метилтрансфераза. Циклоартенол – субстрат первичного метилирования, представляет собой промежуточный продукт биосинтеза, который в незначительном количестве содержится в общем стериновом экстракте (Nes, 2000). Предполагают, что С24-метилирование циклоартенола является важным звеном регуляции биосинтеза стеринов, от которого зависит получение конечного продукта (Nes, 2000; Boutté, Grebe, 2009).

SMT первого типа (SMT1) консервативный белок и имеет гомологи среди растений с высокой степенью идентичности, а SMT второго типа (SMT2) специфичен для определенного вида (Nes, McKean, 1977). Это затрудняет изучение новых неаннотированных SMT2 на основе гомологии с известными белками SMT2.

С24-стерин метилтрансфераза 2 (ЕС 2.1.1.143) растений, является ферментом, также локализованным в ЭПР, катализирующим S-аденозилметионинзависимый перенос метильных групп к субстрату С24-(28)-метиленлофенолу. Суть заключается в преобразовании 24-метиленлофенола в 24этой реакции этиленлофенол (Bouvier-Navé et al., 1998). Оптимальным субстратом для вторичного трансметилирования, считается 24-метиленлофенол (Bouvier-Navé et al., 1997, 1998; Zhou, Nes, 2003). Существует предположение, что этот фермент бифункционален и менее специфичен в выборе субстрата, что позволяет ему также участвовать в первичном метилировании, однако, каталитичекая эффективность с 24-метиленлофенолом в 17 раз выше, чем с циклоартенолом (Bouvier-Navé et al., 1998). Показано, что в мутантах арабидопсиса с нокаутом гена SMT1, фермент, катализирующий вторичное метилирование, SMT2 осуществляет первичное метилирование стеринов (Schaeffer et al., 2001). В растениях SMT2 определяет точку ветвления между сегментами биосинтеза 24-метил- и этилстеринов. Этот шаг представляет собой реакцию, направляющую поток углерода на синтез основных мембранных стеринов, а не на биосинтез БС. От активности SMT2 зависит соотношение 24-метил- и этилстеринов, которое может оказывать влияние на рост, развитие и стрессовые ответы растений (Schaller et al., 1998; Schaeffer et al., 2001;

Carland et al., 2002; Benveniste, 2004; Hase et al., 2005). Интересно отметить, что у исследованных растений семейство белков SMT2 представлено в виде двух функциональных ортологов (SMT2-1, SMT2-2), выполняющих идентичную функцию. аминокислотных последовательностей Сходство ортологов сои GmSMT2-1 и GmSMT2-2 составляет 96%, и они имеют только пять различий в положениях аминокислот, которые лежат за пределами активных сайтов фермента. В реакциях, катализируемых ферментами GmSMT2, начальная скорость реакции, GmSMT2-1, катализируемой ферментом ниже, чем скорость реакции, катализируемой ферментом GmSMT2-2 (Neelakandan et al., 2009). Реакция вторичного трансметилирования приводит к образованию 24-этилстеринов (βситостерин и стигмастерин) и представляет собой завершающий этап биосинтеза растительных стеринов. Среди молекулярных механизмов, регулирующих биосинтез растительных стеринов, помимо активности ферментов, определяющую роль играет активность многочисленных генов, кодирующих эти ферменты.

1.5.2. Гены SMT: структура и транскрипционная активность Структурный анализ генов SMT

Гены, кодирующие белки семейства SMT на основании отличий в генной структуре, условно разделены на три класса: 1 класс – гены, содержащие в свой структуре 5 интронов, характерные для генов SMT1 водорослей; 2 класс – гены с большим числом интронов (от 10 до 13), характерны для SMT1 первого типа всех высших растений; 3 класс – безинтронные гены, это SMT1 нефотосинтезирующих организмов (простейшие, грибы) и SMT2 высших растений (рис. 12) (Neelakandan *et al.*, 2009). Исследование генной структуры, в частности, наличия или отсутствия интронов, количества экзонов приобретает все большее значение для понимания эволюции генного семейства.

Как уже отмечалось, фермент SMT2 растений бифункционален и может катализировать как первичное, так и вторичное метилирование 24-го атома углерода боковой цепи стеринов (Schaeffer *et al.*, 2001), кроме того, имеет более простую геномную организацию (не содержит интронов) (Neelakandan *et al.*, 2009).



Рис. 12. Сравнение геномной организации генов SMT водорослей, грибов и растений. Arabidopsis thaliana (AtSMT1, AtSMT2-1, AtSMT2-2), Glycine max (GmSMT1, GmSMT2-1, *GmSMT2-2*), Saccharomyces (ScSMT1),cerevisiae **Pneumocystis** carinii (PcSMT1),Trypanozoma brucei (TcSMT1),Selaginella moellendorffii (SmSMT1), Physcomitrella patens (PpSMT1),Chlamydomonas reinhardtii (CrSMT1). Цветными стрелками указаны консервативные экзоны (Neelakandan et al., 2009).

Сравнительный анализ показал, что большую гомологию SMT2 имеют с SMT простейших, грибов и некоторых водорослей, как в аминокислотной последовательности, так и в геномной организации (Neelakandan *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Haubrich *et al.*, 2015). Все это позволяет предположить, что SMT2 эволюционно возникла раньше, чем SMT1 высших растений, несмотря на то, что при нормальной последовательности биосинтеза стеринов растений, реакция, катализируемая SMT2, идет после реакции, катализируемой SMT1. Возможно, в ходе эволюции произошло функциональное расхождение SMT (SMT1 и SMT2) в

50

сторону усложнения генной структуры и высокой субстратной специфичности. Основываясь на этой информации, можно сделать предположение, что два семейства SMT произошли от гомологичного общего предка (Fersht, 1999), хотя убедительных доказательств этого до сих пор не имеется. Например, для SMT1 зеленой водоросли – CrSMT1 характерны черты субстрат-связывающих сайтов и геномной организации SMT2 высших растений, степень идентичности первичной структуры белка с SMT2 составляет 64%, а с SMT1 – 38% (Haubrich *et al.*, 2015). Аминокислотная последовательность ERG6, гомологичного белка грибов, имеет большую степень сходства с SMT2 высших растений. Этот фермент способен продуцировать эргостерин в качестве основного С28-стерина, а также небольшое количество С29-стеринов (Kaneshiro et al., 2015). Эти новые данные, направленные на выяснение эволюционного происхождения генов, участвующих в реакциях трансалкилирования биосинтеза стеринов, уникальных для растений, требуют дальнейшего изучения как этих, так и других ферментов биосинтеза стеринов прокариот И эукариот.Нуклеотидные последовательности генов SMT характеризуются эволюционной консервативностью у разных видов растений. Так, идентичность последовательностей транскриптов генов SMT1 арабидопсиса с генами риса, табака и кукурузы составляет более 75%.

Молекулярные механизмы регуляции экспрессии генов биосинтеза стеринов, в частности *SMT*, начали активно изучаться лишь в последнее десятилетие.

Транскрипционная активность генов

Транскрипционный анализ генов *SMT1* и *SMT2* стеринового пути был проведен у разных видов растений (Shi *et al.*, 1996; Diener *et al.*, 2000; Carland *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2008; Neelakandan *et al.*, 2009). Изучено содержание транскриптов генов *SMT1* и *SMT2* в различных тканях и на всех этапах развития растений, за исключением поздних стадий созревания семян, где их экспрессия уменьшалась до очень низкого уровня (Neelakandan *et al.*, 2010). Некоторые гены *SMT* сои (*GmSMT1*, *GmSMT2-1* и *GmSMT2-2*) и арабидопсиса (*AtSMT1*, *AtSMT2-1* и *AtSMT2-*2) ранее были клонированы в *E. coli* и детально охарактеризованы по субстратной специфичности и механизмам ингибирования, а также исследована их роль в регуляции биосинтеза 24-алкилстеринов у растений (Neelakandan *et al.*, 2009; Carland *et al.*, 2010).

Как уже отмечалось, у многих исследованных растений семейство белков SMT2 представлено в виде двух функциональных ортологов (SMT2-1, SMT2-2), кодируемых соответствующими генами. Тем не менее, не ясен вопрос возникновения двух дублирующих ортологов SMT2, которые могут привести к функциональной избыточности. Однако, профиль экспрессии двух SMT2 изоформ в сое показал явные различия в экспрессии GmSMT2-1 и GmSMT2-2 в процессе роста и развития сои, предполагая различные требования к изоформам SMT2 в метаболизме сои (Neelakandan et al., 2010). Например, было показано, что фермент, кодируемый геном GmSMT2-2, имеет повышенную каталитическую активность в прорастающих семенах сои (Neelakandan et al., 2009, 2010). Сверхэкспрессия гена SMT2 приводила к понижению уровня 24-метилстеринов (кампестерина) и сопутствующему увеличению 24-этилстеринов (β -ситостерина и стигмастерина), а также к снижению содержания БР (Schaller et al., 1998; Schaeffer et al., 2000, 2001; Sitbon, Jonsson, 2001). Кроме того, у растений наблюдались морфологические изменения, такие как, например, уменьшение высоты проростков, по-видимому, из-за уменьшения количества клеток и снижение темпов роста. Эти дефекты устранялись экзогенной обработкой БР, что может свидетельствовать о том, что наблюдаемая аномальная морфология была связана с их дефицитом.

Для характеристики особенностей регуляции экспрессии генов *SMT* сои были секвенированы промоторные последовательности генов *GmSMT2*, анализ которых выявил наличие стресс-чувствительных *цис*-элементов и сайтов связывания транскрипционных факторов (Neelakandan *et al.*, 2010). Дальнейший анализ экспрессии этих генов показал, что биотические и абиотические факторы, в том числе обезвоживание, холод и абсцизовая кислота (AБK), индуцируют экспрессию генов *GmSMT2* в ходе роста проростков. Можно предположить, что SMT необходима для нормального роста и развития растений, и ее активность меняется при действии различных стрессовых факторов (Diener *et al.*, 2000; Carland

et al., 2002; Luo *et al.*, 2008; Neelakandan *et al.*, 2009). Таким образом, SMT является ключевым ферментом биосинтеза растительных стеринов, от функционирования которого зависит оптимальный баланс молекулярных видов стеринов в растении при онтогенезе и действии стрессовых факторов.

Заключение к Обзору литературы

В настоящем обзоре обобщены данные современной литературы о роли стеринов в жизнедеятельности растений, разнообразии их химических структур и особенностях биосинтеза. В последнее время особый интерес вызывает не столько структурная, сколько регуляторная и сигнальная функции растительных стеринов. В частности, имеется информация об участии стеринов в сигналинге, росте и развитии, а также стрессовом ответе растений. Биохимические механизмы вовлечения стеринов в функционирование растительных мембран являются предметом острых дискуссий. Эффективным инструментом исследования роли стеринов в функционировании клеток является применение специфических стерин-связывающих агентов, таких как полиеновый антибиотик каналоформер нистатин и макроциклический олигосахарид MBCD. Оба этих соединения способны уменьшать содержание стеринов в клетках, однако механизмы их действия совершенно различны. Нистатин является известным противогрибковым препаратом, действие которого приводит к гибели грибных клеток вследствие вытекания содержимого клеток через нистатин-стериновые поры. Физиологобиохимические последствия воздействия стерин-связывающих агентов на растения изучены недостаточно. Важным аспектом в изучении стеринов является исследование и анализ ферментов их биосинтеза, в частности, ключевого фермента биосинтеза – С24-стерин метилтрансферазы. Однако далеко не для всех видов растений охарактеризованы гены, кодирующие ферменты синтеза стеринов. Весьма ограничена информация о структуре и профиле экспрессии генов SMT. В связи с вышеизложенным, настоящая работа посвящена изучению изменений стеринового состава пшеницы в условиях стеринового истощения и при действии стрессовых факторов, а также детальной характеристике структуры и активности генов *TaSMT*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования были использованы проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Казанская юбилейная». Проростки выращивали на растворе 0,25 мМ CaCl₂ в течение четырех дней при температуре +22° С и освещенности 100 Вт/м² с 12-часовом фотопериодом. Воздействие антибиотика нистатина и олигосахарида М β CD (Aldrich, CША) на интактные проростки проводили в течение 12 ч. Антибиотик растворяли в 0,2%-ном диметилсульфоксиде (ДМСО), олигосахарид М β CD – в воде. Контролем служили проростки, выращенные на 0,2%-ном ДМСО и 0,25 мМ CaCl₂, соответственно. В экспериментах был использован нистатин в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ и М β CD в концентрации 5 мМ. Для моделирования холодового стресса 4-дневные проростки пшеницы помещали на 1-12 ч на +4° С. Во всех вариантах исходные растворы не содержали ионов калия.

2.2. Анализ липидов

2.2.1. Экстракция липидов из растительного материала

Обшие липиды экстрагировали изопропанолом, затем смесью изопропанол/хлороформ (1:1) по методу Николса (Nichols, 1963) с модификациями (Kotlova et al., 2009). Навеску растительного материала (1 г) мелко нарезали, гомогенизировали с 3 мл изопропилового спирта и помещали в предварительно нагретый до 70° С сушильный шкаф на 30 мин. Гомогенат переносили на фильтр Шота, экстракт отфильтровывали в колбу Бунзена с помощью насоса. Оставшийся на фильтре материал переносили в пробирку со шлифом, добавляли 5 мл смеси хлороформ/изопропиловый спирт (1:1) и помещали в сушильный шкаф на 30 мин. Гомогенат переносили на фильтр Шота, экстракт отфильтровывали в колбу Бунзена с помощью насоса. Объединенный фильтрат переливали в круглодонную колбу и упаривали на роторном испарителе при температуре 40° С. К сухому остатку добавляли 2 мл смеси хлороформ/метанол (1:1), количественно переносили в колбу (конечный объем 3 мл), добавляли 4 мл воды, встряхивали и оставляли до разделения хлороформной и водно-метанольной фаз. Далее хлороформную фазу отбирали в пробирки со шлифом и упаривали досуха на роторном испарителе. Добавляли 100 мкл хлороформа и количественно переносили в виалы. Упаривали в виалах досуха на роторном испарителе. К сухому остатку добавляли 50 мкл хлороформа. Далее данный экстракт использовали для анализа TCX.

2.2.2. Анализ фосфо- и гликолипидного состава проростков пшеницы методами высокоэффективной тонкослойной хроматографии и денситометрии

Индивидуальные фосфо- и гликолипиды анализировали с помощью двумерной высокоэффективной тонкослойной хроматографии (TCX) на стеклянных пластинах «TLC Merck» 6×6 см с силикагелем 5-20 мкм (Merck, Германия) в системах растворителей: хлороформ/метанол/вода (65:25:4 по объему) – первое направление и хлороформ/ацетон/метанол/ледяная уксусная кислота/вода (50:20:10:10:5 по объему) – второе направление (Benning et al., 1995). Хроматографические зоны, соответствующие липидным соединениям, визуализировали с помощью 5%-ного раствора H₂SO₄ в метаноле. Фосфолипиды и ГлЦер идентифицировали с использованием стандартов (Kates, 1972). Типичная хроматограмма липидной фракции проростков пшеницы представлена на рис. 13.



Рис. 13. Хроматограмма общей фракции липидов, разделенные по методу Benning с соавт. (1995).

Количество общих ГлЦер и индивидуальных ФЛ определяли с помощью денситометра ДенСкан (Ленхром, Россия). Для построения калибровочных кривых использовали стандартные растворы ФХ и бычий галактоцереброзид (Sigma, США).

2.2.3. Анализ стеринового состава проростков пшеницы методами тонкослойной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии с ионизацией электронным ударом

Стерины разделяли с помощью одномерной ТСХ с последовательным использованием двух систем для нейтральных липидов: 1) толуол/гексан/муравьиная кислота (140:60:1 по объему); 2) гексан/диэтиловый эфир/муравьиная кислота (60:40:1 по объему). Хроматографические зоны, соответствующие стеринам, визуализировали с помощью паров йода. Далее пятна со стеринами соскребали с пластинок и элюировали смесью хлороформ/метанол. Для подготовки пробы для хромато-масс-спектрометрии элюированные стерины упаривали досуха, затем сухой остаток растворяли в 20 мкл пиридина и добавляли 20 N,О-бис-(триметилсилил)трифторацетамида США) мкл (Supelco, для образования триметилсилил производных стеринов. Реакцию проводили в закрытых флаконах при нагревании до температуры 100° С в течение 30 мин. Силилированные стерины были проанализированы с помощью газового хроматомасс-спектрометра GSMS-QP5050A (Shimadzu, Япония) с использованием капиллярной колонки HP-5MS (30 м × 0,25 мм и толщиной пленки 0,25 мкм; Agilent, США), в качестве газа-носителя использовали гелий, с постоянной скоростью 1,3 мл/мин. Температура инжектора и MS испарителя составляла 330 и 290° С, соответственно. Были использованы следующие температурные режимы колонки: инъекция при 70° С с дальнейшим повышением температуры до 320° С со скоростью 4° С/мин и последующим поддержанием температуры 320° С в течение 20 мин. Энергия ионизации масс-спектрометра в режиме электронного удара составляла 70 эВ. Идентификацию стеринов проводили путем сравнения их времен удержания С достоверными стандартами масс-спектрометрии с

использованием масс-спектрометрической библиотеки данных GC-MS. Количественный анализ был проведен с использованием хроматографического программного обеспечения UniChrom с помощью внутреннего стандарта, которым служил нафталин.

2.3. Определение проницаемости плазмалеммы для ионов калия и протонов

О проницаемости ПМ клеток корней судили по изменению содержания ионов калия в среде выращивания. Измерения проводили на пламенном фотометре Phlapho-41 (Carl Zeiss, Германия) (Гордон и др., 2005). Измерение pH среды инкубации проводили на pH-метре Mettler Toledo (США).

2.4. Определение выхода электролитов и индекса мембранной стабильности

Навеску корней и листьев проростков пшеницы (0,1 г) несколько раз промывали в бидистиллированной воде бюксы с затем погружали В бидистиллированной водой (10 мл) и выдерживали в термостате при температуре 40° С в течение 30 мин (С1). Электропроводность раствора после инкубации (С1) измеряли с помощью кондуктометра Cond 7310 (WTW, Германия). Полный выход электролитов (С2) определяли по электропроводности той же вытяжки после разрушения растительной ткани кипячением в течение 10 минут (Sairam, Saxena 2002). Выход электролитов (С) рассчитывали в процентах от полного выхода по формуле:

$$C = (C1/C2) \times 100\%$$

ИСМ рассчитывали по формуле:

$$\text{VICM} = (1 - C1/C2) \times 100\%$$
.

2.5. Анализ размера (*D*_{eff}) и ζ-потенциала частиц МβCD, β-ситостерина и комплекса МβCD/β-ситостерин

Размер (эффективный гидродинамический диаметр кинетически подвижной частицы в максимуме кривой распределения, D_{eff}) и электрокинетический потенциал (ζ -потенциал – электрический потенциал кинетически подвижной частицы на границе скольжения в постоянном электрическом поле) частиц в водных растворах 0,2% ДМСО регистрировали методом динамического светорассеяния и микроэлектрофореза на высокочувствительном анализаторе Zetasizer Nano ZN (Malvern Instruments, Великобритания) (Рыжкина и др., 2009).

2.6. Определение окислительно-восстановительного статуса

2.6.1. Содержание перекиси водорода

Содержание перекиси водорода (H_2O_2) определяли с использованием ксиленола оранжевого (Gay, Gebicki, 2000). Навеску растительной ткани (0,5 г) растирали в жидком азоте с добавлением 1 мл 0,1 М Tris-HCl буфере (pH 7,5), затем центрифугировали в течение 10 мин при 10 тыс. об/мин. Супернатант (200 мкл) и реагент (1 мл) смешивали и через 1 ч измеряли оптическую плотность спектрофотометрически ($\lambda = 560$ нм) с использованием сканирующего двухлучевого спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, CША). Рабочий реагент состоял из 0,1 мл реагента A, содержащего 25 мМ FeSO₄, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ H₂SO₄, и 10 мл реагента Б, содержащего 125 мкМ ксиленола оранжевого и 100 мМ сорбита. Содержание H₂O₂ рассчитывали по стандартной калибровочной кривой концентрации H₂O₂ (от 1 мкМ до 50 мкМ) и выражали в мкМ/г сыр. в.

2.6.2. Уровень перекисного окисления липидов

Интенсивность перекисного окисления липидов определяли спектрофотометрически в растворимой фракции гомогената по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). В основе метода лежит реакция между малоновым диальдегидом (МДА) и ТБК, которая при высокой температуре и кислом значении рН протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы ТБК. Гомогенат готовили как в гл. 2.6.1. Реакционную смесь (0,3 % раствор тритона X-100; 0,1 M HCl; 0,03 M ТБК) смешивали с супернатантом (3:1) и инкубировали на водяной бане в течение 30 мин. Оптическую плотность продукта реакции измеряли спектрофотометрически ($\lambda = 532$ нм). Уровень ПОЛ выражали в процентах, за 100% принимали количество ТБК-прореагировавших продуктов, содержащихся в клетках исходных корней.

2.6.3. Активность пероксидазы

Активность пероксидазы определяли с использованием дианизидина в качестве субстрата. Скорость образования продукта реакции регистрировали по увеличению оптической плотности ($\lambda = 460$ нм) на спектрофотометре. Измерительный раствор содержал 390 мкл 100 мМ буфера MES (pH 5,5), 10 мкл исследуемого образца, 100 мкл 6 мМ дианизидина, 100 мкл 6 мМ H₂O₂. Реакция инициировалась добавлением H₂O₂. Активность пероксидазы выражали в усл. ед./мин на г сыр. в.

2.7. Определение уровня жизнеспособности клеток

Уровень жизнеспособности клеток корней проростков пшеницы определяли с помощью красителя Эванса синего (Baker, Mock, 1994), проникающего только в мертвые клетки. Кончики корней (0,5 см) окрашивали 0,25% раствором Эванса синего в течение 15 мин при комнатной температуре. Окрашенные корни промывали дистиллированной водой трижды по 10 мин и затем отмывали их в N,N-диметилформамиде в течение 1 ч при комнатной температуре. Поглощение красителя, соответствующее доле мертвых клеток, оценивали спектрофотометрически ($\lambda = 600$ нм).

2.8. Флуоресцентная визуализация аутофагосом

Визуализацию аутофагосом осуществляли с помощью флуоресцентного маркера аутофагосом LysoTracker Red DND-99 (LT, Invitrogen, США, λ_{ab} 577 нм /

 λ_{em} 590 нм), флуоресценцию которого детектировали с использованием лазерного конфокального микроскопа LSM-510 Meta (Carl Zeiss, Германия). Краситель селективно накапливается в кислых компартментах и возбуждается в области красной флуоресценции. Кончики корней (0,5 см) окрашивали 1 мкМ LT в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Затем окрашенные корни промывали 3-5 раз 0,1 М натрий-фосфатным буфером (pH 7,2-7,4) и готовили препараты. Специфичность окрашивания LT подтверждали с применением ингибитора аутофагии 10 мМ 3-метиладенина.

2.9. Выделение тотальной РНК и синтез кДНК при помощи ОТ-ПЦР

Тотальную РНК пшеницы выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя и с помощью реагента TRIzol (фенол, насыщенный Tris-HCl, pH 8,0; 0,8 M GuSCN; 0,4 M NH₄SCN; 3 M ацетат натрия, pH 5,0; 6% глицерин; MilliQ) (Маниатис и др., 1984). Растительную ткань растирали в керамической ступке в жидком азоте до гомогенного состояния, переносили в центрифужную пробирку (100 мг) и добавляли 1 мл реагента TRIzol. Полученную смесь встряхивали на шейкере в течение 2 мин и центрифугировали при 14 тыс. об/мин в течение 5 мин. Затем отбирали надосадочную жидкость и добавляли к ней 300 мкл хлороформ/изоамиловый спирт (24:1). Полученную смесь встряхивали на шейкере в течение 2 мин и центрифугировали при 14 тыс. об/мин в течение 5 мин. Затем отбирали верхнюю фазу и добавляли к ней равный объем изопропанола и выдерживали в течение ночи при -20° C, после чего центрифугировали при 14 тыс. об/мин при 4° С 30 мин. Осадок растворяли в 200 мкл MilliQ с 0,01% DEPC (диэтилпирокарбонат – ингибитор РНКаз), осаждали четырьмя объемами ледяного 96% этанола и оставляли на ночь при -20° С. После этого опять центрифугировали при 14 тыс. об/мин при 4° С 30 мин. Осадок растворяли в 50 мкл MilliQ с 0,01% DEPC. Для удаления ДНК образцы обрабатывали 0,1 ед. ДНКазы (Fermentas, Канада) при 37° С в течение 30 мин. Затем добавляли 2 мкл ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота – ингибитор ДНКаз) и термостатировали при 65° С в течение 10 мин. Концентрацию РНК определяли

спектрофотометрически с помощью NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США); нативность РНК оценивали с помощью электрофоретического разделения в 2% агарозном геле.

Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл. На первой стадии 2 мкл тотальной РНК в присутствии 1 мкл праймеров Oligo(dT)₁₆ (1 мкМ) (Синтол, Россия) и 8 мкл MilliQ с 0,01% DEPC прогревали при 65° C в течение 5 мин. На второй стадии к этой смеси добавляли 4 мкл дезоксиробонуклеотидфосфатов (2 мМ), 4 мкл 5-кратного RevertAid RT буфера (pH 8,3, 20 мМ MgCl₂) и 1 мкМ (200 ед.) RevertAid RT обратной транскриптазы (Thermo Scientific, CША). Реакцию ОТ проводили в амплификаторе C1000 TouchTM Thermal Cycler (Bio-Rad, США) при следующем температурном режиме: 65° C – 5 мин, 42° C – 60 мин, 70° C – 10 мин. 2 мкл полученной комплементарной ДНК (кДНК) использовали в качестве источника матриц для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

2.9.1. Амплификации участков кДНК с помощью ПЦР в реальном времени

Для амплификации участков кДНК *Т. aestivum* нами были сконструированы праймеры, на основе последовательносей, представленных в базе данных GenBank. Конструирование праймеров проводили при помощи пакета программ Vector NTI версия 9 на основе последовательности мРНК. В качестве референсных генов были использован гены фактор АДФ-рибозилирования (*TaARF*) и ингибитор РНКазы Lподобный белок (*TaRLI*) (Paolacci *et al.*, 2009). Были использованы следующие праймеры и зонды генов (табл. 1) *Т. aestivum*: *TaSMT* – гены C-24 стерин метилтрансферазы; *TaARF* – фактор АДФ-рибозилирования; *TaRLI* – ингибитор РНКазы L-подобный белок; *TaPOX* – гены пероксидазы 37 кДа; *TaATG4* – аутофагический ген 4; *TaATG8* – аутофагический ген 8. Зонды ТаqMan содержали флуоресцентный краситель FAM совместно с экранирующим агентом BHQ-1. Праймеры и флуоресцентные зонды синтезировали в НПО «Синтол» (Москва). Специфичность праймеров проверяли путем разделения ПЦР-продуктов в 1% агарозном геле, где размеры наработанных фрагментов кДНК *Т. aestivum* соответствовали по молекулярным массам теоретически ожидаемым.

Таблица 1. Список использованных праймеров и флуоресцентных зондов ТаqMan (F – прямой праймер, R – обратный праймер, Z – зонд)

Праймеры и зонды	Последовательность 5' – 3'	Размер продукта, п. н.	Темп. отжига , °С
TaSMT1-5A	F: GGGAAAGCATCAAAAGGCAC R: CAAGTAGCGCCAAGTCCTACC Z: GATGAAGG(T-BHQ1)TTTGGATGTCGGCTGTG	211	55
TaSMT1-4B	F: GGTCTACTGGTTCGTGTGGGTG R: GGTTGTAGAAGGTGTCGACGAAG Z: GGGACAAGG(T-BHQ1)GCAGGACAAGTACACG	203	55
TaSMT1-4D	F: GTCTGCCAGATATCAGAAGTACTCG R: CCAACATATTCTCATTGCCTCAC Z: GCTGGGTT(T-BHQ1)GAGGTTATTTGGGACAAG	198	55
TaARF	F: GCTCTCCAACAACATTGCCAAC R: GCTTCTGCCTGTCACATACGC Z: CGTGCTGGA(T-BHQ1)GTCTCAACAACTCACTGC	165	55
TaRLI	F: CGATTCAGAGCAGCGTATTGTTGC R: GCCTGTAGTTGGTCGGGTCTCTTC Z: GCGGACAAGG(T- BHQ1)TATTGTTTATGAGGGACTTGCTTC	242	60
TaPOX	F: CTGTCTGGCATGGAACAAAACGC R: GGTGGTGGAGTCCCGTCTCCC Z: GCCGACA(T-BHQ1)CCTCACCGTCGCCGC	207	60
TaATG4	F: CTAGTGATGTCAACTGGGGGCTGC R: GATCCTTGTATGTTCTGGGTCAGATG Z: CTGTGCGGGC(T-BHQ1)TTCTCCAAGACCTTCC	134	65
TaATG8	F: GGTTCCGTGTGACATGCCA R: GCCATCCTGCTTATCTTTGTACG Z: ACACCT(T-BHQ1)GCCCCAGACCGCTAACCT	161	55

ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, в состав которой входили 15,75 мкл MilliQ, 2,5 мкл 10-кратный Таq-буфера (рН 8,6), 2,5 мкл MgCl₂ (25 мМ), 1,5 мкл смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (2,5 мМ), 2 мкл ДНК-матрицы (от 0,001 до

10 нг), 0,25 мкл каждого праймера и зонда (10 пМ), 0,25 мкл 5 ед. Таq-полимеразы (Thermo Scientific. США), которую добавляли В реакционную смесь непосредственно перед реакцией. ПЦР проводили в градиентном ДНКамплификаторе с оптическим модулем для ПЦР в реальном времени ICycler IQ4 (Bio-Rad, США) в следующих условиях: 3 мин при 95° С, 40 циклов по 10 с при 94° С и 40 с при соответствующей для каждой пары праймеров температуре. ПЦР продукты оценивали по флуоресценции FAM с абсорбцией при $\lambda = 490$ нм и эмиссией при λ = 530 нм с использованием соответствующих фильтров для возбуждения флуорофора и фиксирования флуоресценции. Оптимизацию реакции осуществляли при помощи варьирования концентрации праймеров и зондов, MgCl₂, температуры и времени отжига праймеров.

2.9.2. Анализ относительного уровня экспрессии генов

Для оценки изменения экспрессии генов использовали сравнительный метод (Pfaffl, 2001). По результатам реакций с сериями разведений ДНК или кДНК с использованием программного обеспечения разработчика прибора определяли эффективность амплификации ДНК (Е) и уровень базовой линии с различными праймерами. Для каждого образца определяли значение порогового цикла (C_t – Cycle threshold), отражающее пересечение кинетической кривой накопления продуктов амплификации с базовой линией. Значения C_t для целевых генов были нормализованы относительно эмпирически подобраной наиболее стабильно-экспрессирующейся пары референсных генов *TaARF* и *TaRLI* (Paolacci *et al.*, 2009). При этом уровень экспрессии определяли относительно контрольного варианта (без стресса). Относительный уровень экспрессии генов определяли по формуле:

$$R = \frac{(\underline{E}_{\underline{I}})^{\Delta C t \underline{\eta}}}{(\underline{E}_{p})^{\Delta C t \underline{p}}},$$

где R – относительный уровень экспрессии исследуемых генов;

Ец и Ер – эффективность реакции ПЦР для целевого и референсного гена, соответственно;

ΔСtц и ΔСtp – разница в значении порогового цикла для вариантов «контроль» - «опыт» для целевого и референсного гена, соответственно.

Каждый образец оценивали в трех повторностях ПЦР, при этом отсутствие значимых количеств геномной ДНК подтверждали, проводя ПЦР без предварительного этапа ОТ. Представленные данные рассчитаны по результатам трех независимых экспериментов с повторяющимися закономерностями.

2.10. Выделение геномной ДНК растений

Геномную ДНК пшеницы выделяли с использованием СТАВ-буфера. Навеску растительной ткани (~300 мг) растирали в керамической ступке в жидком азоте до гомогенного состояния, и перенести в 2 мл центрифужную пробирку. Добавляли 750 мкл буфер Grinding Buffer 5:5:2 (DNA Extraction buffer (Sorbitol 0.35 M, Tris base 0.1 M, EDTA 0.005 M)/Nucleotide lysis buffer (Tris base 0.2 M, EDTA 0.05 M, NaCl 2 M, CTAB 2%)/Sarkosyl 5%) тщательно суспензировали. Смесь инкубировали 30 минут при 65° С. Лизат охлаждали до комнатной температуры и добавляли 700 мкл хлороформ/изоамиловый спирт 24:1. Полученную смесь встряхивали на шейкере в течение 2 минут. Центрифугировали 5 мин при 21° С, 10 000 об/мин (16000 g). Отбирали водную фазу в новую 1,5 мл пробирку (~700 мкл) и добавляли 550 мкл изопрапанола. Осадок ДНК собирали центрифугированием 5 мин при 21° C, 10 000 об/мин. Аккуратно выливали супернатант. Осадок промывали 70% спиртом (400 мкл) центрифугированием 1 мин при 21° С, 10 000 об/мин несколько раз. Затем сливали спирт и оставляли открытые пробирки до полного испарения спирта при комнатной температуре в течение 0,5-1 ч. Осадок ДНК растворяли в ~100 мкл MilliQ или ТЕ буфере (Tris-HCl pH 8.0 10 мМ, EDTA рН 8.0, 1 мМ).

Концентрацию ДНК оценивали спектрофотометрически с помощью NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США), качество выделенной ДНК оценивали электрофоретически в 1% агарозном геле. Полученную ДНК хранили при –20° С.

2.10.1. Амплификация участков гомеологичных генов

Геномную ДНК пшеницы выделяли СТАВ-методом описаный ранее (см. главу 2.9.). Амплификацию участков гомеологичных генов *TaSMT1* ПЦР проводили в амплификаторе C1000 TouchTM Thermal Cycler (Bio-Rad, CША) при следующем температурном режиме: 4 мин – 95° C, (0,5 мин – 95° C, 0,5 мин – 55° C, 1 мин при 72° C) 28 цикла, 5 мин при 72° C, после чего ставили режим хранения продуктов реакции (12° C). В состав реакционной смеси объемом 25 мкл входили: 16 мкл MilliQ, 2,5 мкл 10-кратный Maxima Hot Start Taq-буфера (pH 8,6), 2,5 мкл MgCl₂ (25 мM), 2 мкл смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (2,5 мМ), 1 мкл кДНК, 0,5 мкл каждого праймера (табл. 2) (10 пМ), 0,3 мкл 5 ед. Maxima Hot Start Taq DNA полимеразы (Thermo Scientific, CША). Для амплификации целевых фрагментов гена были построены праймеры на консервативные участки гена *TaSMT1*.

Таблица 2. Список использованных праймеров для амплификации участков гомеологичных генов *TaSMT1*

Проймори	Последовательность 5' – 3'	Темп.	Размер продукта,	
праимеры		отжига, °C	П. Н.	
TaSMT1	F: GGGAAAGCATCAAACGACACG R: GTCCTACCGACCGATTAAGCG	55	5A - 1181	
			4B - 1385	
			4D-1196	

О результате ПЦР судили по электрофоретическому разделению ДНК в 1% агарозном геле. ПЦР фрагменты очищали с помощью набора АхуРгер[™] РСR Cleanup Kit (Axygen Biosciences, США) и клонировали в вектор pGem-T Easy (Promega, США) (см. главу 2.11.).

2.10.2. Амплификация и секвенирование промоторных областей гомеологичных генов

Для амплификации и секвенирования промоторных областей генов *TaSMT1*, на основе предполагаемых последовательностей из базы данных URGI, были сконструированы специфичные обратные праймеры, построенные на первые экзоны генов, и прямые праймеры, построенные на последовательности, расположенные перед генами. ПЦР проводили в амплификаторе C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad, CША) при следующем температурном режиме: 2 мин – 95° C, (30 с – 95° C, 30 с – 56/57° C, 1,5 мин при 72° C) 35 циклов, 5 мин при 72° C. В состав реакционной смеси объемом 20 мкл входили MilliQ, 5-кратный Green GoTaq Flexi-буфер, MgCl₂ (25 мМ), смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (10 мМ), праймеры (20 мМ) (*TaSMT1*-5A, *TaSMT1*-4B и *TaSMT1*-4D, табл. 3), геномная ДНК (200 нг), 5 ед. GoTaq Flexi DNA-полимеразы (Promega, CША).

Таблица 3. Список использованных праймеров для амплификации и секвенирования промоторных областей генов *TaSMT1*

Праймеры	Последовательность 5' – 3'	Темп. отжига, °С	Размер продукта,
			П. Н.
TaSMT1-5A	F: GTTGGCGTGATCCATTCCG	57	1154
	R: TTTGATGCCCCTTAAAAGAGTGTG	57	
T_{α} CMT1 4D	F: GGTTCTAGACGCCGAAAACCAG	56	1631
1 USM11-4D	R: TATGATGCCCCTTAAAAGAGTGTGC	50	
TaSMT1-4D	F: ACTTAATTTGGGACGGAGGGG	5.0	1543
	R: TATGATGCTCCTTGAACTAGTGTGC	20	

О результате ПЦР судили по электрофоретическому разделению ДНК в 1% агарозном геле (Sigma, США). ПЦР фрагменты очищали с помощью набора PCR Clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel, Германия) и отдавали на дальнейшее секвенирование в центр технологических платформ на базе университета Страсбурга.

2.11. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Электрофоретическое разделение ДНК проводили в 1-2% агарозном геле в горизонтальной камере SE-1 (Хеликон, Россия) при напряжении электрического поля 5–10 В/см. В качестве электролита использовали Трис-ацетатный буфер, pH 8,0 (40 мМ Трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА). О ходе электрофореза судили по миграции бромфенолового синего (Serva, Германия), добавленного в пробы перед их нанесением в лунки геля. ДНК регистрировали по люминесценции в ультрафиолетовом свете после экспозиции геля в 1% растворе бромистого этидия (10 мкг/мл) (Хеликон, Россия) (Маниатис и др., 1984) с помощью установки видеодокументации гелей Gel-Doc (Bio-Rad, США). В качестве маркера молекулярного веса использовали DNA Ladder #SM1331, #SM0403 (Thermo Scientific, США).

2.12. Молекулярное клонирование ДНК

В работе использовался вектор рGEM-Т Easy (Promega, США). Клонирование в вектор pGEM-T Easy осуществляли за счет выступающих на концах амплифицированных фрагментов ДНК дезоксиаденозиновых остатков, согласно протоколам производителей (Promega, США). Плазмиды, содержащие целевые вставки, трансформировали в химически компетентные клетки. Для трансформации использовали 50 мкл химически компетентных клеток, которые оттаивали на льду в течение 5 мин, после чего добавляли 100-250 нг плазмидной ДНК, инкубировали на льду 5 мин, затем -30 с при 42° С и вновь на льду 2 мин, добавляли 250 мкл среды SOC комнатной температуры и инкубировали в течение 1 ч при 37° С. Далее производили высев 100 мкл культуры на чашку Петри с агаризованной средой Luria-Bertani (LB), содержащей соответствующие антибиотики. Культуру выращивали в течение 15-18 ч при 37° С. Проверку трансформантов проводили с помощью реакции ПЦР с с использованием стандартной пары праймеров (Т7, SP6). Для дальнейшей работы использовали отдельную колонию, которую высевали на жидкую среду LB. Выделение ДНК-конструкций производилось набора плазмидных С использованием

АхуРгер™ Plasmide Mini-Kit (Axygen Biosciences, США) по инструкции производителя.

В работе были использованы штаммы *Escherichia coli* Nova Blue. В состав жидкой среды LB (pH 7,5) для культивирования бактерий входили 1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl. Для приготовления агаризованной среды добавляли 1,5% агара. В состав жидкой питальной среды SOC входили 2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мM NaCl, 2,5 мM KCl, 20 мМ глюкоза. В среду LB для культивирования бактерий штамма *E. coli* NB добавляли 12,5 мкг/мл тетрациклина. При культивировании трансформантов, содержащих плазмиды pGEM-T Easy с целевыми вставками, в среду LB дополнительно добавляли 100 нг/мкл ампициллин.

2.13. Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили методом автоматического секвенирования, в основе которого лежит метод ферментативного секвенирования терминирующих с использованием транскрипцию дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (Sanger et al., 1977). Для постановки ПЦР использовали набор Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США). В состав реакционной смеси объемом 10 мкл входили следующие компоненты: 1 мкл плазмидной ДНК (150-250 нг/мкл), 0,5 мкл праймера (10 пМ); 2 мкл Ready reaction mix; 2 мкл 5-кратного BigDye Term Sequencing buffer; 4,5 мкл MilliQ. ПЦР проводили в амплификаторе С1000^{тм} Thermal Cycler (Bio-Rad, США) при следующих параметрах реакции амплификации: 1 мин – 96° C, (10 с – 96° C, 5 с – 45° C, 4 мин – 60° C) 25 циклов, хранение 12° С. Очистку реакционной смеси от свободных модифицированных нуклеотидов проводили с использованием ацетата натрия (3 М), 96% и 80% спирта. Нуклеотидные последовательности секвенировали с помощью автоматического ДНК-анализатора ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ секвенированных последовательностей проводили с использованием программы Sequencing Analysis 5.3.1. (Applied Biosystems, CIIIA).

2.14. Биоинформатический анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили, используя базу NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Сравнение данных нуклеотидных и транслированных аминокислотных последовательностей с базой данных NCBI проводили с помощью программы BLAST на сервере NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Подбор последовательностей нуклеотидных трансляцию нуклеотидных последовательностей, праймеров, выравнивание аминокислотных и нуклеотидных последовательностей выполняли при помощи NTI Vector Advance 9 (Invitrogen, США). программы Нуклеотидные последовательности и хромосомную локализацию генов пшеницы определяли с помощью BLAST базы данных Международного консорциума по секвенированию генома пшеницы IWGSC (International Wheat Genome Sequencing Consortium, http://www.wheatgenome.org/) на сервере URGI (http://urgi.versailles.inra.fr). Анализ экзон-интрон структуры проводили с помощью онлайн-серверов Gene Structure Display Server (http://gsds.cbi.pku.edu.cn/) и Spidey – mRNA to Genomic alignment (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/) используя кодирующую последовательность и Промоторные области геномную. были проанализированы на наличие потенциальных цис-элементов, важных для регуляции экспрессии, с помощью баз **PlantCARE** (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/) данных (Lescot et al., 2002), PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/) (Higo et al., 1999) и PlantPAN (http://PlantPAN.mbc.nctu.edu.tw) (Chang et al., 2008).

2.15. Статистическая обработка данных

Все опыты проводили как минимум в трех биологических и трех-четырех аналитических повторностях. В таблицах и на рисунках данные представлены в виде среднеарифметических значений и их стандартных отклонений. Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента при $P \le 0,05$ средствами программы Microsoft Exel 2013.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Действие стерин-связывающих агентов МВСD и нистатина на корни проростков пшеницы

Высшие растения, в отличие от животных и грибов, обладают многообразным стериновым составом, основными компонентами которого являются β -ситостерин, стигмастерин и кампестерин (Hartmann, 1998; Benveniste, 2004). Это является результатом многоступенчатого биосинтеза растительных стеринов и свидетельствует об их важности для жизни растений. Растительные стерины различаются количеством и положением двойных связей в цикле, а также характером боковой цепи (разветвленной или линейной, насыщенной или ненасыщенной) в положении С17 (Hartmann, Benveniste, 1987; Palta *et al.*, 1993; Mongrand *et al.*, 2004; Lefebvre *et al.*, 2007). Свободные стерины, как правило, составляют 70-90% от общего объема всех стеринов в ПМ большинства видов растений и типов тканей.

С помощью хромато-масс-спектрометрического анализа нами было показано наличие основных молекулярных видов мембранных растительных стеринов в проростках пшеницы (Сулкарнаева и др., 2014; Valitova *et al.*, 2014). Типичные масс-спектры силилированных производных стеринов проростков *T. aestivum* приведены на рис. 14. Как известно, β -ситостерин и кампестерин являются преобладающими стеринами высших растений и составляют бо́льшую часть от общего содержания стеринов (Benveniste, 2004; Dufourc, 2008). Значительно меньше содержание стигмастерина и холестерина. Как уже отмечалось, наличие холестерина в растительных клетках может достигать 10% в корнях пшеницы (Valitova *et al.*, 2011) и 19% в клетках арабидопсиса от общего содержания стеринов (Benveniste, 2003; Schaller, 2003; Laloi *et al.*, 2007). Содержание стеринов может варьировать от типа тканей и органов, а также от условий окружающей среды.



Б





Рис. 14. Электронные масс-спектры силилированных производных стеринов пшеницы: $\mathbf{A} - \boldsymbol{\beta}$ -ситостерин, \mathbf{B} – стигмастерин, \mathbf{B} – кампестерин, Γ – холестерин.

B
Модуляция стеринового компонента мембран при действии различных стрессовых факторов влияет на проницаемость и функционирование мембран и, как следствие, определяет стратегию стрессового ответа клеток (Валитова и др., 2010; Senthil-Kumar *et al.*, 2015). Изменения в мембране соотношения стеринов и полярных липидов могут менять ее молекулярную структуру и физиологические функции (Wang, Faust, 1990; Khan *et al.*, 2009; Wagatsuma *et al.*, 2015). Таким образом, изменение мембранных характеристик, в частности, стеринового компонента, влечет за собой значительные изменения в функционировании мембран в целом.

Существует множество подходов для изучения роли стеринового компонента в функционировании мембран, например, с помощью добавления экзогенных (насыщения) или связывания эндогенных стеринов (истощения). Искусственная модификация стеринового компонента может быть осуществлена путем применения различных специфичных агентов. В настоящей работе были использованы два стерин-связывающих агента – полиеновый антибиотик нистатин и макроциклический олигосахарид метил- β -циклодекстрин в экспериментах *in vivo* на целые растительные ткани.

3.1.1. Изменения липидного состава корней пшеницы при действии МВСD

Искусственная модификация стеринового компонента мембран может быть осуществлена путем связывания эндогенных стеринов с помощью полиенового антибиотика нистатина и циклического олигосахарида М β CD. Оба этих соединения способны уменьшать содержание стеринов в клетках, однако, механизмы связывания ими стеринов различны. Антибиотик нистатин уменьшает количество эндогенных стеринов путем их связывания и образования каналов в мембранах клеток, действие же М β CD заключается во взаимодействии олигосахарида со стеринами по принципу «гость-хозяин» и приводит к истечению стеринов из клеток (см. главу 1.3.).

В настоящей работе, методом динамического светорассеивания *in vitro* было установлено, что М β CD способен образовывать устойчивые комплексы с растительными стеринами, в частности с β -ситостерином (рис. 15). В индивидуальных растворах β -ситостерин характеризовался мономодальным распределением частиц с размером 115 нм (рис. 15 Б), а М β CD – бимодальным с размером частиц 3,7 нм и 290 нм (рис. 15 А, табл. 4). В смешанном растворе с β -ситостерином образовывались частицы с бимодальным распределением с размером частиц 0,7 нм и 4,5 нм (рис. 15, табл. 4).



Рис. 15. Распределение частиц по размерам в водных растворах 0,2% диметилсульфоксида при +25° С: A - 5 мМ М β CD, B - 5 мМ β -ситостерин, B -смесь М β CD и β -ситостерин в соотношении 1:1.

Электрокинетический потенциал (ζ -потенциалом) частиц в индивидуальных и смешанных растворах также отличался (табл. 4). Значения ζ -потенциала частиц в индивидуальных растворах β -ситостерин и М β CD были 3 мВ и – 2,5 мВ, соответственно, в смешанном растворе β -ситостерин и М β CD – 4,5 мВ. Это однозначно указывает на образование прочного супрамолекулярного комплекса β -ситостерин/М β CD.

Варианты	$D_{ m eff}$, нм	ζ-потенциал, мВ
MRCD	$3,7 \pm 0,1$	$-2,5 \pm 0,2$
MPCD	290 ± 4	_
<i>β</i> -Ситостерин	$115 \pm 1,8$	$-3 \pm 0,3$
ρ Cyma amarwy + M ρ CD	$0,7 \pm 0,1$	$-4 \pm 0,5$
p-ситостерин $+ mp$ CD	$4,5 \pm 0,3$	_

Таблица 4. Размер (D_{eff}) и ζ -потенциал образующихся частиц

Ранее в нашей лаборатории с использованием этих же методов было показано связывание стеринов *in vitro* стерин-связывающим агентом нистатином (Valitova *et al.*, 2011).

В экспериментах *in vivo*, при действии нистатитна и M β CD, в клетках корней происходило значительное уменьшение содержания пшеницы основных молекулярных видов стеринов (рис. 16 А). Кроме того, было показано, что уменьшение содержания стеринов в клетках корней пшеницы в присутствии стерин-связывающих агентов влияет на содержание других мембранных липидов, в частности, содержание ГлЦер. Наблюдалось значительное увеличение общего содержания ГлЦер в корнях пшеницы после воздействия нистатина МВСD (рис. 16 Б). В отличие от сфинголипидного, фосфолипидный состав корней пшеницы под действием нистатина и MBCD практически не претерпевал изменений. Было отмечено небольшое увеличение содержания большинства ФЛ при действии МВСD (рис. 17) (Valitova *et al.*, 2014).



Рис. 16. Изменения содержания содержания молекулярных видов стеринов (A) и общего содержания ГлЦер (Б) в корнях пшеницы при действии нистатитна и МβCD.



Рис. 17. Фосфолипидный состав корней пшеницы в присутствии МβCD. ФХ
– фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ФГ – фосфатидилглицерин,
ДФГ – дифосфатидилглицерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФС – фосфатидилсерин.

