

**Молекулярные шапероны и холодовая адаптация организмов**

А.К. ГУЛЕВСКИЙ, Л.И. РЕЛИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**Molecular Chaperones and Cold Adaptation of Organisms**

GULEVSKY A.K., RELINA L.I.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Представлен обзор состояния проблемы стрессовых белков – молекулярных шаперонов в свете их возможной роли в процессах холодовой адаптации. Приведена краткая история изучения данного вопроса. Оценены возможные направления будущих исследований в области молекулярных шаперонов.

**Ключевые слова:** шапероны, стрессовые белки, холодоустойчивость.

Представлено огляд стану проблеми стресових білків – молекулярних шаперонів в світлі їх можливої ролі в процесах холодової адаптації. Подается коротка історія вивчення цього питання. Оцінені можливі напрямки майбутніх досліджень в області молекулярних шаперонів.

**Ключові слова:** шаперони, стресові білки, холодостійкість.

The review on the problem state of stress proteins: molecular chaperones in the light of their possible role in cold adaptation processes, is presented. Brief history of this question study is adduced. Possible directions for molecular chaperone future investigations are estimated.

**Key words:** chaperones, stress proteins, cold-resistance.

В 1962 г. в научной прессе появилось сообщение, описывающее любопытный эффект кратковременного воздействия высокой температуры на плодовых мух. При исследовании политенных хромосом из слюнных желез *Drosophila melanogaster* оказалось, что гипертермия включает новые гены.

Потребовалось еще 15 лет, чтобы продемонстрировать, что явление тепловой индукции не является уникальным свойством *D. melanogaster*; поскольку обнаружили подобные явления у птиц и млекопитающих. Сейчас известно, что белки, индуцируемые теплом, или белки теплового шока (БТШ), как их часто называют, практически идентичны у всех организмов, включая бактерии. Пожалуй, еще более значимым было открытие родственной природы ряда этих белков: антитела на определенный БТШ узнавали подобные белки многих других эволюционно далеких видов. Например, антитела на БТШ цыпленка реагируют с белками креветки [17].

Исследователи клонировали несколько генов этих необычных белков и определили их нуклеотидную последовательность. Две группы белков, особенно с молекулярными массами 70 и 90 кДа (БТШ-70 и БТШ-90), являются одними из самых консервативных белков в природе [16]. Это предполагает, что БТШ должны выполнять некую функцию, которая чрезвычайно важна для большинства, если не для всех форм жизни.

Биологи обнаружили, что такие стрессовые факторы, как недостаток кислорода, повышение концентрации

The paper describing a curious phenomenon of short-term effect of high temperature on *Drosophilidae*, appeared in scientific press in 1962. When examining polytene chromosomes from the *Drosophila melanogaster*'s salivary glands the hyperthermia occurred to be "switching on" new genes.

It took another 15 years to demonstrate that this heat-induced phenomenon was not unique for *D. melanogaster*, as the similar phenomena were found out in birds and mammals. Now it is known, that the proteins induced by heat, or now often called as heat-shock proteins (HSP) are practically identical in all organisms, including bacteria. Of even greater significance was the discovery that several of these proteins are related: the antibodies against certain HSP recognised the similar proteins of many other evolutionary distant species. For example, the antibodies against a chicken's HSP recognise proteins from a shrimp [17].

Researchers have cloned several genes of these unusual proteins and determined their nucleotide sequence. Two groups of proteins in particular with molecular mass of 70 and 90 kDa (HSP-70 and HSP-90) are among the most highly conserved ones in nature [16]. This suggests, that HSP should accomplish a certain function, which is essential for the majority, even though for all forms of life.

Biologists discovered that such stress factors as the lack of oxygen, increase in the ion concentration

**Адрес для корреспонденции:** Релина Л.И., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720135, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Relina L.I., Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720135, fax: +38 (057) 7720135, e-mail: cryo@online.kharkov.ua.

ионов тяжелых металлов и этанола [17], а также низкие температуры (аспект, который интересует нас больше всего) [14] могут индуцировать синтез этих белков. Кроме того, было установлено, что многие организмы синтезируют белки, родственные БТШ, в нормальном физиологическом состоянии. Представители этих белковых семейств появляются во время пролиферации и дифференциации [16].