Таким образом, результаты настоящей работы показали, что нистатин и МβCD оказазывают сходное действие на содержание отдельных липидных классов в корнях пшеницы. Roche с соавт. (2008) была продемонстрирована способность М β CD специфически связываться с растительными стеринами (Roche *et al.*, 2008). Было показано, что М β CD значительно снижает общее содержание стеринов в клетках суспензионной культуры табака BY2, в то время как содержание ФЛ в клетках не изменялось, что, согласно авторам, демонстрирует специфичность связывания стеринов с М β CD. Таким образом, полученные нами результаты также подтверждают специфичность связывания растительных стеринов с М β CD и свидетельствуют о сходстве действия двух стерин-связывающих агентов (М β CD и нистатина) на липидный состав корней пшеницы.

3.1.2. Влияние стерин-связывающих агентов на физиологические параметры клеток корней пшеницы

Уменьшение содержания стеринов в клетках корней пшеницы В присутствии нистатина и MBCD приводило, однако, к совершенно разным физиологическим последствиям для клеток корней. Известно, что механизмы связывания ими стеринов различны. Антибиотик нистатин уменьшает количество эндогенных стеринов путем их связывания и образования каналов в мембранах клеток, действие же MBCD заключается во взаимодействии олигосахарида со стеринами по принципу «гость-хозяин» и приводит к истечению стеринов из мембран (см. главу 1.3.). Ранее показано, что с первых минут действия на корни проростков пшеницы нистатин вызывает резкое увеличение проницаемости мембран для ионов калия и протонов и деполяризацию ПМ (Гордон и др., 2005). В настоящей работе установлено, что 12 ч воздействие 1 мкМ нистатина вызывает трехкратное увеличение проницаемости плазмалеммы для ионов калия. При действии нистатина в большей концентрации (10 мкМ) выход ионов калия из клеток корней усиливался еще более значительно (табл. 5). Напротив, истощение стеринового компонента в клетках корней пшеницы с помощью «неканалоформера» М_βCD не приводило к нарушению проницаемости клеточных мембран для ионов калия. Можно полагать, что увеличение проницаемости ПМ клеток корней пшеницы для К⁺ при действии нистатина, в отличие от действия

МβCD, обусловлено его способностью образовывать «нистатиновые» каналы (см. главу 1.3.).

Варианты	К+, мкэкв/г сыр. в.		
Контроль	$0,5 \pm 0$		
Нистатин (1 мкМ)	$1,4 \pm 0,1$		
Нистатин (10 мкМ)	$2,3 \pm 0,1$		
МβCD (5 мМ)	$0,5 \pm 0$		

Таблица 5. Изменение содержания К⁺ в среде выращивания при 12 ч воздействии нистатина и МβCD

Как известно, увеличение ионной проницаемости плазмалеммы с помощью различных агентов, в том числе антибиотиков, сопровождается увеличение содержания АФК и развитием окислительного стресса (Часов и др., 2010; Dwyer *et al.*, 2009). В наших экспериментах было показано, что увеличение проницаемости мембран, вызванное 12 ч действием на корни проростков 1 мкМ нистатина, приводило к повышению содержания H_2O_2 в три раза. Воздействие на корни М β CD не вызывало изменений в содержании H_2O_2 (табл. 6).

В метаболизме H_2O_2 принимает участие целый ряд редокс-ферментов, в том числе пероксидазы, локализованные в клеточной стенке. В нашей лаборатории ранее была идентифицирована и охарактеризована апопластная пероксидаза 37 кДа, которая значительно активизируется при стрессе (Minibayeva *et al.*, 2001, 2009). В настоящей работе анализ экспрессии генов пероксидаз *TaPOX* 37 кДа с использованием метода ПЦР в реальном времени со специфичными праймерами показал, что при 12 ч действии на проростки 1 мкМ нистатина уровень продукта экспрессии в корнях повышался в 6 раз по сравнению с контролем (табл. 6). Можно предположить, что пероксидазы могут вносить вклад как в детоксикацию, так и образование АФК при действии нистатина.

Варианты	Содержание H ₂ O ₂ , мкМ/г сыр. в.	Относительный уровень экспрессии <i>TaPOX</i> , отн. ед.
Контроль	$6,3 \pm 0,4$	1 ± 0
Нистатин (1 мкМ)	$19,8 \pm 0,4$	$6,0 \pm 0,1$
МβCD (5 мМ)	$6,0 \pm 0,6$	_

Таблица 6. Содержание H₂O₂ и экспрессия *TaPOX* в клетках корнях пшеницы при 12 ч воздействии нистатина и MβCD

Слвиги В ионной проницаемости ПМ И редокс-статусе клеток. индуцированные нистатином, сопровождаются изменениями в энергетическом статусе растительных клеток. Ранее было показано, что нистатин значительно увеличивает потребление кислорода корнями пшеницы (Гордон и др. 2005). Напротив, МВСD не вызывал существенных изменений дыхательной активности корней (данные не представлены). Можно полагать, что усиленное потребление кислорода клетками корней в присутствии нистатина обусловлено возрастанием энергетических затрат для восстановления нарушенного ионного гомеостаза, а также активацией окислительных процессов. Таким образом, данные по увеличению содержания в клетках H₂O₂, изменению экспрессии генов пероксидаз и потреблению кислорода свидетельствуют о том, что воздействие на корни проростков пшеницы антибиотика нистатина, значительно увеличивающего проницаемость для ионов, вызывает в клетках окислительный стресс.

Важным механизмом, способствующим удалению окисленных белков, липидов и поврежденных органелл, является катаболический процесс аутофагии (Xiong *et al.*, 2007; Minibayeva *et al.*, 2012). Исследованиями, проведенными ранее в нашей лаборатории, было показано, что окислительный стресс в клетках корней пшеницы приводит к интенсивному образованию аутолитических вакуолей (аутофагосом) (Дмитриева и др., 2007; Дмитриева и др., 2009; Minibayeva *et al.*, 2012). Развитие окислительного стресса в клетках при 12 ч действии антибиотика нистатина сопровождалось образованием аутофагосом (рис. 18). При действии

нистатина в концентрации 10 мкМ выявлены многочисленные аутофагосомы, визуализированные с помощью специфического флуоресцентного красителя LT как интенсивно окрашенные яркие точечные образования, локализованные по всему объему клетки (рис. 18 ϵ). Фоновое окрашивание клеточных стенок, цитоплазмы и околоядерных областей неспецифично для данного красителя. При обработке корней нистатином в меньшей (1 мкМ) концентрации были визуализированы единичные аутофагосомы, которые обнаруживались не во всех клетках, а только в поверхностных эпителиальных клетках (рис. 18 ϵ). Обработка корней М β CD не вызывала образование аутофагосом (рис. 18 ϵ).



Рис. 18. Визуализация аутофагосом в клетках корней пшеницы с использованием LT при 12 ч воздействии нистатина и М β CD: *a* – контроль CaCl₂ (0,25 мМ); *б* – М β CD (5 мМ); *в* – нистатин (1 мкМ); *г* – нистатин (10 мкМ). Масштабный отрезок – 50 мкм.

Среди молекулярных механизмов, регулирующих процесс аутофагии и образования аутофагосом, определяющую играет роль активность многочисленных аутофагических генов и белков (ATG). Одними из ключевых ATG белков, участвующих в формировании аутофагосом, являются белки ATG4 и ATG8. Аутофагический белок ATG4 является цистеиновой протеиназой, имеющей ряд конститутивных остатков цистеина, благодаря чему она служит редокссенсором в клетке. ATG4 участвует в липидизации ATG8, расщепляя его в области С-конца и экспонируя глицин на С-конце. Это расщепление активирует ATG8 и позволяет этому белку связываться с ФЭ для дальнейшего формирования аутофагической мембраны (Levine, Klionsky, 2004). Белки, участвующие в формировании аутофагосом, являются конститутивными и синтезируются в клетках в нормальных физиологических условиях. При стрессе, однако, их активность значительно возрастает. Нами был проведен анализ экспрессии аутофагического гена TaATG4 в корнях пшеницы, подвергнутых воздействию нистатина. Методом анализа ПЦР в реальном времени было показано незначительное (в 2 раза) увеличение экспрессии TaATG4 после 12 ч действия нистатина, при длительном (36 ч) воздействии нистатина уровень экспрессии *ТаАТG4* возрастал в 8-9 раз (рис. 19).



Рис. 19. Относительный уровень экспрессии *TaATG4* при действии нистатина. Уровень транскриптов в контроле принят за единицу.

Таким образом, стерин-специфичный агент нистатин с увеличением времени воздействия драматически стимулировал экспрессию гена *TaATG4*, кодирующего редокс-регулируемый аутофагический белок ATG4.

Многочисленные исследования свидетельствует о том, что аутофагия играет двойственную роль и может способствовать как выживанию, так и гибели клеток (Kaushik *et al.*, 2006). Анализ жизнеспособности клеток корней при действии 1 мкМ нистатина показал, что процент гибели клеток был невысоким по сравнению с контролем (рис. 20). С ростом концентрации нистатина происходило падение жизнеспособности корневых клеток, связанное, по всей видимости, с нарушением целостности мембран и развитием окислительного стресса.



Рис. 20. Жизнеспособность клеток корней пшеницы при 12 ч действии нистатина.

Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что, несмотря на сходство действия на липидный состав корней, нистатин и М β CD оказывают различное влияние на физиологические параметры, такие как проницаемость ПМ для ионов калия, дыхательную активность клеток корней, содержание H₂O₂, активность антиоксидантного фермента, развитие аутофагии и жизнеспособность клеток. Нистатин проявляет непосредственное токсичное действие на растительные клетки, в то время, как физиологические эффекты М β CD на

проростки проявлялись только при совместном действии с другими стрессовыми факторами. Так, 12 ч выдерживание проростков пшеницы с М β CD и последующее 1 ч воздействие на них низкой положительной температуры приводило к резкому (в 11 раз) увеличению содержания H₂O₂ в корнях (рис. 21).



Рис. 21. Содержание H₂O₂ в клетках корнях пшеницы при воздействии МβCD, холода и совместном действии МβCD и холода.

Выход электролитов из клеток в присутствии М β CD незначительно увеличивался, что сопровождалось падением индекса мембранной стабильности (ИМС). Этот эффект усиливался при совместном действии М β CD и низкой положительной температуры на растения (табл. 7).

Таблица 7. Изменения выхода электролитов (С) и ИМС при действии МβCD, холода и совместном действии МβCD и холода

Варианты	С, %	ИМС, %
Контроль	$6,4 \pm 1,7$	93,6
MβCD	$9,4 \pm 0,1$	90,6
Холод (+4° С, 1 ч)	8,4 ± 3,8	91,6
МβСD + холод	$10,7 \pm 0$	89,3

Эти факты могут свидетельствовать о том, что стерины участвуют в предотвращении развития окислительного стресса и стабилизации мембран в клетках корней пшеницы при действии холода, увеличивая адаптационные возможности растения при стрессе.

Таким образом, анализ физиолого-биохимических эффектов стеринсвязывающих агентов свидетельствует о важности поддержания уровня стеринов для жизнедеятельности растения. Можно выделить специфику этих агентов, как в механизмах связывания стеринов, так и физиологических последствиях этого связывания. Истощение стеринов в сочетании с образованием пор в мембранах и нарушением мембранной целостности обуславливает острую токсичность нистатина. С другой стороны, физиологические последствия истощения стеринов при действии МβCD проявляются лишь в стрессовых условиях.

3.2. Действие низкой положительной температуры на проростки пшеницы

3.2.1. Изменения индекса мембранной стабильности и редоксстатуса в корнях и листьях

Неблагоприятная температура является одним из распространенных стрессовых факторов, действию которых подвергается растение в природе. Известно, что при действии низких положительных температур замедляются основные физиологические процессы (фотосинтез, транспирация, водообмен и др.), снижается энергетическая эффективность дыхания, листья теряют тургор и меняют окраску из-за разрушения хлорофилла, резко возрастает количество эндогенных веществ-криопротекторов (сахаров, пролина и бетаина и др.), повышается концентрация Ca^{2+} в цитоплазме ([$Ca^{2+}]_{cyt}$), увеличивается содержание АФК и активируются антиоксидантные системы (Kendall, McKersie, 1989; Hung *et al.*, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2007). Одним из ранних проявлений холодового стресса является изменение функциональной активности мембран. В настоящее время особое внимание уделяется изучению сигнальных путей, контролирующих ответные реакции клеток на холодовой стресс, в частности посредством серин-

треониновых протеинкиназ, реагирующих на изменение текучести мембран (Новикова и др., 2007; Зорина и др., 2014). Современные возможности молекулярной биологии позволяют исследовать транскриптомы и выявлять холодиндуцируемые гены, факторы транскрипции и *цис*-элементы, регулирующие активность генов при изменении температуры окружающей среды (Gilmour *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Fowler, Thomashow, 2002; Ruelland *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2012).

В наших экспериментах о состоянии и проницаемости мембран косвенно судили по выходу из тканей проростков электролитов и ИМС. При действии низкой положительной температуры на проростки пшеницы в корнях в течение всего времени воздействия наблюдалось увеличение выхода электролитов и, соответственно, снижение ИМС. Напротив, в листьях не были выявлены значительные изменения проницаемости мембран для электролитов и ИМС (табл. 8).

Таблица 8. Изменения выхода электролитов (С) и ИМС в корнях и листьях проростков пшеницы при действии холода

Варианты	Корни		Листья		
	С, %	ИМС, %	С, %	ИМС, %	
Контроль	6,4 ± 1,7	93,6	11 , 4 ± 2 , 6	88,6	
Холод (+4° С, 1 ч)	8,4 ± 3,8	91,6	$12,7 \pm 1,8$	87,3	
Холод (+4° С, 12 ч)	$14,4 \pm 2,4$	85,6	11,5 ± 2,1	88,5	

Кроме того, в корнях после 1 ч действия низкой положительной температуры наблюдалось изменение редокс-статуса, что подтверждалось увеличением уровня ПОЛ и содержания H₂O₂ (табл. 9). В листьях, наоборот, происходило незначительное снижение уровня ПОЛ, а содержания H₂O₂ олставалось неизменным.

Варианты	Корни		Листья		
	ПОЛ, %	H ₂ O ₂ , мкМ/г сыр. в.	ПОЛ, %	H ₂ O ₂ , мкМ/г сыр. в.	
Контроль	100 ± 1	$6,3 \pm 0,5$	$100 \pm 3,1$	$5,9 \pm 0,4$	
Холод (+4° С, 1 ч)	157 ± 11	$13,2 \pm 2,4$	$89 \pm 4,2$	$6,3 \pm 0,7$	
Холод (+4° С, 12 ч)	$117,3 \pm 7$	5,4 ± 1,1	96,4 ± 8,1	8,1 ± 1,2	

Таблица 9. Изменения уровня ПОЛ и содержания H₂O₂ в корнях и листьях пшеницы при холодовом стрессе

Как уже отмечалось, в метаболизме H_2O_2 принимает участие целый ряд редокс-ферментов, в том числе пероксидазы, локализованные в клеточной стенке. В растениях пероксидазы способны не только разлагать, но и образовывать H_2O_2 при стресс-индуцированном окислительном взрыве, что говорит о многообразной регуляторной роли этих ферментов в поддержании редокс-гомеостаза клеток (Mittler, 2002; Cosio, Dunand, 2009; Minibayeva *et al.*, 2009). В стрессовых условиях повышение общей пероксидазной активности происходит путем активации пула имеющихся пероксидаз, а также посредством синтеза ферментов *de novo*. В настоящее работе нами показано, что в корнях при кратковременном (1 ч) холодовом стрессе повышалась активность пероксидазы в 3,5 раза и экспрессия генов, кодирующих пероксидазу с молекулярной массой 37 кДа (*TaPOX*), в 3 раза по сравнению с контролем. В листьях активность генов *TaPOX* была очень низкой (данные не представлены).

Негативным последствием повышения уровня АФК и ПОЛ является накопление в клетке окисленных макромолекул. Как уже отмечалось выше, важным механизмом, способствующим удалению окисленных макромолекул и поврежденных органелл, является процесс аутофагии. Известно, что окислительный стресс является индуктором аутофагии в клетках (Xiong *et al.*, 2007; Minibayeva *et al.*, 2012). Показано развитие аутофагии в растительных клетах при таких стрессовых воздействиях как поранение, патогены, засуха, засоление и др. (Рябовол, 2014; Sláviková *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Hayward, Dinesh-Kumar, 2010).

Данные об активации процессов аутофагии в растениях при холодовом стрессе весьма ограничены. Нами впервые показано, что в корнях проростков пшеницы, подвергнутых холодовому стрессу, происходит индукция аутофагии (рис. 22 A, δ). Скопление аутофагосом в виде точечных образований, локализованных в цитоплазме по всему объему клетки, мы наблюдали после выдерживания проростков пшеницы при низкой положительной температуре в течение 1 ч и последующего выдерживания проростков при комнатной температуре в течение 2 ч (рис. 22 A, δ). Сразу после холодового воздействия аутофагосомы в клетках корней пшеницы не визуализировались, что, вероятно, обусловлено временным лагом, необходимым для накопления поврежденных и окисленных макромолекул и органелл, а затем формируются аутофагосомы. Ранее было показано, что аутофагия в растительных клетках является защитной реакцией в стрессовых условиях и направлена на устранение из окисленных, а также отслуживших макромолекул и поврежденных структур (Minibayeva *et al.*, 2012).



Рис. 22. **А** – Визуализация аутофагосом с помощью флуоресцентного красителя LT в клетках корней пшеницы при действии холода (+4° C) и последующего выдерживания проростков при комнатной температуре: a – контроль, δ – 1 ч холод + 2 ч комнатная температура. Масштабный отрезок – 50 мкм. **Б** – Относительный уровень экспрессии *TaATG8* в корнях пшеницы при холодовом стрессе.

Известно, что для образования аутофагосом необходима активность многочисленных белков ATG семейства (autophagy-related proteins), среди которых ключевую роль играет ATG8. Этот белок вовлечен в липидирование фагофора в убиквитин-подобном процессе. Белок ATG8 часто используют в качестве молекулярного маркера для мониторинга макроаутофагии (Kirisako et al., 1999). Коллегами нашей лаборатории был проведен детальный биоинформатический анализ и впервые охарактеризована структура аутофагического белка TaATG8g и выявлены множественные мотивы, необходимые для их взаимодействия с лигандами (Рябовол, 2014; Рябовол, Минибаева, 2014). Индукция аутофагии при действии низкой положительной температуры была также подтверждена с помощью анализа активности маркерного гена аутофагии TaATG8. Результаты показали, что в корнях проростков пшеницы активность генов семейства *TaATG8* при действии низкой положительной температуры повышается в 3,5 раза и практически не изменяется при выдерживании проростков пшеницы при +4° С в течение 3 ч (рис. 22 Б). В литературе имеются сведения о том, что при действии низкотемпературного стресса происходит усиление экспрессии и другого аутофагического гена ATG6 в проростках риса (Rana et al., 2012) и пшеницы (Yue et al., 2015). Можно предположить, что усиление экспрессии аутофагических генов в условиях холодового стресса обусловлено необходимостью синтеза этих белков de novo для формирования мембран аутофагосом. Таким образом, в условиях холодового стресса аутофагия выполняет роль защитного механизма для обезвреживания деградации поврежденных И окисленных И холодом макромолекул.

Таким образом, при холодовом стрессе в листьях проростков пшеницы значительных сдвигов в проницаемости мембраны и редокс-статусе клеток не наблюдалось. В корнях, напротив, происходило увеличение проницаемости мембран для электролитов и снижение ИМС, а также изменение редокс-статуса клеток и индукция аутофагической деградации. Эти данные свидетельствуют о различной чувствительности листьев и корней на действие холода. Известно, что отдельные органы теплолюбивых растений обладают разной устойчивостью к холоду (Попов и др., 2010; Los, Murata, 2004). Так, противоположная реакция на закаливание разных частей растения, скорее всего, состоит в том, что, в отличие от корней, листья реагируют на холодовое закаливание увеличением содержания липидов и повышением уровня ненасыщенности их ЖК, и это можно считать типичной адаптивной реакцией растений на действие низких температур. В корневой системе, наоборот, имеет место некоторое снижение, как количества липидов, так и величины индекса ненасыщенности ЖК. Это может быть связано с деградацией клеточных мембран в результате интенсификации процессов ПОЛ при низких положительных температурах (Попов и др., 2010).

3.2.2. Изменения липидного состава в корнях и листьях проростков пшеницы: стерины, гликолипиды, фосфолипиды

Адаптивные возможности растений при низкотемпературном стрессе в значительной степени зависят от того, насколько они способны сохранять текучесть, эластичность мембран и предотвращать фазовый переход липидов (Лось, 2005; Попов и др., 2010). В настоящее время изменения в липидном составе мембран рассматривают в качестве маркеров стресса (Barkla, Pantoja, 2011; Furt et al., 2011). Низкие температуры приводят к повышению вязкости липидного бислоя и губительному для клетки переходу мембран из жидкокристаллического состояния В состояние геля. Насыщенные жирные кислоты ИЗ жидкокристалического состояния переходят в состояние геля быстрее, чем ненасыщенные жирные кислоты. Чем больше в мембране насыщенных жирных кислот, тем она «жестче», т.е. менее лабильна, и тем чаще в ней возникают нарушения (Campos et al., 2003). Известно, что холодовой стресс значительно изменяет липидный состав мембраны, в том числе степень ненасыщенности фосфои гликолипидов и относительное соотношение стеринов, цереброзидов и ФЛ, в частности, ФХ (Макаренко и др., 2010; Uemura, Steponkus, 1999; Bohn et al., 2007). Было показано, что в растениях ржи концентрация мембранных стеринов увеличивается в холодное время, и этот эффект более выражен у устойчивых сортов ржи (Uemura, Steponkus, 1994). При холодовом стрессе происходит

сверхэкспрессия ряда ферментов липидного, в том числе стеринового, биосинтеза (Badea, Basu, 2009; Byun *et al.*, 2014). В мембране стерины находятся в липидном окружении и взаимодействуют с ГлЦер и ФЛ. Изменение соотношения стерины/ГлЦер и стерины/ФЛ может влиять на функционирование мембран. В условиях стресса важным для обеспечения функциональной активности мембран является поддержание соотношения стеринов с другими мембранными липидами. Несмотря на то, что стерины являются стабилизирующими компонентами мембран и могут влиять на их состояние при стрессе, информация о роли стеринов в холодоустойчивости растений крайне ограничена. В основном, это данные о количественных изменениях общего содержания стеринов, а не их молекулярных форм (Bohn *et al.*, 2007; Senthil-Kumar *et al.*, 2013).

Стерины

В наших экспериментах при кратковременном (1 ч) действии низкой положительной температуры (+4° C) общее содержание стеринов и в корнях, и в листьях проростков пшеницы значительно возрастало по сравнению с контролем. Более длительное (12 ч) воздействие низкой положительной температуры приводило к снижению общего содержания стеринов (рис. 23), а также всех молекулярных видов (табл. 10) до контрольного уровня, как в корнях, так и в листьях проростков пшеницы.

Растительные стерины, особенно β -ситостерин и кампестерин, играют существенную роль в упорядочивании жирнокислотных цепей в мембране, тем самым понижая ее текучесть (Иванова и др., 1997; Shuler *et al.*, 1990). В настоящее время известно, что соотношение количества 24-метил-/этилстеринов является важным показателем метаболизма растений, а его регуляция – ключевым звеном многих процессов роста, развития, а также стрессовых ответов растений (Dufourc, 2008; Haubrich *et al.*, 2015).



Рис. 23. Изменение общего содержания стеринов в корнях и листьях проростков пшеницы при холодовом стрессе.

Варианты		β-Ситостерин	Стигмастерин	Кампестерин	Холестерин
иноу Контроль 0,72 Холод (+4° С, 1 ч) 2,16 Холод (+4° С, 12 ч) 0,81		$0,72 \pm 0,14$	$0,09 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,04$
		$2,16 \pm 0,12$	$0,26 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,19$	$0,\!08 \pm 0,\!01$
		0,81 ± 0,10	0,03 ± 0,01	$0,35 \pm 0,08$	$0,06 \pm 0,01$
Контроль		$2,23 \pm 0,57$	$0,\!44 \pm 0,\!10$	$0,86 \pm 0,24$	0,11 ± 0,01
истья	Холод (+4° С, 1 ч)	$11,57 \pm 0,34$	$1,08 \pm 0,19$	$2,\!47 \pm 0,\!22$	$0,\!18 \pm 0,\!02$
	Холод (+4° С, 12 ч)	$2,59 \pm 0,42$	0,31 ± 0,05	0,86 ± 0,15	$0,\!07\pm0,\!02$

Таблица 10. Изменение состава и содержания (мкг/г сыр. в.) молекулярных видов стеринов при действии низкой положительной температуры

В растениях контрольного варианта отношение относительного содержания 24-метилстеринов к 24-этилстеринам в листьях было ниже, чем в корнях (табл. 11). При действии низкой положительной температуры в корнях наблюдалось лишь незначительное увеличение соотношения 24-метил-/этилстерины, что говорит об увеличении доли относительного содержания кампестерина. В листьях, напротив, наблюдалось уменьшение соотношения 24-метил-/этилстерины вследствие увеличения относительной доли 24-этилстеринов – β -ситостерина и стигмастерина (табл. 10, 11). Высокое содержание *β*-ситостерина в листьях может оказывать протекторное действие на мембраны, в том числе, проявляя свое антиоксидантное действие. Как отмечалось в гл. 1.2.4., β-ситостерин обладает высокой антиоксидантной активностью (Wang et al., 2002; Vivancos, Moreno, 2005; Pose et al., 2009). Было высказано предположение, что уникальная способность растений к синтезу этилстеринов, в отличие от животных, может являться частью эволюционного процесса адаптации для преодоления широких колебаний температур и поддержания важных мембрано-связанных процессов метаболизма (Dufourc, 2008). Известно, что присутствие дополнительной этильной группы может усиливать Ван-дер-Ваальсовые взаимодействия, приводящие к большему мембранному сцеплению И, следовательно, меньшей температурной чувствительности (Beck et al., 2007).

Таблица 11. Соотношение 24-метил-/этилстерины в корнях и листьях проростков пшеницы при действии холода (+4° С)

Соотношение 24-метил-/этилстерины				
Варианты Корни Листья				
Контроль	$0,32 \pm 0,05$			
Холод (+4° С, 1 ч)	$0,\!46 \pm 0,\!01$	$0,20 \pm 0,01$		
Холод (+4° С, 12 ч)	$0,\!41 \pm 0,\!02$	$0,30 \pm 0,03$		

Увеличение относительного содержания 24-этилстеринов в листьях в условиях кратковременного холодового стресса, возможно, является одним из механизмов, способствующих повышению устойчивости мембран к изменению температур. Более длительное (12 ч) воздействие низкой температуры сопровождалось восстановлением соотношения 24-метил-/этилстерины до контрольного уровня и в корнях, и в листьях (табл. 11).

Гликолипиды

Еще одним липидным компонентом мембран являются гликолипиды, характерной особенностью которых является наличие углеводного фрагмента (Furt et al., 2011). Основными гликолипидами растений являются ГлЦер, МГДГ и дигалактозилдиглицеридами (ДГДГ).Гликоцерамиды являются главными растительными сфинголипидами, состоящими из сфингоидного основания, длинноцепочечной насыщенной ЖК и углеводного остатка (Spassieva, Hille, 2003; Sperling et al., 2005; Cacas et al., 2013). Важной особенностью ГлЦер является их повышенное сродство к стеринам, обусловленное взаимодействием боковых цепей стеринов с насыщенными алкильными цепями сфинголипидов. Это определяет их упаковку и способствует образованию липидных рафтов, плотную или микродоменов, в связи с чем часто в литературе эти два класса липидов называют рафтоообразующими (Simons, Ikonen, 1997; Ilangumaran, Hoessli, 1998; Brown, London, 2000; Edidin, 2003). Эти микродомены могут играть важную роль при проведении сигналов внутрь клетки и служить платформами для ферментных сигнальных комплексов.

Нами была выявлена интересная закономерность между изменениями в содержании стеринов и ГлЦер при действии холода. При кратковременном (1 ч) действии низкой положительной температуры увеличение содержания стеринов в корнях и листьях пшеницы (рис. 23) сопровождалось значительным снижением содержания ГлЦер (рис. 24). Заметное снижение уровня стеринов при длительном (12 ч) выдерживании растений на холоде также сопровождалось увеличением содержания ГлЦер. Похожую обратную зависимость между стеринами и ГлЦер мы наблюдали ранее при действии стерин-связывающих агентов в корнях пшеницы 3.1.1.). Эти (см. главу данные свидетельствуют 0 возможной тесной функциональной взаимосвязи между стеринами и ГлЦер, в том числе при рафтообразовании. Однако детальные механизмы такой обратной зависимости остаются неизвестными и требуют дальнейшего изучения.



Рис. 24. Изменение общего содержания ГлЦер в корнях и листьях проростков пшеницы при холодовом стрессе.

Интересно, что общее содержание ГлЦер в корнях было в 2 раза больше, чем в листьях. В отличие от ГлЦер, содержание полярных гликолипидов МГДГ и ДГДГ было больше в листьях, чем в корнях (рис. 24, табл. 12). В фотосинтезирующих тканях глицерогликолипиды входят в состав мембран хлоропластов, и их содержание подвержено изменениям при действии стрессовых факторах (Lyons, 1973; Palva *et al.*, 2002). В наших экспериментах показано, что при действии низкой положительной температуры наблюдалось значительное снижение содержания основных гликолипидов. Содержание ГлЦер и ДГДГ снижалось примерно в 2 раза, а МГДГ более чем в 5 раз, как в корнях, так и в листьях проростков пшеницы (табл. 12).

Таблица 12. Содержание гликолипидов (мкг/г сыр. в.) в корнях и листьях проростков пшеницы при действии холода (+4° С, 1 ч)

Липиды	Корни		Листья	
	Контроль	Холод	Контроль	Холод
МГДГ	366 ± 62	68 ± 17	507 ± 83	87 ± 13
ДГДГ	450 ± 34	257 ± 48	663 ± 75	264 ± 37

94

Можно предположить, что при действии низкой положительной температуры происходит расщепление гликолипидов и высвобождение углеводных компонентов. Как известно, в условиях холодового стресса наблюдается повышение уровня содержания сахаров, которые обладают криопротекторными свойствами (Korn *et al.*, 2008). В связи с этим, расщепление гликолипидов может вносить вклад в повышение температурной устойчивости.

Фосфолипиды

Другой класс мембранных липидов – это фосфолипиды (ФЛ), содержание которых варьирует от 40 до 90% общего количества липидов (Wang *et al.*, 2003). В состав ФЛ входят длинноцепочечные насыщенные и ненасыщенные ЖК, содержащие от 10-12 до 26-28 атомов углерода. Характерным для ФЛ является наличие фосфатной группы, к которой присоединена специфическая полярная группа. Полярными группами являются азотистые основание (этаноламин или холин), аминокислотный остаток (серин) или углеводный фрагмент (инозит) (Wang *et al.*, 2003).

Количественный анализ фосфолипидного состава методом денситометрии показал наличие основных ФЛ в корнях и листьях проростков пшеницы (рис. 25). Общее содержание ФЛ в листьях (2347,2 мкг/г сыр. в.) было в два раза выше, чем в корнях (1243,4 мкг/г сыр. в.) (рис. 25). Фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭ) являются преобладающими и составляют обычно до 68-80% от общего содержания ФЛ. В оптимальных условиях относительное содержание ФХ и в корнях (рис. 25 А), и в листьях (рис. 25 Б) было в 2 раза выше, чем относительное содержание ФЭ. Содержание других ФЛ, таких как фосфатидная кислота (ФК), фосфатидилглицерин (ФГ), дифосфатидилглицерин (ДФГ), фосфатидилинозит (ФИ) и фосфатидилсерин (ФС) в контроле было значительно меньше (рис. 25).

Анализ фосфолипидного состава в корнях и листьях пшеницы при кратковременном (1 ч) действии низкой положительной температуры выявил лишь незначительное уменьшение основных ФЛ в корнях (рис. 25 A), в то время как в

листьях происходили существенные изменения в составе основных ФЛ (рис. 25 Б). Наиболее явные изменения наблюдались в содержании двух основных классов мембранных ФЛ – ФХ и ФЭ: значительное уменьшение ФХ и повышение ФЭ при действии холода (рис. 25). Длительное (12 ч) действие низкой положительной температуры приводило к более выраженным изменениям в составе основных ФЛ как в корнях, так и листьях.



Рис. 25. Изменение содержания ФЛ в корнях (А) и листьях (Б) пшеницы при холодовом стрессе.

Известно, что ФЭ образует сильные водородные связи с собственной фосфатной группой и фосфатами окружающих молекул, благодаря чему имеет более высокую температуру фазового перехода по сравнению с ΦX (Suits *et al.*, 2005). Изменение соотношения ФХ/ФЭ при действии различных стрессовых факторов является одним из механизмов поддержания физико-химических параметров мембраны (Wu et al., 2005). В наших экспериментах развитие холодового стресса сопровождалось различным характером изменений соотношения ФХ/ФЭ. Если в корнях это соотношение было 2,68 после 1 ч и 0,24 после 12 ч холодового воздействия, то в листьях это соотношение было 0,18 после 1 ч и 2,95 после 12 ч. Уменьшение соотношения $\Phi X/\Phi \Theta$ в корнях и его увеличение в листьях, как показано в рис. 25, обусловлено значительными изменениями в содержании ФЭ. Такое изменение соотношения ФХ/ФЭ в листьях, вероятно, способствует поддержанию физикохимических параметров мембраны и ее проницаемости. Многими исследователями были показаны заметные изменения в составе мембранных липидов плазмалеммы во время холодовой акклиматизации (Steponkus et al., 1993; Minami et al., 2009, 2010). Так, в ходе холодовой акклиматизации озимой ржи происходили изменения в липидном составе ПМ, которые были наиболее выражены в листьях, в частности, увеличение доли ФХ и ФЭ и снижение доли ГлЦер (Lynch, Steponkus, 1987; Uemura, Steponkus, 1994).

Ярко выраженные изменения наблюдались в содержании фосфатидной кислоты. Если при кратковременном холодовом воздействии уровень ФК и в корнях, и в листьях был таким же низким, как в контроле, то при длительном холодовом воздействии уровень ФК в корнях и листьях значительно возрастал (рис. 25). Как известно, ФК может выполнять сигнальные функции и выступать в качестве вторичного посредника в животных и растительных клетках (Wang, 2005). Многими авторами показано увеличение уровня ФК в клетках растений в ответ на действие биотических и абиотических воздействий (Welti *et al.*, 2002; Meijer, Munnik, 2003). Фосфатидные кислоты обладают ионофорными свойствами и способны транспортировать ионы Ca²⁺ и H⁺ через мембраны растительных клеток по градиенту их концентрации (Медведев и др., 2006).

Полученные нами данные свидетельствуют о временны́х и качественных различиях в изменениях фосфолипидного профиля в корнях и листьях проростков пшеницы в условиях гипотермии. В корнях изменения содержания основных ФЛ наблюдались лишь при длительном холодовом воздействии, в то время как в листьях динамичные изменения содержания основных ФЛ происходили в течение всего времени воздействия.

Таким образом, холодовой стресс в проростках пшеницы характеризуется универсальными стрессовыми реакциями, такими как сдвиги редокс-статуса и изменениями проницаемости мембран, а также количественными и качественными изменениями в содержании стеринов, гликолипидов и ФЛ. Было показано, что комплекс изменений, происходящих в липидном составе листьев, в том числе в молекулярных видов стеринов, способствует соотношении поддержанию стабильности мембран и формированию большей температурной устойчивости листьев, по сравнению с таковой корней. Повышенное содержание 24этилстеринов в листьях может являться частью процесса адаптации для преодоления колебаний температур, в том числе посредством обеспечения антиоксидантной защиты, усиления Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и поддержания важных мембрано-связанных процессов метаболизма. Можно полагать, что изменения стеринового профиля при стрессе обусловлены также изменениями на генном уровне. В связи с этим, нами был проведен анализ структуры и активности генов, контролирующих биосинтез стеринов.

3.4. Характеристика С24-стерин метилтрансферазы пшеницы

3.4.1. Биоинформатический анализ белка TaSMT1

Ключевым этапом многоступенчатого процесса биосинтеза стеринов в растениях является реакция С-метилирования 24-го атома углерода стеринов. Этот этап определяет структурное разнообразие стеринов у растений, приводя к образованию 24-метил- и этилстеринов. Реакция С-метилирования катализируется ферментом C24-стерин метилтрансферазой. Гетерологичная экспрессия кДНК SMT в дрожжевых системах *erg6* с дефектом в синтезе SMT показала существование нескольких изоформ SMT, классифицированных как SMT1, катализирующая первичное метилирование 24-го атома углерода боковой цепи стеринов, и SMT2, катализирующая вторичное метилирование (Bouvier-Navé *et al.*, 1998). Каждая из изоформ обладает уникальной специфичностью к субстрату.

В базе данных NCBI нами была обнаружена аминокислотная последовательность C24-стерин метилтрансферазы *T. aestivum* (TA-MT, GenBank: ААВ37769.1) (Subramaniam et al., 1999). Это трансмембранный белок с молекулярной массой 41 кДа, состоящий из 363 аминокислот. Известно, что коферментом данного белка является S-аденозил-L-метионин – донор метильной группы, а кофактором – глутатион, кроме того, для работы фермента необходимо присутствие ионов Mg²⁺. Наличие остатка цистеина в составе кофактора SMT может свидетельствовать о редокс-регуляции активности данного фермента. Информация о том, к какому семейству С24-стерин метилтрансфераз относится данный белок пшеницы, отсутствовала. Проведенное нами сопоставление аминокислотной последовательности с гомологичными белками из базы данных NCBI показало, что данный белок пшеницы консервативен и имеет более высокую степень сходства с последовательностями белков семейства SMT1 (59,7%), по сравнению с белками семейства SMT2 (30,7%) (рис. 26). Наибольшая идентичность аминокислотной последовательности TA-MT была установлена с SMT1 других злаковых, в частности, ячменя (86,8%), Brachypodium (86%), кукурузы (84,6%) и риса (82,6%) (табл. 13). С24-стерин метилтрансфераза пшеницы обладает характерными для белков данного семейства особенностями, а именно трех стеринсвязывающими сайтами и S-аденозил-L-метионин-связывающим сайтом (рис. 26). На рисунке 26 показаны консервативные остатки аминокислот, непосредственно участвующих в связывании стерина и аденозил-метионина с ферментом за счет водородных связей: Glu₈₂, His₉₀, Asp₁₂₅, Glu/Asp₁₅₂, Glu₁₉₅, Glu₂₂₄, Asp₂₇₆ (рис. 27 Б) (Nes et al., 2004). Кроме того, SMT растений и грибов содержат С-концевой сигнальный домен (pfam08498), необходимый для адресной доставки данного белка в мембрану ЭПР, где происходит биосинтез стеринов (рис. 27). Таким

образом, первичная структура данного белка, идентифицированного нами как C24стерин метилтрансфераза 1 пшеницы (TaSMT1), имеет типичные консервативные последовательности, характерные для SMT1 других растений.



Рис. 26. Филогенетическое древо (**A**) и результат множественного выравнивания охарактеризованных и клонированных аминокислотных последовательностей (**Б**) белков семейства SMT1: AtSMT1 – Arabidopsis thaliana, GmSMT1 – Glycine max, NtSMT1 – Nicotiana tabacum, OsSMT1/2 – Oryza sativa, TaSMT1 – Triticum aestivum, HvSMT1 – Hordeum vulgare, BdSMT1-like – Brachypodium distachyon, ZmSMT1/2 – Zea mays, AetSMT1/2 – Aegilops tauschii, ScSMT – Saccharomyces cerevisiae. Выделены консервативные сайты: стерин-связывающие сайты (I, III и IV), аденозилметионин-связывающий сайт (II).



Рис. 27. Схема консервативных участков в первичной структуре белка TaSMT1.

Таблица 13. Степень идентичности (%) аминокислотных последовательностей белков семейства SMT1 относительно белка пшеницы

Номер белка в базе	Harrows Farms	D	Идентичность	Длина
данных (NCBI)*	Название оелка	Вид	(%)	(амк.)
AAB37769.1	delta-24-sterol methyltransferase	T. aestivum	100	363
BAJ90950.1	predicted protein	H. vulgare	86,8	344
XP_010228238.1	PREDICTED: cycloartenol-C- 24-methyltransferase 1	B. distachyon	86	344
EMT04218.1	cycloartenol-C-24- methyltransferase 1	A. tauschii	83,2	337
NP_001106071.1	sterol methyltransferase1	Z. mays	84,6	343
AAC34988.1	cycloartenol-C24- methyltransferase	O. sativa Japonica Group	82,6	349
AAC34951.1	S-adenosyl-methionine-sterol- C- methyltransferase	N. tabacum	77,8	346
NP_001238391.1	S-adenosyl-L- methionine:delta24-sterol-C- methyltransferase	G. max	76,1	367
NP_196875.1	cycloartenol-c-24- methyltransferase	A. thaliana	75,2	336
NP_013706.1	sterol 24-C-methyltransferase	S. cerevisiae	53,9	383

* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

3.4.2. Идентификация и характеристика гомеологичных генов пшеницы *TaSMT1*

Ранее в геноме пшеницы *Т. aestivum* был аннотирован один ген, кодирующий C24-стерин метилтрансферазу (*TA-MT*, GenBank: U60755.1, Subramaniam *et al.*, 1999). Ген представляет собой линейную последовательность ДНК длиной 4483 п.н. с кодирующей областью размером 1092 п.н. и состоящий из 11 экзонов и 10 интронов. Информация о промоторной области гена *TaSMT* чрезвычайно ограничена, в базе данных NCBI имелась лишь короткая последовательность регуляторной (некодирующей) области гена *TA-MT* размером в 266 нуклеотидов. Отсутствовала информация о последовательностях стрессчувствительных мотивов.

В настоящее время для многих растений, таких как арабидопсис, соя, табак и рис показано наличие множества изоформ белков SMT и кодирующих их генов (Bouvier-Navé *et al.*, 1997; Schaller *et al.*, 1998; Neelakandan *et al.*, 2009, 2010; Carland *et al.*, 2010). Удивительно, что для пшеницы в базе данных представлена информация лишь об одном гене *SMT*. Учитывая, что геном пшеницы является сложноорганизованным и состоит из трех субгеномов, можно полагать, что для этого злака также характерно наличие нескольких генов *SMT*. В связи с этим, нами был осуществлен поиск возможных изоформ генов *SMT* пшеницы.

Мягкая пшеница (*T. aestivum*) обладает одним из сложнейших геномов, встречаемых у растений. Аллогексаплоидный геном пшеницы (2n = 6x = 42, AABBDD) образован в ходе естественной гибридизации трех геномов. *Triticum urartu* Thum. является донором генома А. Наиболее вероятным донором генома В является *Aegilops speltoides* Tausch. Геном D ведет свое происхождение от *Ae. tauschii* Coss (рис. 28) (Gill *et al.*, 1991; Marcussen *et al.*, 2014). В состав генома *T. aestivum* входят 42 хромосомы, условно разделенные по трем субгеномам (A, B и D) и называемые гомеологичными хромосомами. Соответственно, копии одного и того же гена расположенные на различных гомеологичных хромосомах, называются гомеологичными (рис. 29). Большой размер и сложная организация генома пшеницы затрудняют как полногеномное секвенирование, так и идентификацию отдельных нуклеотидных последовательностей генов.



Рис. 28. Схема происхождения генома гексаплоидной пшеницы (Marcussen *et al.*, 2014).



Рис. 29. Гомологичные и гомеологичные хромосомы в геноме гексаплоидной пшеницы.

К настоящему моменту показано, что большинство генов мягкой пшеницы присутствуют в ее геноме в виде гомеологичных копий, ведущих свое происхождение от общего предкового гена. Работы по изучению гомеологичных генов растений проводятся не так давно. В том числе изучаются структурнофункциональные характеристики гомеологичных генов пшеницы (Fitzgerald et al., 2010; Nigro et al., 2014; Shoeva et al., 2014). Например, в хромосомах 2A, 2B и 2D обнаружены копии гена *Fd-GOGAT*, кодирующего фермент биосинтеза глутамата ферредоксин-зависимую глутамин-оксоглутарат амидотрансферазу (Nigro et al., 2014); в хромосомах 5A, 5B и 5D – копии гена *TaPFT1*, контролирующего цветение (Fitzgerald et al., 2010), и Chi, кодирующего ключевой фермент биосинтеза флавоноидов халкон-флаванонизомеразу (Shoeva et al., 2014). Кроме того, показано, что экспрессия гомеологичных генов может отличаться в различных тканях и на разных стадиях онтогенеза или при различных условиях окружающей среды. Например, ген, кодирующего ключевой фермент биосинтеза флавоноидов халкон-флаванонизомеразу – *Chi*-B1 в некоторых органах экспрессируется слабее по сравнению с Chi-A1 и Chi-D1 (Shoeva et al., 2014). Аналогичным образом, ген, кодирующий дигидрофлавонол-4-редуктазу – TaDfr-A, экспрессируется в зерне пшеницы слабее по сравнению с *TaDfr*-В и *TaDfr*-D (Himi, Noda, 2004).

В настоящей работе нами были проведены эксперименты, в ходе которых выявлены и секвенированы нуклеотидные последовательтности трех генов *TaSMT1* пшеницы. Биоинформатический анализ с помощью BLAST базы данных Международного консорциума по секвенированию генома пшеницы IWGSC (International Wheat Genome Sequencing Consortium, http://www.wheatgenome.org/) на сервере URGI (http://urgi.versailles.inra.fr) показал, что это гомеологичные гены пшеницы *TaSMT1*, расположенных на длинных плечах хромосом 5AL, 4BL и 4DL и обозначенных нами как *TaSMT1*-5A, *TaSMT1*-4B и *TaSMT1*-4D, согласно правилам обозначения гомеологичных генов пшеницы (McIntosh *et al.*, 1998). Секвенированные фрагменты соответствовали предполагаемым последовательностям из базы данных URGI. Интересно отметить, что два из них локализованы в хромосомах четвертой гомеологичной группы (B и D), а один ген

локализован в пятой гомеологичной группе (А). Локализация одного из генов на хромосоме 5А объясняется тем, что в процессе эволюции современных хромосом 4А и 5А произошла взаимная транслокация дистальных отделов длинных плеч между хромосомами 4А и 5А. Эта негомеологичная транслокация 4AL/5AL произошла еще на диплоидном уровне (2n = 2x = 14, геном AA) и также присутствует в *T. monococcum* (Devos *et al.*,1995; Ma *et al.*, 2013).

Анализ экзон-интронной структуры трех генов TaSMT1-5А/-4B/-4D показал, что гены пшеницы TaSMT1 характеризуются структурным сходством и состоят из 10-12 экзонов и 9-11 интронов (рис. 30). Проведенный нами анализ позволил выделить четыре консервативных экзона, имеющих идентичные последовательности и размеры как среди трех гомеологичных генов пшеницы, так и по сравнению с генами *SMT1* других растений. Можно полагать, что эти экзоны кодируют функционально значимые домены белка SMT1 растений. Трансляция последовательности нуклеотидов этих экзонов в последовательность аминокислот подтвердила, что данные экзоны кодируют необходимые для функциональной активности белка стерин-связывающие сайты. На 5' и 3' концах сайта сплайсинга интроны имеют консервативные пары нуклеотидов (GT ... AG), и длина интронов превышает длину кодирующей области (экзонов), что характерно для многих генов растений. Таким образом, исследуемые нами гены соответствуют структуре гомологичных генов 2 класса семейства *SMT1* высших растений (рис. 12, 30, Neelakandan *et al.*, 2009).

Сравнительный анализ кодирующих последовательностей трех генов *TaSMT1* подтвердил высокую степень сходства, которая составляет между A и B – 96,5%, A и D – 97,7%, B и D – 97,6%. Филогенетическое древо, построенное на основании анализа нуклеотидных последовательностей *TaSMT1* и последовательностей генов этого семейства других представителей, показало, что *TaSMT1* пшеницы, как и ожидалось, наиболее близки к *SMT1* злаковых, таких как эгилопс и ячмень (рис. 31).



Рис. 30. Схема структуры трех гомеологичных генов *TaSMT1* пшеницы: прямоугольниками показаны экзоны, линией – интроны, стрелками – консервативные экзоны (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/).



Рис. 31. Филогенетическое древо генов семейства *SMT1* растений: AetSMT1 – *Aegilops tauschii*, TaSMT1 – *Triticum aestivum*, HvSMT1 – *Hordeum vulgare*, BdSMT1 – *Brachypodium distachyon*, AtSMT1 – *Arabidopsis thaliana*, GmSMT1 – *Glycine max*, NtSMT1 – *Nicotiana tabacum*, OsSMT1 – *Oryza sativa*, ZmSMT1 – *Zea mays*.

Выравнивание кодирующих последовательностей выявило наличие полиморфных участков, где встречались замены и делеции нуклеотидов (см. приложение рис. 1). Возникает вопрос, к чему могут привести такие замены и делеции нуклеотидов в генах *SMT1*? Одним из предполагаемых последствий

является проявление специфичности функционирования генов. Возможны эволюционные ПУТИ структурно-функциональной различные дивергенции гомеологичных генов у полиплоидов: субфункционализация – разделение функций между копиями (ко-экспрессия генов, подавление/стимуляция транскрипции отдельных гомеологов, ткане-, органо- и стадияспецифичная экспрессия); неофункционализация – приобретение новой функции; псевдогенизация – полная утрата функции одним из гомеологов и превращение его в псевдоген (Wendel, 2000). Структурно-функциональная дивергенция гомеологичных генов является обеспечивающим преимуществом полиплоидных организмов, реализацию компенсаторных механизмов на генном уровне при изменении условий окружающей среды и, как следствие, приводящим к повышению адаптивного потенциала организма.