Общепринятая на данный момент гипотеза приписывает БТШ роль молекулярных шаперонов. Считают, что молекулярные шапероны обеспечивают ренатурацию белков после стрессового воздействия и убиквитин-зависимый протеолиз белков, не подлежащих ренатурации. БТШ-70 блокирует агрегацию денатурированных белков, связываясь с гидрофобными областями, которые становятся доступными при денатурации, и ускоряет АТФ-зависимую ренатурацию белков. Во время нормальных физиологических процессов молекулярные шапероны принимают участие в транспортировке белков сквозь мембраны, особенно сквозь мембраны эндоплазматического ретикула (ЭПР) и митохондрий, помогают полипептидам сворачиваться и облегчают сборку белковых комплексов [17].

Первые данные о возможной роли БТШ в механизмах холодовой устойчивости появились более 10 лет назад. Burton et al [4] показали, что экспозиция при низкой температуре вызывала синтез БТШ в слюнных железах *D. melanogaster* и что умеренный тепловой шок увеличивал выживаемость личинок после последующего воздействия холодом. Аналогичные данные были получены на мясной мухе *Sarcophaga crassipalpis*. Guy C.L. обнаружил, что тепловой шок защищает конидиоспоры *Neurospora crassa* от повреждений при замораживании [14].

Однако, несмотря на возрастающее количество работ, сообщающих об участии БТШ (или стрессовых белков) в холодовой адаптации, реакция на холод изучена не столь детально, как реакция на тепло. Эта проблема заслуживает большего внимания, и мы попытались в данной работе охватить некоторые её аспекты.

### **Роль стрессовых белков в механизмах холодоустойчивости**

Животные Арктики и Антарктики являются типичными моделями для исследования механизмов холодоустойчивости. У нототениевых рыб из Антарктики и умеренных широт методом SDS-электрофореза и Вестерн-блоттинга исследовали эндогенный уровень и количество изоформ мультигенного семейства БТШ-70. У представителя Антарктики *Trematomus bernacchii* после 22-дневной акклимации при 4-5°C уровень БТШ-70 был существенно выше по сравнению с неакклиматизированными особями, указывая на непосредственное влияние температуры на синтез БТШ.

of heavy metals and ethanol [17], as well as low temperatures (the aspect of great interest for us) [14] could induce the synthesis of these proteins. In addition, it was established that many organisms synthesised the proteins cognitive to HSP, in the normal physiological state. Representatives of these protein families appeared during proliferation and differentiation [16].

The hypothesis generally accepted now assigns a molecular chaperone role for HSP. Molecular chaperones are thought to provide the protein renaturation after stress treatment and ubiquitin-dependent proteolysis irreparable proteins. HSP-70 blocks aggregation of denaturated proteins by binding with hydrophobic areas, which are exposed at denaturation and accelerates the ATP-dependent renaturation of proteins. During normal physiological processes molecular chaperones participate in translocation of protein through the membranes, namely through the membranes of endoplasmic reticulum (EPR) and mitochondria, assist polypeptides to fold and facilitate the assembly of protein complexes [17].

The first data on a possible role of HSP in the mechanisms of cold resistance appeared more than 10 years ago. Burton V. et al. demonstrated that the exposure to low temperature resulted in HSP synthesis in *D. melanogaster*'s salivary glands and the mild moderate heat shock increased the survival of larvae after further cold effect. The similar data were obtained in *Sarcophaga crassipalpis* flesh fly. Guy C.L. found out that heat shock protected *Neurospora crassa* conidiospores against injuries at freezing [14].

However, despite the augmented number of works, reporting on the HSP (or stress proteins) participation in cold adaptation, the response to cold is not so studied in details, as the response to heat is. This problem deserves more attention and we tried to cover some of its aspects in this work.

### **Role of stress proteins in mechanisms of cold-resistance**

Arctic and Antarctic animals are the typical models for studying the cold resistance mechanisms. Endogenous level and the isoform number of the HSP-70 multigenic family were investigated using the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western-blotting methods in the notothenioid fishes from the Antarctic and moderate latitudes. In Antarctic representative *Trematomus bernacchii* acclimated to 4-5°C for 22 days the level of HSP-70 was considerably higher in comparison with the non-acclimated species, indicating a direct temperature effect on the HSP synthesis. An increased level of HSP-70 under low temperature was found myo-

Повышенный уровень БТШ-70 при низкой температуре был отмечен в ткани миокарда у японской перепелки [11].