3.4.3. Экспрессия генов *TaSMT1* в условиях холодового стресса

Для выявления особенностей активности гомеологичных генов TaSMT1 нами был проведен анализ экспрессии этих генов в корнях и листьях проростков низкой пшеницы при действии положительной температуры. Оценку относительного уровня экспрессии генов *TaSMT1* осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени с использованием специфичных праймеров и зондов TaqMan. целевых транскриптов оценивалось относительно стабильно-Количество экспрессирующихся транскриптов референсных генов, в качестве которых были использованы гены фактора АДФ-рибозилирования (TaARF) и ингибитора РНКазы L-подобного белка (TaRLI) (Paolacci et al., 2009). Мы не обнаружили транскриптов гена *TaSMT1-4*В при использовании специфичных для этого гена праймеров. Возможно, это связано с тем, что этот ген не активен и не транскрибируется с образованием мРНК, однако этот факт требует дальнейших проверок. Образование TaSMT1 наблюдали у нестрессированных транскриптов генов растений (контрольные) как в листьях, так и в корнях. Результаты показали, что ген TaSMT1-5А интенсивнее экспрессируется в листьях (рис. 32 A), а ген *TaSMT1*-4D проявляет большую активность в корнях (рис. 32 Б), что может свидетельствовать об органоспецифичной экспрессии этих генов. Кроме того, эти гены характеризуются различной активностью в условиях холодового стресса.



Рис. 32. Относительный уровень экспрессии генов *TaSMT1*-5A (A) и *TaSMT1*-4D (**Б**) при холодовом стрессе. Уровень транскриптов контрольного варианта корней принят за единицу.
Так, экспрессия гена *TaSMT1*-5A при действии холода практически не изменялась в корнях и листьях проростков пшеницы (рис. 32 A). Напротив, активность гена *TaSMT1*-4D при действии холода и в корнях, и листьях повышалась, причем, наибольшие изменения происходили после 12 ч действия низкой положительной температуры. Активность этого гена повышалась в 4 раза корнях и в 5 раз листьях (рис. 32 Б).

Таким образом, нами выявлена дифференциальная экспрессия генов *TaSMT1*, как в различных органах проростков пшеницы (корни и листья), так и в ответ на действие низкой положительной температуры. Ген *TaSMT1*-5A проявляет, в основном, конститутивную активность, в то время как ген *TaSMT1*-4D обладает стресс-индуцибельной активностью. Дифференциальная экспрессия гомеологичных генов *TaSMT1*-5A и *TaSMT1*-4D пшеницы при действии холода может быть обусловлена наличием определенных последовательностей в структуре промоторов.

3.4.4. Клонирование и секвенирование промоторных областей генов *TaSMT1*

Транскрипционная регуляция играет важную роль в активации или подавлении экспрессии генов, и в значительной степени контролируется промоторными областями генов с помощью *цис*-элементов (Zou *et al.*, 2011). *Цис*-действующие регуляторные элементы – это короткие специфические участки ДНК длинной от 5 до 25 п.н. связывающиеся с транскриционными фаторами (Qiu *et al.*, 2003; Rani, 2007). В растительных промоторах выделяют две категории *цис*-элементов: индуцируемые фитогормонами и стресс-чувствительные. К *цис*-элементам, индуцируемым фитогормонами, относятся следующие мотивы: ABRE (АБК), GARE (гиббереллин), TGA (ауксин), TGACG motif (метилжасмонат) и ERE (этилен). К стресс-чувствительным *цис*-элементы относятся: MBS (засуха), HSE (тепловой шок), LTR (низкие температуры), TC-rich repeats (стрессы и атака патогенов), 3-AF1 связывающий сайт, ACE, GAG, TCT, GA, G-box и GT1 (свет) (Karimzadeh *et al.*, 2013). В настоящее время появляется все больше баз данных

потенциальных *цис*-элементов и транскрипционных факторов растений, такие как PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/) (Higo *et al.*, 1999), PlantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/) (Lescot *et al.*, 2002) и PlantPAN (http://PlantPAN.mbc.nctu.edu.tw) (Chang *et al.*, 2008). Эти базы данных содержат различные инструменты, позволяющие проводить анализ регуляторных последовательностей *in silico*.

Известно, что размеры промоторов эукариот могут варьировать от ста и достигать несколько тысяч нуклеотидов (Neelakandan *et al.*, 2010; Bhat *et al.*, 2012; Hernandez-Garcia, Finer, 2014). Выявление в промоторах участков, активирующихся при определенных стрессовых воздействиях и индуцирующих связывание с РНК-полимеразой и дальнейшую экспрессию гена, необходимо для понимания процессов, в которые вовлечен тот или иной белок. В связи с этим, нами были секвенированы и проанализированы промоторные области этих генов размерами от 1100 до 1600 п.н. до старт-кодона АТG (рис. 33, см. главу 2.10.2.).



Рис. 33. Электрофореграмма продуктов амплификации промоторных областей трех гомеологичных генов *TaSMT1* пшеницы (выделены овалом), полученных в результате ПЦР. Маркер молекулярного веса DNA Ladder #SM0403 (Thermo Scientific, США).

Размеры наработанных фрагментов ДНК по молекулярным массам соответствовали теоретически ожидаемым последовательностям из базы данных URGI. Как видно из рисунка 33, при использовании праймеров на промоторный участок гена *TaSMT1-5A*, нарабатывалось два продукта, дальнейший анализ этих секвенированных фрагментов показал, что нижний продукт соответствует участку TaSMT1-4B. промотора Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей промоторных областей трех гомеологичных генов TaSMT1-5А/-4В/-4D показало, что уровень сходства последовательностей этих промоторов составляет около 90% (А и В – 83%, А и D – 84%, В и D – 90%).

последовательности TaSMT1 Промоторные генов пшеницы были проанализированы на наличие потенциальных цис-элементов с использованием баз данных PLACE, PlantCARE и PlantPAN. Обнаружено, что промоторные области генов TaSMT1-5A/-4B/-4D содержат помимо консервативных сайтов (ТАТА-бокс, СААТ-бокс), также стресс-чувствительные цис-элементы, индуцируемые светом (ACE, AE, G-бокс), засухой (MBS), низкими и высокими температурами (LTR, HSE) и гормонами, такими как АБК (ABRE), гиббереллин (GARE, P-бокс), этилен (ERE), (ТСА-элемент), салициловая кислота ауксин (ТСА-элемент), метилжасмонат (TGACG-мотив). Полный список цис-элементов, характерный для промоторной области каждого гомеологичного гена TaSMT1, представлен в приложении табл. 1. На рис. 2. в приложении представлено количество общих и специфичных потенциальных *цис*-элементов в промоторных областях *TaSMT1*-5A/-4B/-4D. Наличие стресс-чувствительных мотивов, обнаруженных В промоторных областях генов *TaSMT1*, позволяет предполагать, что данный белок пшеницы регулируется многими факторами и, возможно, вовлечен в стрессовый ответ.

Известно, что регуляторные элементы ABRE, LTR, MBS, G-бокс элемент и факторы транскрипции CBF/DREB входят в состав промоторов и других генов, активность которых индуцируется действием низких положительных температур (Gilmour *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Fowler, Thomashow, 2002; Ruelland *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2012). Интересно отметить, что чувствительный к холоду *цис*-элемент

LTR содержится в промоторных областях генов *TaSMT1-4*B и *TaSMT1-4*D, и отсутствует в гене *TaSMT1-5*A. Можно полагать, что наличие в промоторной области такого элемента является одним из факторов, влияющих на активность *TaSMT1-4*D при действии низкой положительной температуры.

Нами впервые идентифицированы три гомеологичных гена *TaSMT1*, расположенные на хромосомах A, B и D гексаплоидного генома пшеницы. Несмотря на значительное сходство кодирующей области этих генов, нуклеотидные последовательности некодирующих областей генов *TaSMT1* существенно отличаются. Наличие в промоторной области специфических стрессчувствительных *цис*-элементов, наряду с другими факторами, обуславливает дифференциальную экспрессию гомеологичных генов *TaSMT1* в проростках пшеницы при стрессе.

Таким образом, в настоящей работе на биохимическом и генетическом уровне выявлены стресс-индуцированные изменения стеринового компонента растительных мембран. Результаты комплексного анализа состава стеринов и активности гена *TaSMT1*, ответственного за их биосинтез, при действии на проростки пшеницы различных абиотических стрессоров, а также наличие стрессчувствительных сайтов в промоторной области гена свидетельствуют о вовлечении стеринов в стрессовый ответ растительных клеток. Эти результаты меняют сложившееся представление о стеринах лишь как о структурных элементах мембран и способствуют пониманию важной регуляторной функции этих мембранных липидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растения обладают богатым стериновым составом, что определяет их вовлечение в разнообразные процессы в жизнедеятельности растения, в том числе ответы растений на изменение условий окружающей среды. Модуляция стеринового компонента мембран при действии стрессовых факторов влияет на проницаемость и функционирование мембран и, как следствие, определяет стратегию стрессового ответа клеток (Валитова и др., 2010; Senthil-Kumar et al., 2015). Это было подтверждено в экспериментах с использованием специфических антибиотика стерин-связывающих агентов полиенового нистатина И макроциклического олигосахарида МβCD, обладающих различными механизмами связывания стеринов (Valitova et al., 2014). В настоящей работе впервые выявлена специфика физиологических эффектов стерин-связывающих агентов В зависимости от типа их взаимодействия со стеринами. Индуцированное нистатином истощение стеринов в сочетании с образованием пор в мембранах обуславливает острую токсичность этого антибиотика, которая характеризуется значительным увеличением проницаемости мембран для ионов, накоплением АФК и индукцией аутофагии. Негативные последствия истощения стеринов при действии на проростки MβCD проявляются лишь в стрессовых условиях, в частности, при действии гипотермии.

Пониженная температура является одним из распространенных стрессовых факторов, действию которых в природе подвергается растение. Информация о роли стеринов в холодоустойчивости растений крайне ограничена и представлена, в основном, данными о количественных изменениях общего содержания стеринов, а не их молекулярных форм. Результаты наших экспериментов показали, что листья и корни проростков пшеницы проявляют различную чувствительность к действию пониженной температуры. Показано, что при низкотемпературном стрессе в корнях проростков пшеницы происходит увеличение проницаемости мембран для электролитов и снижение ИМС, накопление АФК и индукция аутофагии. В ИМС и редокс-статус листьях. напротив, не изменялись. Эти данные

свидетельствуют об органоспецифичности стрессового ответа проростков пшеницы на действие гипотермии, что ранее было продемонстрировано и для других растений (Попов и др., 2010; Los, Murata, 2004). Нами показано, что комплекс изменений, происходящих в соотношении молекулярных видов стеринов, гликолипидах и ФЛ, способствует поддержанию стабильности мембран и формированию бо́льшей устойчивости листьев, по сравнению с корнями, к действию низкой положительной температуры. Повышенное содержание 24этилстеринов в листьях может являться частью процесса адаптации для преодоления колебаний температур, в том числе посредством обеспечения антиоксидантной защиты, усиления Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и поддержания важных мембрано-связанных процессов метаболизма.

B последнее десятилетие весьма актуальным является изучение рафтообразования в растениях. Специфические липидные микродомены, или рафты, обнаружены во многих растительных объектах (Mongrand et al., 2004; Cacas et al., 2012; Zauber et al., 2014). В наших экспериментах была выявлена обратная взаимосвязь между изменениями в содержании двух рафтообразующих липидов, стеринов и ГлЦер. Эта взаимосвязь заметно проявляется в стрессовых условиях, в частности при действии низкой положительной температуры и связывании стеринов специфическими агентами. Наличие таких согласованных изменений стеринов и ГлЦер может свидетельствовать об общей функциональной активности этих рафтообразующих липидов и предполагает компенсаторный характер изменений. Однако это предположение требует дальнейшего исследования.

Таким образом, поддержание баланса между различными классами липидов является ключевым механизмом регуляции проницаемости и функционирования мембран. Нарушение этого баланса может привести не только к изменению проницаемости мембран, но и неблагоприятным физиологическим последствиям, в том числе смещению редокс-статуса и снижению устойчивости к действию стрессовых факторов.

Можно полагать, что изменения стеринового профиля при стрессе обусловлены также изменениями на генном уровне. Ключевым этапом

114

многоступенчатого процесса биосинтеза стеринов в растениях является реакция Сметилирования 24-го атома углерода стеринов, катализируемая ферментом C24стерин метилтрансферазой. Нами впервые были выявлены и секвенированы нуклеотидные последовательности трех генов *TaSMT1* пшеницы. Биоинформатический анализ показал, что эти гены являются гомеологичными и расположены на хромосомах A, B, D гексаплоидного генома *T. aestivum*. Дифференциальная экспрессия гомеологичных генов *TaSMT1*-5A и *TaSMT1*-4D пшеницы при действии холода, а также наличие выявленных нами стрессчувствительных *цис*-элементов в структуре промоторов свидетельствуют о сложности регуляции активности генов *TaSMT1* при стрессе.

Таким образом, в настоящей работе на физиолого-биохимическом и генном уровнях выявлены стресс-индуцированные изменения стеринового компонента растительных мембран. Полученные данные способствуют расшифровке регуляторных функций мембранных стеринов растений.

выводы

1. Показано, что действие стерин-связывающих агентов нистатина и метил-β-циклодекстрина на корни пшеницы приводит к уменьшению содержания стеринов и повышению уровня гликоцерамидов. Выявлена специфика физиологических эффектов этих агентов, обладающих различными механизмами связывания стеринов. Истощение стеринов в сочетании с образованием пор в мембранах обуславливает острую токсичность нистатина. Негативные последствия истощения стеринов при действии метил-β-циклодекстрина проявляются лишь в стрессовых условиях.

2. Показано, что при низкотемпературном стрессе в корнях проростков пшеницы происходит снижение стабильности мембран, накопление активных форм кислорода и индукция аутофагии. В листьях, напротив, индекс мембранной стабильности и редокс-статус не изменялись в условиях гипотермии. Эти данные свидетельствуют об органоспецифичности стрессового ответа проростков пшеницы на действие гипотермии.

3. Показано, что комплекс и динамика изменений, происходящих в соотношении молекулярных видов стеринов, гликолипидах и фосфолипидах, способствуют поддержанию стабильности мембран и формированию бо́льшей устойчивости листьев, по сравнению с корнями, к действию низкой положительной температуры.

4. Выявлены и секвенированы нуклеотидные последовательности трех гомеологичных генов *TaSMT1*, расположенные на хромосомах 5AL, 4BL и 4DL гексаплоидного генома *T. aestivum*. Эти гены характеризуются структурным сходством и состоят из двенадцати (*TaSMT1-5A*), десяти (*TaSMT1-4B*) и одиннадцати (*TaSMT1-4D*) экзонов, в число которых входят четыре консервативных экзона, что соответствует структуре гомологичных генов *SMT1* других растений.

5. Секвенированы и проанализированы последовательности промоторов генов *TaSMT1*, выявлены стресс-чувствительные *цис*-элементы, наличие которых

обуславливает дифференциальную экспрессию гомеологичных генов *TaSMT1* в проростках пшеницы при стрессе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Алексеева, В.Я. Влияние модуляторов ионной проницаемости плазмалеммы на дыхание и теплопродукцию корней пшеницы / В.Я. Алексеева, Л.Х. Гордон, Н.Л. Лосева, Г.Г. Рахимова, А.Н. Ценцевицкий // Цитология. – 2006. – Т. 48(7). – С. 569–577.

Валитова, Ю.Н. Связывание стеринов влияет на функционирование мембран и состав сфинголипидов в корнях пшеницы / Ю.Н. Валитова, Е.Р. Котлова, А.В. Новиков, А.Л. Шаварда, К.А. Артеменко, Р.А. Зубарев, Ф.В. Минибаева // Биохимия. – 2010. – Т. 75(5). – С. 644 – 653.

3. Гордон, Л.Х. Функциональная характеристика адаптивного старения отсеченных корней пшеницы / Л.Х. Гордон // Физиология и биохимия культурных растений. – 1992. – Т. 24(2). – С. 24–29.

4. Гордон, Л.Х. Энергетический обмен клеток корней пшеницы при модификации ионной проницаемости плазмалеммы каналоформером нистатином / Л.Х. Гордон, Ю.Н. Валитова, Т.И. Огородникова, Д.Ф. Рахматуллина, А.Ю. Алябьев, Н.Л. Лосева, А.Н. Ценцевицкий, Н.Ф. Рубан // Цитология. – 2005. – Т. 7(12). – С. 1088–1094.

5. Дмитриева, С.А. Индуцированное старение и гибель клеток при окислительном стрессе в корнях пшеницы / С.А. Дмитриева, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Доклады Академии Наук. – 2007. – Т. 414. – С. 133–136.

6. Дмитриева, С.А. Эффекты окислительного стресса на ультраструктуру и функциональную активность растительных митохондрий *in vivo*/ С.А. Дмитриева, А.А. Пономарева, В.В. Рябовол, Ф.В. Минибаева // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29. – С. 267–275.

7. **Зорина, А.А.** Участие серин-треониновых протеинкиназ в ответах на холодовой стресс у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803: функциональная характеристика SpkE / А.А. Зорина, В.С. Бедбенов, Г.В. Новикова, В.Б. Паничкин, Д.А. Лось // Молекулярная биология – 2014. – Т. 48(3). – С. 452–462.

8. **Иванова, А.Б.** Роль структурных липидов в регуляции ионного транспорта растительных клеток / А.Б. Иванова, Л.Х. Гордон, А.В. Лыгин // Цитология. – 1997. – Т. 39(4/5). – С. 285–293.

9. Крысанова, Н.В. Метил-β-циклодекстрин, снижая содержание мембранного холестерола, влияет на процесс транспорта глутамата в нервных окончаниях головного мозга / Н.В. Крысанова, Р.В. Сивко, О.А. Крупко, Т.А. Борисова // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т. 79(3). – С. 29–37.

10. Лось, Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений / Д.А. Лось // Вестн. РАН. – 2005. – Т. 75. – С. 338–345.

11. Лыгин, А.В. Изменение содержания стеринов и жирнокислотного состава фосфолипидов в процессе активного старения отсеченных корней пшеницы / А.В. Лыгин, Л.Х. Гордон, В.Я. Алексеева, Т.К. Балашова // Физиол. биохим. раст. – 1990. – Т. 22(6). – С. 581–586.

12. Макаренко, С.П. Влияние низких температур на жирнокислотный состав контрастных по холодоустойчивости видов злаков / С.П. Макаренко, Л.В. Дударева, А.И. Катышев, Т.А. Коненкина, А.В. Назарова, Е.Г. Рудиковская, Н.А. Соколова, В.В. Черникова, Ю.М. Константинов // Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27(6). – С. 482–488.

13. **Маниатис, Т.** Гель-электрофорез / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук // Молекулярное клонирование. – 1984. – С. 157–167.

14. **Медведев, С.С.** Ионофорные функции фосфатидной кислоты в растительной клетке / С.С. Медведев, О.В. Танкелюн, А.Ю. Батов, О.В. Воронина, Я. Мартинец, И. Махачкова // Физиология растений. – 2006. – Т.53(1). – С. 45–53.

15. **Минибаева, Ф.В.** Роль супероксида в формировании неспецифического адаптационного синдрома корневых клеток / Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон, Д.Ф. Рахматуллина, Н.Н. Вылегжанина // Доклады Академии Наук. – 1997. – Т. 355. – С. 554–556.

16. **Новикова, Г.В.** Белковые сенсоры и передатчики холодового и гиперосмотического стресса у цианобактерий и растений / Г.В. Новикова, И.Е. Мошков, Д.А. Лось // Молекулярная биология – 2007. – Т. 41. – С. 478–490.

17. Попов, В.Н. Перекисное окисление липидов при низкотемпературной адаптации листьев и корней теплолюбивых растений табака /В.Н. Попов, О.В. Антипина, Т.И. Трунова // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – С. 153–156.

18. **Рябовол, В.В.** Характеристика морфологических, биохимических и молекулярных признаков аутофагии в корнях *Triticum aestivum* при стрессе: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: 03.01.05 «Физиология и биохимия растений» / Рябовол Виктория Вадимовна. – Казань, 2014. – 24 с.

19. Рябовол, В.В. Аутофагические белки ATG4 и ATG8 пшеницы: особенности структуры и роль при стрессе / В.В. Рябовол, Ф.В. Минибаева // Доклады Академии Наук. – 2014. – Т. 458(6). – С. 718–720.

20. Рыжкина, И.С. Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ / И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева, А.И. Коновалов // Доклады Академии Наук. – 2009. – Т.428(4). – С. 487–491.

21. Смирнов, Л.П. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях эктотермных организмов к абиотическим и биотическим факторам среды / Л.П. Смирнов, В.В. Богдан – М.: 2007. – 182 с.

Сулкарнаева, А.Г. Стресс-индуцированные изменения мембранных стеринов в корнях пшеницы / А.Г. Сулкарнаева, Ю.Н. Валитова, Ф.К. Мухитова, Ф.В. Минибаева // Доклады Академии Наук. – 2014. – Т. 455(2). – С. 229–231.

23. Часов, А.В. Активация экстраклеточной пероксидазы корней пшеницы при действии ксенобиотиков / А.В. Часов, В.Я. Алексеева, О.П. Колесников, Ф.В. Минибаева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46(4). – С. 472–478.

24. **Чиркова, Т.В.** Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям / Т.В. Чиркова // Соросовский образовательный журнал. – 1997(9). – С.12–17.

25. **Чиркова, Т.В.** Физиологические основы устойчивости растений / Чиркова Т.В. – СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2002. – 244 с.

26. Шакирова, Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция / Ф.М. Шакирова. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.

27. Akihisa, T. Naturally occurring sterols and related compounds from plants, in Physiology and Biochemistry of Sterols / T. Akihisa, W.C.M.C. Kokke, T. Tamura – Ed.: G.W. Patterson, W.D. Nes, American Oil Chemists' Society, 1991. – 172–228 p.

28. Andreoli, T.E. The interaction of polyene antibiotics with thin lipid membranes / T.E. Andreoli, M. Monahan // J Gen Physiol. – 1968. – V. 52(2). – P. 300–325.

29. Arnqvist, L. Overexpression of CYP710A1 and CYP710A4 in transgenic Arabidopsis plants increases the level of stigmasterol at the expense of sitosterol / L. Arnqvist, M. Persson, L. Jonsson, P.C. Dutta, F. Sitbon // Planta. – 2008. – V. 227. – P. 309–317.

30. **Babiychuk, E.** Allelic mutant series reveal distinct functions for Arabidopsis cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis / E. Babiychuk, P. Bouvier-Navé, V. Compagnon, M. Suzuki, T. Muranaka, M. Van Montagu, S. Kushnir, H. Schaller // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2008. – V. 105(8). – P. 3163–3168.

31. **Badea, C.** The effect of low temperature on metabolism of membrane lipids in plants and associated gene expression / C. Badea, S.K. Basu // Plant Omics Journal – 2009. – V. 2(2). – P. 78–84.

32. **Bach, T.J.** Inhibitioin by mevinolin of plant growth, sterol formational pigment accumulation / T.J. Bach, H.K. Lichtenthaler // Physiol Plant. – 1983. – V. 59. – P. 50–60.

33. **Bach, T.J.** Cloning of cDNAs or genes encoding enzymes of sterol biosynthesis from plants and other eukaryotes: heterologous expression and complementation analysis of mutations for functional characterization / T.J. Bach, P. Benveniste // Prog Lipid Res. – 1997. – V. 36(2-3). – P. 197–226.

34. **Bajguz, A.** The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants / A. Bajguz, A. Tretyn // Phytochemistry. – 2003. – V. 62(7). – P. 1027–1046.

35. **Baker, C.J.** An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue / C.J. Baker, N.M. Mock // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1994. – V. 39. – P. 7–12.

36. **Barkla, B.J.** Plasma membrane and abiotic stress / B.J. Barkla, O. Pantoja // The plant plasma membrane, Plant cell monographs, vol. 19. Eds.: A.S. Murphy, B. Schulz, W. Peer, Germany, Heidelberg: Springer, 2011, 457–470 p.

37. **Beck, J.G.** Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks / J.G. Beck, D. Mathieu, C. Loudet, S. Buchoux, E.J. Dufourc // FASEB J. – 2007. – V. 21. – P. 1714–1723.

38. **Beh, C.T.** Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologues / C.T. Beh, L. Cool, J. Phillips, J. Rine // Genetics. – 2001. – V. 157. – P. 1117–1140.

39. Benning, C. Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation / C. Benning, Z.H. Huang, D.A. Gage // Arch Biochem Biophys. – 1995. – V. 317(1). – P. 103–111.

40. Benveniste, P. Sterol biosynthesis / P. Benveniste // Annu Rev Plant Physiol.
- 1986. - V. 37. - P. 275–308.

41. **Benveniste, P.** Target sites of sterol biosynthesis inhibitors in plants / P. Benveniste, A. Rahier // In target sites of fungicidal action. Ed.: W.D. Köller, London: CRC Press, 1992, 207–226 p.

42. **Benveniste, P.** Biosynthesis and accumulation of sterols / P. Benveniste // Annu Rev Plant Biol. – 2004. – V. 55. – P. 429–457.

43. **Betts, H.** Plant cell polarity: the ins-and-outs of sterol transport / H. Betts, I. Moore // Curr Biol. – 2003. – V. 13(19). – P. R781–R783.

44. **Bhat, R.A.** Lipid rafts in plants / R.A. Bhat, R. Panstruga // Planta. – 2005. – V. 223. – P. 5–19.

45. **Bhat, W.W.** Molecular cloning, bacterial expression and promoter analysis of squalene synthase from *Withania somnifera* (L.) Dunal / W.W. Bhat, S.K. Lattoo, S. Razdan, N. Dhar, S. Rana, R.S. Dhar, S. Khan, R.A. Vishwakarma // Gene. – 2012. – V. 499. – P. 25–36.

46. **Bishop, G.J.** The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis / G.J. Bishop, T. Nomura, T. Yokota, K. Harrison, T. Noguchi, S. Fujioka, S. Takatsuto, J.D. Jones, Y. Kamiya // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1999. – V. 96(4). – P. 1761–1766.

47. **Bishopa, G.J.** Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling / G.J. Bishopa, C. Koncz // Plant Cell. – 2002. – P. S97–S110.

48. Björkhem, I. Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? / I.
Björkhem, U. Diczfalusy // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2002. – V. 22(5). – P. 734–742.

49. Björkhem, I. Oxysterols in human circulation: which role do they have? / I.
Björkhem, S. Meaney, U. Diczfalusy // Curr Opin Lipidol. – 2002. – V. 13(3). – P. 247–253.

50. **Bloch, K.E.** Sterol structure and membrane function / K.E. Bloch // CRC Crit Rev Biochem. – 1983. – V. 14(1). – P. 47–82.

51. Bohn, M. Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings differing in frost resistance / M. Bohn, S. Lüthje, P. Sperling, E. Heinz, K. Dörffling // J Plant Physiol. – 2007. – V. 164(2). – P. 146–156.

52. **Boissonneault, G.A.** Oxysterols, cholesterol biosynthesis, and vascular endothelial cell monolayer barrier function / G.A. Boissonneault, B. Hennig, C.-M. Ouyang // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1991. – V. 196. – P. 338–343.

53. Borner, G.H. Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis.
Evidence for plasma membrane lipid rafts / G.H. Borner, D.J. Sherrier, T. Weimar, L.V.
Michaelson, N.D. Hawkins, A. Macaskill, J.A. Napier, M.H. Beale, K.S. Lilley, P.
Dupree // Plant Physiol. – 2005. – V. 137(1). – P. 104–116.

54. Boutté, Y. Cellular processes relying on sterol function in plants / Y. Boutté,
M. Grebe // Curr Opin Plant Biol. – 2009. – V. 12(6). – P. 705–713.

55. Bouvier-Navé, P. Identification of cDNAs encoding sterol methyltransferases involved in the second methylation step of plant sterol biosynthesis / P. Bouvier-Navé, T. Husselstein, T. Desprez, P. Benveniste // Eur J Biochem. – 1997. – V. 246. – P. 518–529.

56. Bouvier-Navé, P. Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and the second methylation steps of plant sterol biosynthesis / P. Bouvier-Navé, T. Husselstein, P. Benveniste // Eur J Biochem. – 1998. – V. 256. – P. 88–96.

57. **Bretscher, M.S.** Cholesterol and the Golgi apparatus / M.S. Bretscher, S. Munro // Science. – 1993. – V. 261. – P. 1280–1281.

58. **Brown, D.A.** Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts / D.A. Brown, E. London. // J Biol Chem. – 2000. – V. 275(23). – P. 17221–17224.

59. **Buseman, C.M.** Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in Arabidopsis leaves / C.M. Buseman, P.Tamura, A.A. Sparks, E.J. Baughman, S. Maatta, J. Zhao, M.R. Roth, S.W. Esch, J. Shah, T.D. Williams, R. Welti // Plant Physiol. – 2006. – V. 14(1). – P. 28–39.

60. **Byun, Y.J.** Comparative analysis of gene expression under cold acclimation, deacclimation and reacclimation in Arabidopsis / Y.J. Byun, M.Y. Koo, H.J. Joo, Y.M. Ha-Lee, D.H. Lee // Physiol Plant. – 2014. – V. 152(2). – P. 256–274.

61. **Cacas, J.L.** Lipids of plant membrane rafts / J.L. Cacas, F. Furt, M. Le Guédard, J.M. Schmitter, C. Buré, P. Gerbeau-Pissot, P. Moreau, J.J. Bessoule, F. Simon-Plas, S. Mongrand // Prog Lipid Res. – 2012. – V. 51(3). – P. 272–299.

62. **Cacas, J.L.** Biochemical survey of the polar head of plant glycosylinositolphosphoceramides unravels broad diversity / J.L. Cacas, C. Buré, F. Furt, J.P. Maalouf, A. Badoc, S. Cluzet, J.M. Schmitter, E. Antajan, S. Mongrand // Phytochemistry. – 2013. – V. 96. – P. 191–200.

63. **Caelles, C.** Isolation and structural characterization of a cDNA encoding Arabidopsis thaliana 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase / C. Caelles, A. Ferrer, L. Balcalls, E.G. Hegardt, A. Boronat // Plant Mol. Biol. – 1989. – V. 13. – P. 627–634.

64. **Campos, P.S.** Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of coffea sp. plants / P.S. Campos, V. Quartin, J.C. Ramalho, M.A. Nunes // J Plant Physiol. – 2003. – V. 160. – P. 283–292.

65. **Carland, F.** The identification of CVP1 reveals a role for sterols in vascular patterning / F.M. Carland, S. Fujioka, S. Takatsuto, S. Yoshida, T. Nelson // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – P. 2045–2058.

66. **Carland, F.** The sterol methyltransferases SMT1, SMT2, and SMT3 influence Arabidopsis development through nonbrassinosteroid products / F. Carland, S. Fujioka, T. Nelson // Plant Physiol. – 2010. – V. 153(2). – P. 741–756.

67. **Chang, W.C.** PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial *cis*-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups / W.C. Chang, T.Y. Lee, H.D. Huang, H.Y. Huang, R.L. Pan // BMC Genomics. – 2008. – V. 9. – P. 561.

68. Cheng, J. Cholesterol depletion induces autophagy / J. Cheng, Y. Ohsaki,
K. Tauchi-Sato, A. Fujita, T. Fujimoto // Biochem Biophys Res Commun. – 2006. – V.
351. – P. 246–252.

69. **Chinnusamy, V.** Cold stress regulation of gene expression in plants / V. Chinnusamy, J. Zhu, J.-K. Zhu // Trends Plant Sci. – 2007. – V. 12(10). – P. 444–451.

 Clouse, S. BRASSINOSTEROIDS: essential regulators of plant growth and development / S .Clouse, J. Sasse // Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. – 1998. – V.
 49. – P. 427–451.

71. Clouse, S.D. Plant development: A role for sterols in embryogenesis / S.D.
 Clouse // Curr Biol. – 2000. – V. 10. – P. R601–R604.

72. **Clouse, S.** Arabidopsis mutants reveal multiple roles for sterols in plant development / Plant Cell. – 2002. – V. 14(9). – P. 1995–2000.

73. Clouse, S.D. Brassinosteroids / S.D. Clouse // Arabidopsis Book. – 2011. –P. 9:e0151.

74. Cosio, C. Specific functions of individual class III peroxidase genes / C.
Cosio, C. Dunand // J Exp Bot. - 2009. - V. 60(2). - P. 391-408.

75. **Coutinho, A.** Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation / A. Coutinho, L. Silva, A. Fedorov, M. Prieto // Biophys J. – 2004. – V. 87. – P. 3264–3276.

76. **Daly, G.** Characterization of some oxidation products of β -sitosterol / G.G. Daly, E.T. Finocchiaro, T. Richardson // J Agric Food Chem. – 1983. – V. 81. – P. 46–50.

77. Devos, K.M. Structural evolution of wheat chromosomes 4A, 5A, and 7B and its impact on recombination / K.M. Devos, J. Dubcovsky, J. Dvořák, C.N. Chinoy, M.D. Gale // Theor Appl Genet. – 1995. –V. 91. – P. 282–288.

78. **Diener, A.C.** STEROL METHYLTRANSFERASE 1 controls the level of cholesterol in plants / A.C. Diener, H. Li, W.X. Zou, W.J. Whoriskey, W.D. Nes, G.R. Fink // Plant Cell. – 2000. – V. 12. – P. 853–870.

79. Domagalska, M.A. Attenuation of brassinosteroid signaling enhances FLC expression and delays flowering / M.A. Domagalska, F.M. Schomburg, R.M. Amasino, R.D. Vierstra, F. Nagy, S.J. Davis // Development. – 2007. – V. 134. – P. 2841–2850.

80. Dufourc, E.J. The role of phytosterols in plant adaptation to temperature /
E.J. Dufourc // Plant Signal Behav. - 2008. - V. 3(2). - P. 133–134.

81. Dulta, P.C. Lipid bodies in plants / P.C. Dulta // Plant Sci. – 1991. –V. 78.
– P. 259–267.

82. **Dwyer, D.J.** Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance / D.J. Dwyer, M.A. Kohanski, J.J. Collins // Curr Opin Microbiol. – 2009. – V. 12(5). – P. 482–489.

83. Edidin, M. The state of lipid rafts: From model membranes to cells / M.
Edidin // Annu Rev Biophys Biomol Struct. – 2003. – V. 32. – P. 257–283.

84. **Fairn, G.D.** Identification and assessment of the role of a nominal phospholipid binding region of ORP1S (oxysterol-binding-protein-related protein 1 short) in the regulation of vesicular transport / G.D. Fairn, C.R. McMaster // Biochem J. -2005. - V.387(Pt 3). - P.889-896.

85. **Fairn, G.D.** Emerging roles of the oxysterol-binding protein family in metabolism, transport, and signaling / G.D. Fairn, C.R. McMaster // Cell Mol Life Sci. – 2008. – V. 65(2). – P. 228–236.

86. Falk, J. NrCAM coupling to the cytoskeleton depends on multiple protein domains and partitioning into lipid rafts / J. Falk, O. Thoumine, C. Dequidt, D. Choquet, C. Faivre-Sarrailh // Mol Biol Cell. – 2004. – V. 15. – P. 4695–4709.

87. Farooq, S. The use of cell membrane stability (CMS) technique to screen for salt tolerant wheat varieties / S. Farooq, F. Azam // J Plant Physiol. – 2006. – V. 163. – P. 629–637.

88. Ferderbar, S. Cholesterol oxides as biomarkers of oxidative stress in type 1 and type 2 diabetes mellitus / S. Ferderbar, E.C. Pereira, E. Apolinário, M.C. Bertolami, A. Faludi, O. Monte, L.E. Calliari, J.E. Sales, A.R. Gagliardi, H.T. Xavier, D.S. Abdalla // Diabetes Metab Res Rev. – 2007. – V. 23(1). – P. 35–42.

89. **Fersht, A.** Structure and Mechanism in Protein: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. Science / A. Fersht – W.H. Freeman and Co., New York, 1999. – 20–30 p.

90. **Finkelstein, A.** Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B / A. Finkelstein, R. Holz // Membranes. -1973. - V. 2. - P. 377-408.

91. Fitzgerald, T.L. A high-throughput method for the detection of homologous gene deletions in hexaploid wheat / T.L. Fitzgerald, K. Kazan, Z. Li, M.K. Morell, J.M. Manners // BMC Plant Biol. – 2010. – V. 10:264.

92. Foster, L.J. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors / L.J. Foster, C. de Hoog, M. Mann // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – V. 100(10). – P. 5813–5818.

93. **Fowler, S.** Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway / S. Fowler, M.F. Thomashow // Plant Cell. – 2002. – V. 14(8). – P. 1675–1690.

94. Freundt, C.E. Photoconversion of Lysotracker Red to a green fluorescent molecule / C.E. Freundt, M. Czapiga, M.J. Lenardo // Cell Research. – 2007. – V. 17. – P. 956–958.

95. **Frye, C.A.** Steroids, reproductive endocrine function, and affect / C.A. Frye // Minerva Ginecol. – 2009. – V. 61(6). – P. 541–562.

96. **Furt, F.** Plant lipid rafts: fluctuat nec mergitur / F. Furt, B. Lefebvre, J. Cullimore, J.J. Bessoule, S. Mongrand // Plant Signal Behav. – 2007. – V. 2(6). – P. 508–511.

97. **Furt, F.** Lipids of the Plant Plasma Membrane / F. Furt, F. Simon-Plas, S. Mongrand // The plant plasma membrane, Plant cell monographs, vol. 19. Eds: A.S. Murphy, B. Schulz, W. Peer, Germany, Heidelberg: Springer, 2011, 3– 30 p.

98. Gaber, R.F. The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol / R.F. Gaber, D.M. Copple, B.K. Kennedy, M. Vidal, M. Bard // Mol Cell Biol. – 1989. – V. 9(8). – P. 3447–3456.

99. Garcia, A. Rafts: a simple way to control apoptosis by subcellular redistribution / A. Garcia, X. Cayla, A. Fleischer, J. Guergnon, F. Alvarez-Franco Cañas, M.P. Rebollo, F. Roncal, A. Rebollo // Biochimie. – 2003. – V. 85. – P. 727–731.

100. **Gay, C.** A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric xylenol orange hydroperoxide assay / C. Gay, J.M. Gebicki // Anal Biochem. – 2000. – V. 284. – P. 217–220.

101. **Gill, B.S.** Standard karyotype and system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*) / B.S. Gill, B. Friebe, T.R. Endo // Genome. – 1991. – V. 34. – P. 830–839.

102. **Gilmour, S.J.** Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression / S.J. Gilmour, D.G. Zarka, E.J. Stockinger, M.P. Salazar, J.M. Houghton, M.F. Thomashow // Plant J. – 1998. – V. 16(4). – P. 433–442.

103. **Ginzberg, I.** Potato steroidal glycoalkaloids: biosynthesis and genetic manipulation / I. Ginzberg, J.G. Tokuhisa, R.E. Veilleux // Potato Research. – 2009. – V. 52. – P. 1–15.

104. Govindan, M. Distribution of cholesterol in Caribbean marine algae / M.
Govindan, J.D. Hodge, K.A. Brown, M. Nuñez-Smith // Steroids. – 1993. – V. 58(4). –
P. 178–180.

105. **Grandmougin-Ferjani, A.** Sterol modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids / A. Grandmougin-Ferjani, I. Schuler-Muller, M.A. Hartmann // Plant Physiol. – 1997. – V. 113. – P. 163–174.

106. **Grebenok, R.J.** Characterization of *Zea mays* endosperm C-24 sterol methyltransferase: one of two types of sterol methyltransferase in higher plants / R.J. Grebenok, D.W. Galbraith, D.D. Penna // Plant Mol Biol. – 1997. – V. 34(6). – P. 891–896.

107. **Griebel, T.** A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plantpathogen interactions / T. Griebel, J. Zeier // Plant J. – 2010. – V. 63(2). – P. 254–268.

108. **Grille, S.** The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals / S. Grille, A. Zaslawski, S. Thiele, J. Plat, D. Warnecke // Prog Lipid Res. – 2010. – V. 49(3). – P. 262–288.

109. **Grove, M.D.** Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen / M.D. Grove, G.F. Spencer, W.K. Rohwedder, N. Mandava, J.F. Worley, J.D.W. Jr., G.L. Steffens, J.L. Flippen-Anderson, J. Carter Cook // Nature. – 1979. – V. 281. – P. 216–217.

110. **Guan, X.L.** Functional interactions between sphingolipids and sterols in biological membranes regulating cell physiology / X.L. Guan, C.M. Souza, H. Pichler, G. Dewhurst, O. Schaad, K. Kajiwara, H. Wakabayashi, T. Ivanova, G.A. Castillon, M. Piccolis, F. Abe, R. Loewith, K. Funato, M.R. Wenk, H. Riezman // Mol Biol Cell. – 2009. – V. 20(7). – P. 2083–2095.

111. **Gudesblat, G.E.** Plants grow on brassinosteroids / G.E. Gudesblat, E. Russinova // Curr Opin Plant Biol. – 2011. – V. 14(5). – P. 530–537.

112. Guo, D.A. Developmental regulation of sterol biosynthesis in *Zea mays /*D.A. Guo, M. Venkatramesh, W.D. Nes // Lipids. – 1995. – V. 30. – P. 203–219.

113. Hannich, J.T. Distribution and functions of sterols and sphingolipids / J.T.
Hannich, K. Umebayashi, H. Riezman // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2011. – V.
3(5). – P. 1–14.

114. **Harder, T.** Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains / T. Harder, K. Simons // Curr Opin Cell Biol. – 1997. – V. 9(4). – P. 534–542.

115. **Hartmann, M.A.** Plant membrane sterols: isolation, identification and biosynthesis / M.A. Hartmann, P. Benveniste // Methods Enzymol. – 1987. – V. 148. – P. 632–650.

116. Hartmann, M.A. Plant sterols and the membrane environment / M.A. Hartmann // Trends Plant Sci. -1998. - V. - 3(5). - P. 170-175.

117. **Hassanein, R.A.** Stigmasterol treatment increases salt stress tolerance of faba bean plants by enhancing antioxidant systems / R.A. Hassanein, H.A. Hashem, R.R. Khalil // Plant Omics J. – 2012. – V. 5(5). – P. 476–485.

118. **Hase, Y.** Ectopic endoreduplication caused by sterol alteration results in serrated petals in Arabidopsis / Y. Hase, S. Fujioka, S. Yoshida, G. Sun, M. Umeda, A. Tanaka // J Exp Bot. – 2005. – V. 56. – P. 1263–1268.

119. **Haubrich, B.A.** Characterization, mutagenesis and mechanistic analysis of an ancient algal sterol C24-methyltransferase: Implications for understanding sterol evolution in the green lineage / B.A. Haubrich, E.K. Collins, A.L. Howard, Q. Wang, W.J. Snell, M.B. Miller, C.D. Thomas, S.K. Pleasant, W.D. Nes // Phytochemistry. – 2015. – V. 113. – P. 64–72.

120. **Hayward, A.P.** What can plant autophagy do for an innate immune response? / A.P. Hayward, S.P. Dinesh-Kumar // Annu Rev Phytopathol. – 2010. – V. 49. – P. 4.1–4.20.

121. He, J.X. Sterols regulate development and gene expression in Arabidopsis /
J.X. He, S. Fujioka, T.C. Li, S.G. Kang, H. Seto, S. Takatsuto, S. Yoshida, J.C. Jang //
Plant Physiol. – 2003. – V. 131. – P. 1258–1269.

122. **Hemmerlin, A.** A review of tobacco BY-2 cells as an excellent system to study the synthesis and function of sterols and other isoprenoids / A. Hemmerlin, E. Gerber, J.F. Feldtrauer, L. Wentzinger, M.A. Hartmann, D. Tritsch, .F.Hoeffler, M. Rohmer, T.J. Bach // Lipids. – 2004. – V. 39. – P. 723–735.

123. **Hernandez-Garcia, C.M.** Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements / C.M. Hernandez-Garcia, J.J. Finer // Plant Sci. – 2014. – V. 217, 218. – P. 109–119.

124. Higo, K. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database / K.
Higo, Y. Ugawa, M. Iwamoto, T. Korenaga // Nucleic Acids Res. – 1999. – V. 27. – P.
297–300.

125. **Himi, E.** Isolation and location of three homoeologous dihydroflavonol-4-reductase (DFR) genes of wheat and their tissue-dependent expression / E. Himi, K. Noda // J Exp Bot. -2004. - V.55(396). - P.365-375.

126. **Hobbs, D.H.** Changes in lipid composition during floral development of *Brassica campestris* / D.H. Hobbs, J.H. Hume, C.E. Rolph, D.T. Cooke // Phytochemistry. – 1996. – V. 42. – P. 335–339.

127. **Hodzic, A.** Differential modulation of membrane structure and fluctuations by plant sterols and cholesterol / A. Hodzic, M. Rappolt, H. Amenitsch, P. Laggner, G. Pabst // Biophys J. – 2008. – V. 94(10). – P. 3935–3944.

128. **Holmberg, N.** Sterol C-24 methyltransferase type 1 controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed / N. Holmberg, M. Harker, C.L. Gibbard, A.D. Wallace, J.C. Clayton, A.D. Wallace, J.C. Clayton, S. Rawlins, A. Hellyer, R. Safford // Plant Physiol. – 2002. – V. 130. – P. 303–311.

129. **Holmberg, N.** Co-expression of N-terminal truncated 3-hydroxy-3methylglutaryl CoA reductase and C24-sterol methyltransferase type 1 in transgenic tobacco enhances carbon flux towards end-product sterols / N. Holmberg, M. Harker, A.D. Wallace, J.C. Clayton, C.L. Gibbard, R. Safford // Plant J. – 2003. – V. 36. – P. 12– 20.

130. **Hong, Z.** A rice brassinosteroid-deficient mutant, ebisu dwarf (d2), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450 / Z. Hong, M. Ueguchi-

Tanaka, K. Umemura, S. Uozu, S. Fujioka, S. Takatsuto, S. Yoshida, M. Ashikari, H. Kitano, M. Matsuoka // Plant Cell. – 2003. – V. 15(12). – P. 2900–2910.

131. **Hung, S.H.** Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants / S.H. Hung, C.W. Yu, C.H. Lin // Bot Bull Acad Sin. – 2005. – V. 46. – P. 1–10.

132. **Ikekawa, N.** Reminiscences of research on the chemistry and biology of natural sterols in insects, plants and humans / N. Ikekawa, Y. Fujimoto, M. Ishiguro // Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. – 2013. – V. 89(8). – P. 349–369.

133. **Ilangumaran, S.** Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane / S. Ilangumaran, D.C. Hoessli // Biochem J. – 1998. – V. 335. – P. 433–440.

134. **Im, Y.J.** Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins / Y.J. Im, S. Raychaudhuri, W.A. Prinz, J.H. Hurley // Nature. – 2005. – V. 437. – P. 154–158.

135. **Iuliano, L.** Measurement of oxysterols and alpha-tocopherol in plasma and tissue samples as indices of oxidant stress status / L. Iuliano, F. Micheletta, S. Natoli, S. Ginanni Corradini, M. Iappelli, W. Elisei, L. Giovannelli, F. Violi, U. Diczfalusy // Anal Biochem. –2003. – V. 312(2). – P. 217–223.

136. Jacobson, K. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics /
K. Jacobson, O.G. Mouritsen, R.G. Anderson // Nat Cell Biol. – 2007. – V. 9(1). – P. 7–
14.

137. **Jager, C.E.** Characterization of two brassinosteroid C-6 oxidase genes in pea / C.E. Jager, G.M. Symons, T. Nomura, Y. Yamada, J.J. Smith, S. Yamaguchi, Y. Kamiya, J.L. Weller, T. Yokota, J.B. Reid // Plant Physiol. – 2007. – V. 143(4). – P. 1894–904.

138. **Jang, J.C.** A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the fackel mutants of *Arabidopsis thaliana* / J.C. Jang // Genes Dev. – 2000. – V. 14(12). – P. 1485–1497.

139. Janssen, G.G. Structural requirements for transformation of substrates by the S-adenosyl-L-methionine:delta 24(25)-sterol methyltransferase. Inhibition by analogs

of the transition state coordinate / G.G. Janssen, W.D. Nes // J Biol Chem. – 1992. – V. 267(36). – P. 25856–25863.

140. Jaworski, C.J. A family of 12 human genes containing oxysterol-binding domains / C.J. Jaworski, E. Moreira, A. Li, R. Lee, I.R. Rodriguez // Genomics. – 2001.
– V. 78(3). – P. 185–196.

141. Jayasimha, P. Engineering pathway enzymes to understand the function and evolution of sterol structure and activity / P. Jayasimha, C.B. Bowman, J.M. Pedroza, W.D. Nes // Rec Adv Phytochem. – 2006. – V. 40. – P. 211–251.

142. **Kagan, R.M.** Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse Sadenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes / R.M. Kagan, S. Clarke // Arch Biochem Biophys. – 1994. – V. 310(2). – P. 417–427.

143. **Kaneshiro, E.S.** Sterols of *Saccharomyces cerevisiae* erg6 knockout mutant expressing the *Pneumocystis carinii* S-adenosylmethionine: sterol C-24 methyltransferase / E.S. Kaneshiro, L.Q. Johnston, S.W. Nkinin, B.I. Romero, J.L. Giner // J Eukaryot Microbiol. – 2015. – V. 62(3). – P. 298–306.

144. **Karimzadeh, M.** Study of 5'UTR's cis-elements region of some Plants'P5CS gene / M. Karimzadeh, G. Nematzadeh, S.H. Hashemi // Intl J Agri Crop Sci. – 2013. – V. 6(11). – P. 623–626.

145. **Kates, M.** Techniques of lipidology, isolation, analysis and identification of lipids / M. Kates, North-Holland Pub. Co., American Elsevier in Amsterdam, New York, 1972.

146. **Kaushik, S.** Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy / S. Kaushik, A. Massey, A. Cuervo // EMBO J. – 2006. – V. 25(17). – P. 3921–3933.

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

148. **Khan, M.S.** Relative abundance of Delta(5)-sterols in plasma membrane lipids of root-tip cells correlates with aluminum tolerance of rice / M.S. Khan, K. Tawaraya, H. Sekimoto, H. Koyama, Y. Kobayashi, T. Murayama, M. Chuba, M.

Kambayashi, Y. Shiono, M. Uemura, S. Ishikawa, T. Wagatsuma // Physiol Plant. – 2009. – V. 135(1). – P. 73–83.

149. **Khripach, V.** Twenty years of Brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century / V. Khripach, V. Zhabinskii, A. De Groot // Ann Bot. – 2000. – V. 86. – P. 441–447.

150. **Kierszniowska, S.** Definition of Arabidopsis sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-beta-cyclodextrin and quantitative proteomics / S. Kierszniowska, B. Seiwert, W.X. Schulze // Mol Cell Proteomics. – 2009. – V. 8(4). – P. 612–623.

151. **Kim, B.** Postembryonic seedling lethality in the sterol-deficient Arabidopsis cyp51A2 mutant is partially mediated by the composite action of ethylene and reactive oxygen species / B. Kim, H. Lee, C.J. Oh, H.Y. Lee, H.L. Eum, H.S. Kim, Y.P. Hong, Y. Lee, S. Choe, C.S. An, S.B. Choi // Plant Physiol. – 2010. – V. 152. – P. 192–205.

152. **Kinoshita, T.** Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1 / T. Kinoshita, A. Caño-Delgado, H. Seto, S. Hiranuma, S. Fujioka, S. Yoshida, J. Chory // Nature. – 2005. – V. 433(7022). – P. 167–171.

153. **Kirisako, T.** Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast / T. Kirisako, M. Baba, N. Ishihara, K. Miyazawa, M. Ohsumi, T. Yoshimori, T. Noda, Y Ohsumi // J Cell Biol. – 1999. – V. 147. – P. 435–446.

154. **Klahre, U.** The Arabidopsis DIMINUTO/DWARF1 gene encodes a protein involved in steroid synthesis / U. Klahre, T. Noguchi, S. Fujioka, S. Takatsuto, T. Yokota, T. Nomura, S. Yoshida, N.H. Chua // Plant Cell. – 1998. – V. 10. – P. 1677–1690.

155. **Korn, M.** Heterosis in the freezing tolerance and sugar and flavonoid contents of crosses between Arabidopsis thaliana accessions of widely varying freezing tolerance / M. Korn, S. Peterek, H.P. Mock, A.G. Heyer, D.K. Hincha // Plant Cell Environ. – 2008. – V. 31(6). – P. 813–827.

156. **Kotlova, E.R.** Alterations in the composition of membrane glycero- and sphingolipids in the course of *Flammulina velutipes* surface culture development / E.R. Kotlova, S.V. Senik, T. Kücher, A.L. Shavarda, A.A. Kiyashko, N.V. Psurtseva, N.F. Sinyutina, R.A. Zubarev // Microbiology. – 2009. – V. 78. – P. 193–201.

157. **Krajewsky-Bertrand, M.A.** Deuterium-NMR investigation of plant sterol effects on soybean phosphatidylcholine acyl chain ordering / M.A. Krajewsky-Bertrand, A. Milon, M.A. Hartmann // Chem Phys Lipids. – 1992. – V. 63. – P. 235–241.

158. **Laloi, M.** Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells / M. Laloi, A.M. Perret, L. Chatre, S. Melser, C. Cantrel, M.N. Vaultier, A. Zachowski, K. Bathany, J.M. Schmitter, M. Vallet, R. Lessire, M.A. Hartmann, P. Moreau // Plant Physiol. – 2007. – V. 143(1). – P. 461–472.

159. Larkindale, J. Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid / J. Larkindale, M.R. Knight // Plant Physiol. – 2002. – V. 128(2). – P. 682–695.

160. Lee, A.G. How lipids affect the activities of integral membrane proteins / A.G. Lee // Biochim Biophys Acta. – 2004. – V. 1666. – P. 62–87.

161. **Lefebvre, B.** Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system / B. Lefebvre, F. Furt, M.A. Hartmann, L.V. Michaelson, J.P. Carde, F. Sargueil-Boiron, M. Rossignol, J.A. Napier, J. Cullimore, J.J. Bessoule, S. Mongrand // Plant Physiol. – 2007. – V. 144(1). – P. 402–418.

162. Leonarduzzi, G. Early involvement of ROS overproduction in apoptosis induced by 7-ketocholesterol / G. Leonarduzzi, B. Vizio, B. Sottero, V. Verde, P. Gamba, C. Mascia, E. Chiarpotto, G. Poli, F. Biasi // Antioxid Redox Signal. – 2006. – V. 8(3-4). – P. 375–380.

163. Lescot, M. PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences / M. Lescot, P. Déhais, Y. Moreau, B. De Moor, P. Rouzé, S. Rombauts // Nucleic Acids Res. – 2002. – V. 30. – P. 325–327.

164. Levine, T.P. Dual targeting of Osh1p, a yeast homologue of oxysterolbinding protein, to both the Golgi and the nucleus-vacuole junction / T.P. Levine, S. Munro // Mol Biol Cell. -2001. - V. 12(6). - P. 1633-1644. 165. Levine, B. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy / B. Levine, D.J. Klionsky // Dev Cell. – 2004. – V. 6(4). – P. 463–477.

166. Li, W. Oxidation products formed from phytosterols / W. Li, R. Przybylski // Inform. – 1995. – V. 6(4). – P. 499–500.

167. Li, J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction / J. Li, J. Chory // Cell. – 1997. – V. 90(5). – P. 929–938.

168. Li, J. BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in Arabidopsis / J. Li,
K.H. Nam, D. Vafeados, J. Chory // Plant Physiol. – 2001. – V. 127(1). – P. 14–22.

169. Li, D.Y. Molecular characterization of a novel salt-inducible gene for an OSBP (oxysterol-binding protein)-homologue from soybean / D.Y. Li, H. Inoue, M. Takahashi, T. Kojima, M. Shiraiwa, H. Takahara // Gene. – 2008. – V. 407(1-2). – P. 12–20.

170. Lindsey, K. Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signalling / K. Lindsey, M.L. Pullen, J.F. Topping // Trends Plant Sci. – 2003. – V. 8(11).
– P. 521–525.

171. Lingwood, D. Lipid rafts as a membrane-organizing principle / D. Lingwood, K. Simons // Science. – 2010. – V. 327. – P. 46–50.

172. Liu, Q. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis / Q. Liu, M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki // Plant Cell. – 1998. – V. 10(8). – P. 1391–1406.

173. Liu, Y. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants / Y. Liu, Y. Xiong, D.C. Bassham // Autophagy. – 2009. – V. 5. – P. 954–963.

174. **London, E.** Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes / E. London // Curr Opin Struct Biol. – 2002. – V. 12(4). – P. 480–486.

175. Los, D.A. Membrane fluidity and its roles in the perceptions of environmental signals / D.A. Los, N. Murata // Biochim Biophys Acta. – 2004. – V. 1666. – P. 142–157.

176. **Luo, M**. Cloning and expression of two sterol C-24 methyltransferase genes from upland cotton (*Gossypium hirsuturm* L.) / M. Luo, K. Tan, Z. Xiao, M. Hu, P. Liao, K. Chen // J Genet Genomics. – 2008. – V. 35(6). – P. 357–363.

177. **Luu, B.** Oxysterols: biological activities and physicochemical studies / B. Luu, C. Moog // Biochimie. – 1991. – V. 73. – P. 1317–1320.

178. **Lynch, D.V.** Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma) / D.V. Lynch, P.L. Steponkus // Plant Physiol. – 1987. – V. 83. – P. 761–767.

179. Lyons, J.M. Chilling injury in plants / J.M. Lyons // Annu Rev Plant Physiol.
- 1973. - V. 24. - P. 445–466.

180. **Ma, J.** Sequence-based analysis of translocations and inversions in bread wheat (Triticum aestivum L.) / J. Ma, J. Stiller, P.J. Berkman, Y. Wei, J. Rogers, C. Feuillet, J. Dolezel, K.F. Mayer, K. Eversole, Y.L. Zheng, C. Liu // PLoS One. – 2013. – V. 8(11). – P. e79329.

181. **Marcussen, T.** Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat / T. Marcussen, S.R. Sandve, L. Heier, M. Spannagl, M. Pfeifer, K.S. Jakobsen, B.B. Wulff, B. Steuernagel, K.F. Mayer, O.A. Olsen, International Wheat Genome Sequencing Consortium // Science. – 2014. – V. 345(6194). – P. 1250092.

182. **Markham, J.E.** Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves / J.E. Markham, J. Li, E.B. Cahoon, J.G. Jaworski // J Biol Chem. – 2006. – V. 281. – P. 22684–22694.

183. Markham, J.E. Plant sphingolipids: function follows form / J.E. Markham,
D.V. Lynch, J.A. Napier, T.M. Dunn, E.B. Cahoon // Curr Opin Plant Biol. – 2013. – V.
16(3). – P. 350–357.

184. **Martin, S.W.** Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans* / S.W. Martin, J.B. Konopka // Eukaryot Cell. – 2004. – V. 3. – P. 675–684.

185. **Martin, S.W.** Lipid microdomains - plant membranes get organized / S. W. Martin, B.J. Glover, J.M. Davies // Trends Plant Sci. – 2005 – V. 10. – P. 263–265.

186. **Marty, A.** Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin / Marty A., Finkelstein A. // J Gen Physiol. – 1975. – V. 65. – P. 515–526.

187. **McIntosh, R.A.** Catalogue of gene symbols for wheat // R.A. McIntosh, C.E. Hart, K.M. Devos, M.D. Gale, W.J. Rogers – Proc. IX Int. Wheat Genet. Symp. Saskatoon, 1998. – V. 5. – 235 p.

188. **Men, S.** Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity / S. Men, Y. Boutté, Y. Ikeda, X. Li, K. Palme, Y.D. Stierhof, M.A. Hartmann, T. Moritz, M. Grebe // Nat Cell Biol. – 2008. – V. 10(2). – P 237–244.

189. Méance, J. Répartition des substances stéroliques à l'intérieur des mitochondries de l'inflorescence de Chou-fleur / J. Méance, P. Dupéron, R. Dupéron // Physiol Vég. – 1976. – V. 59. – P. 745–756.

190. **Meijer, H.J.** Phospholipid-based signaling in plant / H.J. Meijer, T. Munnik // Annu. Rev. Plant Biol. – 2003. – V. 54. – P. 265–306.

191. **Mercer, E.I**. Sterol biosynthesis inhibitors: their current status and modes of action / E.I. Mercer // Lipids. – 1991. – V. 26(8). – P. 584–597.

192. **Minami, A.** Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation / A. Minami, M. Fujiwara, A. Furuto, Y. Fukao, T. Yamashita, M. Kamo, Y. Kawamura, M. Uemura // Plant Cell Physiol. – 2009. – V. 50. – P. 341–359.

193. **Minami, A.** Dynamic compositional changes of detergent-resistant plasma membrane microdomains during plant cold acclimation / A. Minami, A. Furuto, M. Uemura // Plant Signal Behav. – 2010. – V. 5(9). – P. 1115–1118.

194. **Minibayeva, F.V.** Contribution of a plasma membrane redox system to the superoxide production by wheat roots / F.V. Minibayeva, O.P. Kolesnikov, L.K. Gordon // Protoplasma. – 1998. – V. 205. – P. 101–106.

195. **Minibayeva, F.V.** Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells / F.V. Minibayeva, L.K. Gordon, O.P. Kolesnikov, A.V. Chasov // Protoplasma. – 2001. – V. 217(1-3). – P. 125–128.

196. **Minibayeva, F.** Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species / F. Minibayeva, O. Kolesnikov, A. Chasov, R.P. Beckett, S. Lüthje, N. Vylegzhanina, F. Buck, M. Böttger // Plant Cell Environ. – 2009. – V. 32(5). – P. 497–508.

197. **Minibayeva, F.** Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria / F. Minibayeva, S. Dmitrieva, A. Ponomareva, V. Ryabovol // Plant Physiol Biochem. – 2012. – V. 59. – P. 11–19.

198. **Mittler, R.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance / R. Mittler // Trends Plant Sci. – 2002. – V. 7. – P. 405–410.

199. **Molzahn, S.W.** Polyene resistance and the isolation of sterol mutants in *Saccharomyces cerevisiae* / S.W. Molzahn, R.A. Woods // J Gen Microbiol. – 1972. – V. 72(2). – P. 339–348.

200. **Mongrand, S.** Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane / S. Mongrand, J. Morel, J. Laroche, S. Claverol, J.P. Carde, M.A. Hartmann, M. Bonneu, F. Simon-Plas, R. Lessire, J.J. Bessoule // J Biol Chem. – 2004. – V. 279(35). – P. 36277–36286.

201. **Mongrand, S.** Membrane rafts in plant cells / S. Mongrand, T. Stanislas, E.M. Bayer, J. Lherminier, F. Simon-Plas // Trends Plant Sci. – 2010. – V. 15(12). – P. 656–663.

202. **Morikawa, T.** Cytochrome P450 CYP710A encodes the sterol C-22 desaturase in arabidopsis and tomato / T. Morikawa, M. Mizutani, N. Aoki, B. Watanabe, H. Saga, S. Saito, A. Oikawa, H. Suzuki, N. Sakurai, D. Shibata, A. Wadano, K. Sakata, D. Ohta // Plant Cell. – 2006. – V. 18(4). – P. 1008–1022.

203. **Mukherjee, S.** Membrane domains / S. Mukherjee, F.R. Maxfield // Annu Rev Cell Dev Biol. – 2004. – V. 20. – P. 839–866. 204. **Mukhtar, H.** Studies on the activity of *Kluyveromyces lactis* S-adenosylmethionine: delta 24-sterol methyltransferase in presence of polyenic antifungal agents / H. Mukhtar, A. Hakkou, R. Bonaly // Mycopathologia. – 1994. – V. 126(2). – P. 75–83.

205. Nakashita, H. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice / H. Nakashita, M. Yasuda, T. Nitta, T. Asami, S. Fujioka, Y. Arai, K. Sekimata, S. Takatsuto, I. Yamaguchi, S. Yoshida // Plant J. – 2003. – V. 33. – P. 887–889.

206. Narváez-Vásquez, J. Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves / J. Narváez-Vásquez, J. Florin-Christensen, C.A. Ryan // Plant Cell. – 1999. – V. 11. – P. 2249–2260.

207. **Nasir, M.** Sterols from the red algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis*, from Persian Gulf / M. Nasir, S. Saeidnia, A. Mashinchian-Moradi, A.R. Gohari // Pharmacogn Mag. – 2011. –V. 7(26). – P. 97–100.

208. **Neelakandan, A.K.** Cloning, functional expression and phylogenetic analysis of plant sterol 24C-methyltransferases involved in sitosterol biosynthesis / A.K. Neelakandan, Z. Song, J. Wang, M.H. Richards, X. Wu, B. Valliyodan, H.T. Nguyen, W.D. Nes // Phytochemistry. – 2009. – V. 70. – P. 1982–1998.

209. **Neelakandan, A.K.** Molecular characterization and functional analysis of *Glycine max* sterol methyl transferase 2 genes involved in plant membrane sterol biosynthesis / A.K. Neelakandan, T.M. Nguyen, R. Kumar, L.S. Tran, S.K. Guttikonda, T.N. Quach, D.L. Aldrich, W.D. Nes, H.T. Nguyen // Plant Mol Biol. – 2010. – V. 74. – P. 503–518.

210. **Nes, W.R.** Occurrence, physiology, and ecology of sterols. Biochemistry of steroids and other isopentenoids / W.R. Nes, M.L. McKean // University Park Press, Baltimore, 1977, 411–533 p.

211. Nes, W.D. Enzymology of phytosterol transformations / W.D. Nes, M. Venkatramesh // Crit Rev Biochem Mol Biol. – 1999. – V. 34. – P. 81–93.

212. Nes, W.D. Sterol methyltransferase: enzymology and inhibition / W.D. Nes
// Biochim Biophys Acta. - 2000. - V. 1529. - P. 63–88.

213. **Nes, W.D.** Active site mapping and substrate channeling in the sterol methyltransferase pathway / W.D. Nes, J.A. Marshall, Z. Jia, T.T. Jaradat, Z. Song, P. Jayasimha // J Biol Chem. – 2002. – V. 277(45). – P. 42549–42556.

214. Nes, W.D. Biosynthesis of phytosterols. Kinetic mechanism for the enzymatic C-methylation of sterols / W.D. Nes, Z. Song, A.L. Dennis, W. Zhou, J. Nam, M.B. Miller // J Biol Chem. – 2003. – V. 278. – P. 34505–34516.

215. **Nes, W.D.** Sterol methyltransferase: functional analysis of highly conserved residues by site-directed mutagenesis / W.D. Nes, P. Jayasimha, W. Zhou, R. Kanagasabai, C. Jin, T.T. Jaradat, R.W. Shaw, J.M. Bujnicki // Biochemistry. – 2004. – V. 43(2). – P. 569–576.

216. **Nes, W.D.** Biosynthesis of cholesterol and other sterols / W.D. Nes // Chem Rev. – 2011. – V. 111. – P. 6423–6451.

217. Nichols, B.W. Separation of the lipids of photosynthetic tissues: improvements in analysis by thin-layer chromatography / B.W. Nichols // Biochem Biophys Acta. -1963. - V. 70. - P. 417-422.

218. **Nieto, B.** Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is regulated at the post-translational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways / B. Nieto, O. Forés, M. Arró, A. Ferrer // Phytochemistry. -2009. - V. 70. - P. 53-59.

219. **Nigro, D.** Characterization of ferredoxin-dependent glutamine-oxoglutarate amidotransferase (Fd-GOGAT) genes and their relationship with grain protein content QTL in wheat / D. Nigro, A. Blanco, O.D. Anderson, A. Gadaleta // PLoS One. – 2014. – V. 9(8). – P. 1–11.

220. Noda, M. Occurrence of cholesterol as a major sterol component in leaf surface lipids / M. Noda, M. Tanaka, Y. Seto, T. Aiba, C. Oku // Lipids. – 1988. – V. 23. – P. 439–444.

221. **Nomura, T.** Brassinosteroid/Sterol synthesis and plant growth as affected by lka and lkb mutations of Pea / T. Nomura, Y. Kitasaka, S. Takatsuto, J.B. Reid, M. Fukami, T. Yokota // Plant Physiol. – 1999. – V. 119(4). – P. 1517–1526.

222. Normén, L. Soy sterol esters and beta-sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel / L. Normén, P. Dutta, A. Lia, H. Andersson // Am J Clin Nutr. – 2000. – V. 71(4). – P. 908–913.

223. **Nyström, L.** Total plant sterols, steryl ferulates and steryl glycosides in milling fractions of wheat and rye / L. Nyström, A. Paasonen, A.-M. Lampi, V. Piironen // J Cereal Sci. – 2007. – V. 45. – P. 106–115.

224. **Ohyama, K.** Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in Arabidopsis / K. Ohyama, M. Suzuki, J. Kikuchi, K. Saito, T. Muranaka // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. – V. 106. – P. 725–730.

225. Olkkonen, V.M. Oxysterol binding proteins: in more than one place at one time? / V.M. Olkkonen, T.P. Levine // Biochem Cell Biol. – 2004. – V. 82(1) – P. 87–98.

226. **Pagano, R.E.** Membrane traffic in sphingolipid storage diseases / R.E. Pagano, V. Puri, M. Dominguez, D.L. Marks // Traffic. – 2000. – V. 1. – P. 807–815.

227. **Palta, J.P.** Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of Solanum species / J.P. Palta, B.D. Whitaker, L.S. Weiss // Plant Physiol – 1993. – V. 103. – P. 793–803.

228. **Palva, E.T.** Biological mechanisms of low temperature stress response: cold acclimation and development of freezing tolerance in plants / E.T. Palva, S.T. Htiharju, I. Tamminen , T. Puhakainen, R. Laitinen, J. Svensson, E. Helenius, P. Heino // JIRCAS Working Report. – 2002. – P. 9–15.

229. **Pang, S.Z.** An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants / S.Z. Pang, D.L. DeBoer, Y. Wan, G. Ye, J.G. Layton, M.K. Neher, C.L. Armstrong, J.E. Fry, M.A. Hinchee, M.E. Fromm // Plant Physiol. – 1996. – V. 258. – P. 1350–1353.

230. **Paolacci, A.R.** Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat / A.R. Paolacci, O.A. Tanzarella, E. Porceddu, M. Ciaffi // BMC Mol Biol. – 2009. – V. 10:11.

231. **Parton, R.G.** Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms / R.G. Parton, A.A. Richards // Traffic. – 2003. – V. 4. – P. 724–738.

232. **Peng, L.** Sitosterol- β -glucoside as primer for cellulose synthesis in plants / L. Peng, Y. Kawagoe, P. Hogan, D. Delmer // Science. – 2002. – V. 295. – P. 147–150.

233. **Pereira, M.** Cloning, mechanistic and functional analysis of a fungal sterol C24-methyltransferase implicated in brassicasterol biosynthesis / M. Pereira, Z. Song, L.K. Santos-Silva, M.H. Richards, T.T. Nguyen, J. Liu, C.M. de Almeida Soares, A.H. da Silva Cruz, K. Ganapathy, W.D. Nes // Biochim Biophys Acta. – 2010. – V. 1801(10). – P. 1163–1174.

234. **Pfaffl, M.W.** A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR / M.W. Pfaffl // Nucleic Acids Res. – 2001. – V. 29(9). – P. 2002–2007.

235. **Piironen, V.** Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition / V. Piironen, D.G. Lindsay, T.A. Miettinen, J. Toivo, A.-M. Lampi // J Sci Food Agric. – 2000. – V. 80. – P. 939–966.

236. **Pike, L.J.** Cholesterol depletion de-localizes PIP2 and inhibits hormonestimulated phosphatidylinositol turnover / L.J. Pike, J.M. Miller // J Biol Chem. – 1998. – V. 273. – P. 22298–22304.

237. **Pike, L.J.** The challenge of lipid rafts / L.J. Pike // J Lipid Res. – 2009. –V. 50. – P. 323–328.

238. **Piotrowska, A.** Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates / A. Piotrowska, A. Bajguz // Phytochemistry. – 2011. – V. 72(17). – P. 2097–2112.

239. **Plat, J.** Oxidized plant sterols in human serum and lipid infusions as measured by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry / J. Plat, H. Brzezinka, D. Lütjohann, R.P. Mensink, K. von Bergmann // J Lipid Res. – 2001. – V. 42(12). – P. 2030–2038.

240. **Pose, D.** Identification of the Arabidopsis dry2/sqe1-5 mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species / D.

Pose, I. Castanedo, O. Borsani, B. Nieto, A. Rosado, L. Taconnat, A. Ferrer, L. Dolan, V. Valpuesta, M.A. Botella // Plant J. – 2009. – V. 59. – P. 63–76.

241. **Puri, V.** Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases / V. Puri, R. Watanabe, M. Dominguez, X. Sun, C.L. Wheatley, D.L. Marks, R.E. Pagano // Nat Cell Biol. – 1999. – V. 1. – P. 386–388.

242. **Qiu, P.** Comparative promoter analysis and its application in analysis of PTH-regulated gene expression / P. Qiu, L. Qin, R.P. Sorrentino, J. Greene, N.C. Partridge, L. Wang // J Mol Biol. – 2003. – V. 278. – P. 167–181.

243. **Rana, R.M.** Regulation of ATG6/Beclin-1 homologs by abiotic stresses and hormones in rice (*Oryza sativa* L.) / R.M. Rana, S. Dong, Z. Ali, J. Huang, H.S. Zhang // Genet Mol Res. – 2012. – V. 11(4). – P. 3676–3687.

244. **Rani, V.** Computational methods to dissect *cis*-regulatory transcriptional networks / V. Rani // J Biosci. – 2007. – V. 32(7). – P. 1325–1330.

245. Rao, A.V. Anticarcinogenic effects of saponins and phytosterols / A.V. Rao,
R. Koratkar // Antinutrient Phytochem Food. – 1997. – V. 18. – P. 313–324.

246. **Roche, Y.** Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts / Y. Roche, P. Gerbeau-Pissot, B. Buhot // FASEB J. – 2008. – V. 22. – P. 3980–3991.

247. **Rochester, C.P.** Lipid composition of plasma membranes isolated from light-grown barley (*Hordeum vulgare*) leaves: identification of cerebroside as a major component / C.P. Rochester, P. Kjellbom, B. Andersson, C. Larsson // Arch Biochem Biophys. – 1987. – V. 255(2). – P. 385–391.

248. **Rochester, C.P.** Lipid composition of plasma membranes from barley leaves and roots, spinach leaves and cauliflower inflorescences / C.P. Rochester, P. Kjellbom, C. Larsson // Physiol Plant. – 1987. – V. 71(3). – P.257–263.

249. **Rohmer, M.** From molecular fossils of bacterial hopanoids to the formation of isoprene units: discovery and elucidation of the methylerythritol phosphate pathway / M. Rohmer // Lipids. – 2008. – V. 43(12). – P. 1095–1107.
250. **Rozentsvet, O.A.** Membrane-forming lipids of wild halophytes growing under the conditions of Prieltonie of South Russia / O.A. Rozentsvet, V.N. Nesterov, E.S. Bogdanova // Phytochemistry. – 2014. – V. 105. – P. 37–42.

251. Ruelland, E. Cold signalling and cold acclimation in plants / E. Ruelland,
M.N. Vaultier, A. Zachowski, V. Hurry, J.C. Kader, M. Delseny // Adv Bot Res. – 2009.
– V. 49. – P. 35–150.

252. **Russell, D.W.** Oxysterol biosynthetic enzymes / D.W. Russell // Biochim Biophys Acta. – 2000. – V. 1529. – P. 126–135.

253. **Ryu, S.B.** Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants / S.B. Ryu // Trends Plant Sci. – 2004. – V. 9. – P. 229–235.

254. **Salaun, C.** Lipid rafts and the regulation of exocytosis / C. Salaun, D.J. James, L.H. Chamberlain // Traffic. – 2004. – V. 5. – P. 255–264.

255. **Sandstrom, R.P.** Comparison of the lipid composition of oat root and coleoptile plasma membranes: lack of short-term change in response to auxin / R.P. Sandstrom, R.E. Cleland // Plant Physiol. – 1989. – V. 90. – P. 1207–1213.

256. **Sanger, F.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1977. – V. 74. – P. 5463–5467.

257. **Sairam, R.K.** Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance / R.K. Sairam, D.C. Saxena // J. Agron. Crop Sci. – 2002. – V. 184. – P. 55–61.

258. **Sasse J.M.** Physiological actions of brassinosteroids: an update / J.M. Sasse // J Plant Growth Regul. – 2003. – V. 22(4). – P. 276–288.

259. **Schaeffer, A.** Plant sterol-C24-methyl transferases: different profiles of tobacco transformed with SMT1 or SMT2 / A. Schaeffer, P. Bouvier-Navé, P. Benveniste, H. Schaller // Lipids. – 2000. – V. 35. – P. 263–269.

260. **Schaeffer, A.** The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in Arabidopsis is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1 / A. Schaeffer, R. Bronner, P. Benveniste, H. Schaller // Plant J. – 2001. – V. 25. – P. 605–615.

261. **Schaller, H.** Sterol composition of tobacco calli selected for resistance to fenpropimorf / H. Schaller, P. Maillot-Vernier, P. Benvenisle, G. Belliard // Phytochem. – 1991. – V. 30. – P. 2547–2554.

262. **Schaller, H.** Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Mull. Arg. 3hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction / H. Schaller, B. Grausem, P. Benveniste, M.L. Chye, C.T. Tan, Y.H. Song, N.H. Chua // Plant Physiol. – 1995. – V. 109. – P. 761–770.

263. **Schaller, H.** Overexpression of an Arabidopsis cDNA encoding a sterol-C24(1)-methyltransferase in tobacco modifies the ratio of 24-methyl cholesterol to sitosterol and is associated with growth reduction / H. Schaller, P. Bouvier-Navé, P. Benveniste // Plant Physiol. – 1998. – V. 118. – P. 461–469.

264. **Schaller, H.** The role of sterols in plant growth and development / H. Schaller // Prog Lipid Res. – 2003. – V. 42. – P. 163–175.

265. **Schaller, H.** New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants / H. Schaller // Plant Physiol Biochem. – 2004. – V. 42(6). – P. 465–476.

266. **Schrick, K.** A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and cellulose in Arabidopsis / K. Schrick, S. Fujioka, S. Takatsuto, Y.D. Stierhof, H. Stransky, S. Yoshida, G. Jürgens // Plant J. – 2004. – V. 38(2). – P. 227–243.

267. **Schroepfer, G.J.Jr.** Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes / G.J.Jr. Schroepfer // Physiol Rev. – 2000. – V. 80(1). – P. 361–554.

268. **Schuler, I.** Soybean phosphatidylcholine vesicles containing plant sterols: a fluorescence anisotropy study / I. Schuler, G. Duportail, N. Glasser, P. Benveniste, M.A. Hartmann // Biochim Biophys Acta. – 1990. – V. 1028. – P. 82–88.

269. **Schuler, I.** Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers / I. Schuler, A. Milon, Y. Nakatani, G. Ourisson, A.M. Albrecht, P. Benveniste, M.A. Hartman // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1991. – V. 88. – P. 6926–6930.

270. **Senthil-Kumar, M.** Screening of inbred lines to develop a thermotolerant sunflower hybrid using the temperature induction response (TIR) technique: a novel approach by exploiting residual variability / M. Senthil-Kumar, V. Srikanthbabu, B.

Mohan Raju, Ganeshkumar, N. Shivaprakash, M. Udayakumar // J Exp Bot. – 2003. – V. 54. – P. 2569–2578.

271. **Senthil-Kumar, M.** AtCYP710A1 gene-mediated stigmasterol production plays a role in imparting temperature stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* / M. Senthil-Kumar, K. Wang, K.S. Mysore // Plant Signal Behav. – 2013. – V. 8(2). – P. e23142-1– e23142-5.

272. Senthil-Kumar, M. Role of phytosterols in drought stress tolerance in rice
/ M. Senthil-Kumar, K. Ali, A. Dahuja, A. Tyagi // Plant Physiol Biochem. – 2015. – V.
96. – P. 83–89.

273. **Shi, J.** Identification and characterization of an S-adenosyl-L-methionine D24-sterol C-methyltransferase cDNA from soybean / J. Shi, R.A. Gonzales, M.K. Bhattacharyya // J Biol Chem. – 1996. – V. 271. – P. 9384–9389.

274. **Shoeva, O.Y.** The homoeologous genes encoding chalcone-flavanone isomerase in *Triticum aestivum* L.: structural characterization and expression in different parts of wheat plant / O.Y. Shoeva, E.K. Khlestkina, H. Berges, E.A. Salina // Gene. – 2014. – V. 538(2). – P. 334–341.

275. **Shuler, I.** Soybean phosphatidylcholine vesicles containing plant sterols: a fluorescence anisotropy study / I. Shuler, G. Durtail, N. Glasser, P. Benveniste, M.A. Hartmann // Biochim Biophys Acta. – 1990. – V. 1028(1). – P. 82–88.

276. **Sikorski, Z.E.** Chemical and functional properties of food lipids / Z.E. Sikorski, A. Kolakowska // CRC: Press LLC, 2002, 388 p.

277. **Simons, K.** Functional rafts in cell membranes / K. Simons, E. Ikonen // Nature. – 1997. – V. 387(6633). – P. 569–572.

278. **Simons, K.** Lipid rafts and signal transduction / K. Simons, D. Toomre // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2000. – V. 1. – P. 31–39.

279. **Singh, M.** Biotechnological applications of cyclodextrins / M. Singh, R. Sharma, U.C. Banerjee // Biotechnol Adv. – 2002. – V. 20(5-6). – P. 341–359.

280. **Sitbon, F.** Sterol composition and growth of transgenic tobacco plants expressing type-1 and type-2 sterol methyltransferases / F. Sitbon, L. Jonsson // Planta. – 2001. – V. 212. – P. 568–572.

281. **Sláviková, S.** An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of Arabidopsis seedlings to hormonal controls and abiotic stresses / S. Sláviková, S. Ufaz, T. Avin-Wittenberg, H. Levanony, G. Galili // J Exp Bot. – 2008 – V. 59. – P. 4029–4043.

282. **Souter, M.** *hydra* mutants of Arabidopsis are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. / M. Souter, J. Topping, M. Pullen, J. Friml, K. Palme, R. Hackett, D. Grierson, K. Lindsey // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – P. 1017–1031.

283. **Spassieva, S.D.** Plant sphingolipids today - are they still enigmatic? / S.D. Spassieva, J. Hille // Plant boil. – 2003. – V. 5. – P. 125–136.

284. **Sperling, P.** Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, frst genes and functions / Sperling P., Heinz E. // Biochim Biophys Acta. – 2003. – V. 1632(1-3). – P. 1–15.

285. **Sperling, P.** Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? / P. Sperling, S. Franke, S. Lüthje, E. Heinz // Plant Physiol. Biochem. – 2005. – V. 43(12). – P. 1031–1038.

286. **Steponkus, P.L.** A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat – two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition / P.L. Steponkus, M. Uemura, M.S. Webb // Advances in Low-Temperature Biology, vol. 2. Ed.: P.L. Steponkus, London: JAI Press, Ltd, 1993, 211–312 p.

287. **Subramaniam, K.** Isolation of a gene coding for a putative sterol C-24 methyltransferase in wheat / K. Subramaniam, B. Liu, Z. Ye, S. Abbo, P.P. Ueng // Wheat Information Service. – 1999. – V. 89. – P. 17–22.

288. **Suits, F.** Molecular dynamics investigation of the structural properties of phosphatidylethanolamine lipid bilayers / F. Suits, M.C. Pitman, S.E. Feller // J Chem Phys. – 2005. – V. 122(24). – P. 244714.

289. **Suzuki, M.** Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis / M. Suzuki, T. Muranaka // Lipids. – 2007. – V. 42. – P.47–54.

290. **Tanner, W.** In plant and animal cells, detergent-resistant membranes do not define functional membrane rafts / W. Tanner, J. Malinsky, M. Opekarová // Plant Cell. – 2011. – V. 23. – P. 1191–1193.

291. **Titapiwatanakun, B.** ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis / B. Titapiwatanakun, J.J. Blakeslee, A. Bandyopadhyay, H. Yang, J. Mravec, M. Sauer, Y. Cheng, J. Adamec, A. Nagashima, M. Geisler, T. Sakai, J. Friml, W.A. Peer, A.S. Murphy // Plant J. – 2009. – V. 57(1). – P. 27–44.

292. Uemura, M. A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance / M. Uemura, P.L. Steponkus // Plant Physiol. – 1994. – V. 104. – P. 479–496.

293. Uemura, M. Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane / M. Uemura, P.L. Steponkus // J Plant Res. – 1999. – V. 112. – P. 245–254.

294. **Umate, P.** Oxysterol binding proteins (OSBPs) and their encoding genes in Arabidopsis and rice / P. Umate // Steroids. -2011. - V.76(5). - P.524-529.

295. Valente, C. The nvolvement of PUMP from mitochondria of *Araucaria angustifolia* embryogenic cells in response to cold stress / C. Valente, P. Pasqualim, T. Jacomasso, J.B.B. Maurer, E.M. de Souza, G.R. Martinez, M.E.M. Rocha, E.G.S. Carnieri, S.M.S.C. Cadena // Plant Sci. – 2012. – V. 197. – P. 84–91.

296. **Valitova, J.N.** Effects of sterol-binding agent nystatin on wheat roots: The changes in membrane permeability, sterols and glycoceramides / J.N. Valitova, F.V. Minibayeva, E.R. Kotlova, A.V. Novikov, A.L. Shavarda, L.I. Murtazina, I.S. Ryzhkina // Phytochemistry. – 2011. – V. 72(14-15). – P. 1751–1759.

297. **Valitova, J.** Sterol binding by methyl-b-cyclodextrin and nystatin - comparative analysis of biochemical and physiological consequences for plants / J. Valitova, A. Sulkarnayeva, E. Kotlova, A. Ponomareva, F. Mukhitova, L. Murtazina, I. Ryzhkina, R. Beckett, F. Minibayeva // FEBS J. – 2014. – V. 281(8). – P. 2051–2060.

298. **Vance, J.E.** Lipid imbalance in the neurological disorder, Niemann- Pick C disease / J.E. Vance // FEBS Lett. – 2006. – V. 580. – P. 5518–5524.

299. **Villette, C.** Plant sterol diversity in pollen from angiosperms / C. Villette, A. Berna, V. Compagnon, H. Schaller // Lipids. – 2015. – V. 50(8). – P 749–760.

300. **Vivancos, M.** Beta-sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages / M. Vivancos, J.J. Moreno // Free Radic Biol Med. – 2005 – V. 39(1). – P. 91–97.

301. **Vriet, C.** From squalene to brassinolide: the steroid metabolic and signaling pathways across the plant kingdom / C. Vriet, E. Russinova, C. Reuzeau // Mol Plant. – 2013. – V. 6(6). – P. 1738–1757.

302. **Vu, H.S.** Head-group acylation of monogalactosyldiacylglycerol is a common stress response, and the acyl-galactose acyl composition varies with the plant species and applied stress / H.S. Vu, M.R Roth, P. Tamura, T. Samarakoon, S. Shiva, S. Honey, K. Lowe, E.A Schmelz, T.D. Williams, R. Welti // Physiol Plant. – 2014. – V. 150. – P. 517–528.

303. **Wagatsuma, T.** Higher sterol content regulated by CYP51 with concomitant lower phospholipid content in membranes is a common strategy for aluminium tolerance in several plant species / T. Wagatsuma, M.S. Khan, T. Watanabe, E. Maejima, H. Sekimoto, T. Yokota, T. Nakano, T. Toyomasu, K. Tawaraya, H. Koyama, M. Uemura, S. Ishikawa, T. Ikka, A. Ishikawa, T. Kawamura, S. Murakami, N. Ueki, A. Umetsu, T. Kannari // J Exp Bot. – 2015. – V. 66(3). – P. 907–918.

304. **Wang, S.Y.** Changes of membrane lipids in apple buds during dormancy and budbreak / S.Y. Wang, M. Faust // J Amer SoC Hort Sci. – 1990. – V. 115(5). – P. 803–808.

305. **Wang, Z.Y.** BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids / Z.Y. Wang, H. Seto, S. Fujioka, S. Yoshida, J. Chory // Nature. – 2001. – V. 410. – P. 380–383.

306. **Wang, T.** Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates / T. Wang, K.B. Hicks, R. Moreau // J Am Oil Chem Soc. – 2002. – V. 79. – P. 1201–1206.

307. Wang, Y. Derivatization of phospholipids / Y. Wang, I.S. Krull, C. Liu, J.D. Orr // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. – 2003. – V. 793(1). – P. 3–14.

308. **Wang, X.** Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses / X. Wang // Plant Physiol. – 2005. – V. 139. – P. 566–573.

309. **Wang, Z.Y.** The brassinosteroid signal transduction pathway / Z.Y. Wang, Q. Wang, K. Chong, F. Wang, L. Wang, M. Bai, C. Jia // Cell Res. – 2006. – V. 16(5). – P. 427–434.

310. **Wang, K.** Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast / K. Wang, M. Senthil-Kumar, C.M. Ryu, L. Kang, K.S. Mysore // Plant Physiol. – 2012. – V. 158(4). – P. 1789–1802.

311. Wegener, A. Molecular cloning of ozone-inducible protein from *Pinus sylvestris* L. with high sequence similarity to vertebrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthase / A. Wegener, W. Gimbel, T. Werner, J. Hani, D. Ernst, H.Jr. Sandermann // Biochim Biophys Acta. – 1997. – V. 1350(3). – P. 247–252.

312. Welti, R. Profiling membrane lipids in plant stress responses: role of phospholipase Da in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis / R. Welti, W. Li, M. Li, Y. Sang, H. Biesiada, H.E. Zhou // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – P. 31994–32002.

313. Wendel, J.F. Genome evolution in polyploids / J.F. Wendel // Plant Mol Biol. – 2000. – V. 42. – P. 225–249.

314. Weng, X.C. Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia*/ X.C. Weng, W. Wang // Food Chemistry. – 2000. – V. 71. – P. 489–493.

315. Wentzinger, L.F. Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase / L.F. Wentzinger, T.J. Bach, M.A. Hartmann // Plant Physiol. – 2002. – V. 130. – P. 334–346.

316. **Wickstrom, S.A.** Endostatin associates with lipid rafts and induces reorganization of the actin cytoskeleton via down-regulation of RhoA activity / S.A. Wickstrom, K. Alitalo, J. Keski-Oja // J Biol Chem. – 2003. – V. 278. – P. 37895–37901.

317. **Willemsen, V.** Cell polarity and PIN protein positioning in Arabidopsis require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function / V. Willemsen, J. Friml, M. Grebe, A. van den Toorn, K. Palme, B. // Plant Cell. – 2003. – V. 15(3). – P. 612–625.

318. **Wojciechowski, Z.A.** Biochemistry of phytosterol conjugates, in physiology and biochemistry of sterols / Z.A.Wojciechowski – Ed. by G.W. Patterson and D.W. Nes, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, 1991. – 361–395 p.

319. **Worrall, D.** Sphingolipids, new players in plant signaling / D. Worrall, C.K. Ng, A.M. Hetherington // Trends Plant Sci. – 2003. – V. 8. – P. 317–320.

320. **Wu, J.** The response of plasma membrane lipid composition in callus of the halophyte *Spartina patens* (Poaceae) to salinity stress / J. Wu, D.M. Seliskar, J.L. Gallagher // Am J Bot. – 2005. – V. 92(5). – P. 852–858.

321. Xiong, Y. Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in Arabidopsis / Y. Xiong, A.L. Contento, D.C. Bassham // Autophagy. – 2007. – V. 3. – P. – P. 257–258.

322. **Yoshida, S.** Lipid composition of plasma membranes and tonoplasts isolated from etiolated seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.) / S. Yoshida, M. Uemura // Plant Physiol. – 1986. – V. 82(3). – P. 807–812.

323. Yue, J. Wheat homologs of yeast ATG6 function in autophagy and are implicated in powdery mildew immunity / J. Yue, H. Sun, W. Zhang, D. Pei, Y. He, H. Wang // BMC Plant Biol. -2015. - V. 1. - P. 1-15.

324. **Zauber, H.** Unraveling sterol-dependent membrane phenotypes by analysis of protein abundance-ratio distributions in different membrane fractions under biochemical and endogenous sterol-depletion / H. Zauber, W. Szymanski, W.X. Schulze // Mol Cell Proteomics. – 2013. – V. 12(12). – P. 3732–3743.

325. Zauber, H. Plasma membrane lipid-protein interactions affect signaling processes in sterol-biosynthesis mutants in Arabidopsis thaliana / H. Zauber, A. Burgos, P. Garapati, W.X. Schulze // Front Plant Sci. – 2014. – V. 5(78). – P. 1–18.

326. **Zidovetzki, R.** Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies / R. Zidovetzki, I. Levitan // Biochim Biophys Acta. – 2007. – V. 1768. – P. 1311–1324.

327. Zien, C.A. In-vivo substrates and the contribution of the common phospholipase D, PLDa, to wound-induced metabolism of lipids in Arabidopsis / C.A. Zien, C. Wang, X. Wang, R. Welti // Biochim Biophys Acta. – 2001. – V. 1530. – P. 236–248.

328. **Zhao, J.** Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling / J. Zhao, P. Peng, R.J. Schmitz, A.D. Decker, F.E. Tax, J. Li // Plant Physiol. – 2002. – V. 130(3). – P. 1221–1229.

329. Zhou, W. Sterol methyltransferase2: purification, properties, and inhibition
/ W. Zhou, W.D. Nes // Arch Biochem Biophys. – 2003. – V. 420. – P. 18–34.

330. **Zhou, W.** Mechanism-based enzyme inactivators of phytosterol biosynthesis / W. Zhou, Z. Song, R. Kanagasabai, J. Liu, P. Jayasimha, A. Sinha, P. Veeramachanemi, M.B. Miller, W.D. Nes // Molecules. – 2004. – V. 9(4). – P. 185–203.

331. **Zou, C.** *Cis*-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana* / C. Zou, K. Sun, J.D. Mackaluso, A.E. Seddon, R. Jin, M.F. Thomashow, S.H. Shiu // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2011. – V. 108(36). – P. 14992–14997.

ПРИЛОЖЕНИЕ



Рис. 1. Результат выравнивания нуклеотидных последовательностей трех гомеологичных генов *TaSMT1* пшеницы.

Таблица 1. Потенциальные *цис*-элементы в промоторных областях *TaSMT1*-5A/-4B/-4D. Черный цвет – идентичные для всех 3-х генов, коричневый – характерные для 5A/4B, зеленый – характерные для 4B/4D, фиолетовый – характерные для 5A/4D, красный – специфичные только для одного определённого гена.

TaSMT1-5A	TaSMT1-4B	TaSMT1-4D
5UTRPy-richstretchTTTCTTCTCTCTcis-actingelementconferringtranscriptionlevels	5UTRPy-richstretchTTTCTTCTCTCTcis-actingelementconferringtranscriptionlevels	
	A-box CCGTCC <i>cis</i> -acting regulatory element	A-box CCGTCC <i>cis</i> -acting regulatory element
	ABRECGTGGCcis-actingelementinvolvedinabscisicacidresponsiveness	
	ACE ACGTGGA <i>cis</i> -acting element involved in light responsiveness	ACE ACGTGGA <i>cis</i> -acting element involved in light responsiveness
	AE-box AGAAACAT part of a module for light response	AE-box AGAAACAT part of a module for light response
ARE TGGTTT <i>cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction	ARE TGGTTT <i>cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction	ARE TGGTTT <i>cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction
Box 4 ATTAAT part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	Box 4 ATTAAT part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	Box 4 ATTAAT part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
	Box I TTTCAAA light responsive element	Box I TTTCAAA light responsive element
		Box-W1 TTGACC fungal elicitor responsive element
CAAT-box C(A/C)AAT common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions	CAAT-box C(A/C)AAT common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions	CAAT-box C(A/C)AAT common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
CCAAT-box CAACGG MYBHv1 binding site	CCAAT-box CAACGG MYBHv1 binding site	CCAAT-box CAACGG MYBHv1 binding site
	CCGTCC-box CCGTCC <i>cis</i> - acting regulatory element related to meristem specific activation	CCGTCC-box CCGTCC <i>cis</i> - acting regulatory element related to meristem specific activation

		EIRE TTCGACC elicitor- responsive element
	ERE ATTTCAAA ethylene- responsive element	ERE ATTTCAAA ethylene- responsive element
G-box GACATGTGGT <i>cis</i> - acting regulatory element involved in light responsiveness	G-box GACATGTGGT <i>cis</i> - acting regulatory element involved in light responsiveness	G-box GACATGTGGT <i>cis</i> - acting regulatory element involved in light responsiveness
GA-motif AAAGATGA part of a light responsive element		
GAG-motif AGAGAGT part of a light responsive element		GAG-motif AGAGAGT part of a light responsive element
	GATT-motif CTCCTGATTGGA part of a light responsive element	
	GC-motifGCCCCGGenhancer-likeelementin anoxic specificinducibility	GC-motifGCCCCGGenhancer-likeelementin anoxic specificinducibility
	HSE AGAAAATTCG cis- acting element involved in heat stress responsiveness	
	LTR CCGAAA <i>cis</i> -acting element involved in low-temperature responsiveness	LTR CCGAAA <i>cis</i> -acting element involved in low- temperature responsiveness
GARE-motif AAACAGA gibberellin-responsive element	GARE-motif AAACAGA gibberellin-responsive element	GARE-motif AAACAGA gibberellin-responsive element
GCN4_motif TGTGTCA <i>cis</i> - regulatory element involved in endosperm expression		
MBS (C/T)AACTG MYB binding site involved in drought-inducibility	MBS (C/T)AACTG MYB binding site involved in drought-inducibility	MBS (C/T)AACTG MYB binding site involved in drought-inducibility
MNF1 GTGCCC(A/T)(A/T) light responsive element		
P-box CCTTTTG gibberellin- responsive element		P-box CCTTTTG gibberellin- responsive element
		Pc-CMA2c GCCCACACA part of a light responsive element
Skn-1_motif GTCAT <i>cis</i> -acting regulatory element required for endosperm expression	Skn-1_motif GTCAT <i>cis</i> -acting regulatory element required for endosperm expression	Skn-1_motif GTCAT <i>cis</i> -acting regulatory element required for endosperm expression

Sp1 GGGCGG light responsive element	Sp1 GGGCGG light responsive element	Sp1 GGGCGG light responsive element
TATA-box T(A/T)T(T/A)A core promoter element around - 30 of transcription start TCA-element GAGAAGAATA <i>cis</i> -acting element involved in salicylic acid responsiveness	TATA-box T(A/T)T(T/A)A core promoter element around - 30 of transcription start	TATA-box T(A/T)T(T/A)A core promoter element around - 30 of transcription start
TCCC-motif TCTCCCT part of a light responsive element	TCCC-motif TCTCCCT part of a light responsive element	TCCC-motif TCTCCCT part of a light responsive element
	TGA-element AACGAC auxin- responsive element	TGA-element AACGAC auxin- responsive element
	TGACG-motif TGACG <i>cis</i> - acting regulatory element involved in the MeJA- responsiveness	TGACG-motif TGACG cis- acting regulatory element involved in the MeJA- responsiveness
	Unnamed2 CCACGTCACCG single-strand DNA-binding proteins site (ssDBP-1 and -2)	Unnamed2 CCACGTCACCG single-strand DNA-binding proteins site (ssDBP-1 and -2)
motif IIb CCGCCGCGCT abscisic acid responsive element		motif IIb CCGCCGCGCT abscisic acid responsive element



Рис. 2. Распределение общих и специфичных потенциальных *цис*-элементов в промоторных областях *TaSMT1*-5A/-4B/-4D.