У холодоустойчивых личинок чернотелки *Tenebrio molitor* после холодной акклимации при 4-6°C в течение 2-х недель, используя метод SDS-электрофореза, мы обнаружили новую белковую полосу с молекулярной массой 65 кДа. Эта величина позволяет предположить, что данный белок принадлежит к семейству стрессовых белков, которые функционируют как молекулярные шапероны, однако это предположение требует дальнейшей проверки. Когда насекомых возвращали в условия с температурой 20-22°C (7-дневная деакклимация), спектр белков был такой же, как и в контроле у неакклимированных личинок. Введение накануне акклимации ингибитора трансляции – циклогексимида – вызывало значительное снижение содержания белка 65 кДа, что свидетельствует о синтезе его *de novo* во время холодной акклимации. Так как, фракции гомогената из акклимированных личинок, экстрагированные этанолом или ацетоном, были обогащены белком 65 кДа, то этот белок, по-видимому, имеет обширные гидрофобные области [1]. В клетках слюнных желёз личинок *D. melanogaster* после 17-часовой экспозиции при 0°C наблюдали синтез *de novo* группы белков с молекулярными массами 70, 62, 57, 35 и 15 кДа. Этот набор белков отличен от белков, синтезируемых клетками *D. melanogaster* в ответ на тепловой шок (за исключением белка 70 кДа). На основании этого авторы [20] предполагают, что нелетальные повреждения, вызванные высокой и низкой температурами, имеют разную природу.

Cer1p – это новый родственник БТШ-70 белок, который необходим для транслокации ряда белков через ЭПР у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Он имеет ограниченное сходство аминокислотной последовательности с семейством шаперонов БТШ-70. У дикого типа в редуцирующих условиях прокарбокисептидазу Y (pro-CPY) можно обнаружить в комплексе с Cer1p, при этом частично очищенный Cer1p способен непосредственно связывать пептиды. Это позволяет предположить, что Cer1p обладает шаперонной активностью, необходимой для нормального свертывания денатурированной pro-CPY, что опосредуется прямым взаимодействием с несвернутым полипептидом. Интересно, что замещение сигнальной последовательности Cer1p-зависимого белка последовательностью из Cer1p-независимого белка не отменяет необходимость Cer1p для транспорта. Выходит, что взаимодействие со зрелым белком также важно для транслокационной функции Cer1p. Уровень мРНК белка Cer1p повышается при понижении температуры. Последствия

cardial tissue in Japanese quail [11].

In cold-resistant larvae of *Tenebrio molitor* (*Coleoptera, Tenebrionidae*), acclimated to 4-6°C for 2 weeks, using the method of SDS-electrophoresis we found out the new protein band with 65 kDa molecular mass. This value allows to suppose that this protein belongs to the family of stress proteins, functioning as molecular chaperones, but this supposition requires further testing. When animals were back under 20-22°C temperature conditions (7-day deacclimation) the protein spectrum was the similar as for the control in non-acclimated larvae. The introduction of cycloheximide translation inhibitor the day before acclimation resulted in a considerable decrease in the content of 65kDa protein, that testified to the synthesis *de novo* during cold acclimation. As the homogenate fractions from acclimated larvae, being extracted with ethanol or acetone were enriched with 65 kDa protein, this protein apparently had wide hydrophobic areas [1]. In cells of salivary glands of *D. melanogaster* larvae after the 17 hours exposure at 0°C there was observed the synthesis *de novo* of protein group with 70, 62, 57, 35, and 15 kDa molecular mass. This protein range is different from that, synthesised by *D. melanogaster*'s cells in response to heat shock (excluding 70 kDa protein). According to this author [20] there is a supposition, that non-lethal damages, caused by high and low temperatures, are of different nature.

Cer1p is a novel HSP-70-related protein that is important for the translocation of a subset of proteins into the yeast *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum. Cer1p has a very limited amino acid identity to the HSP-70 chaperone family. In wild-type yeast under reducing conditions, pro-CPY can be found in a complex with Cer1p, while partially purified Cer1p is able to bind directly to peptides. This suggests that Cer1p has chaperone activity required for proper refolding of denatured pro-CPY, which is mediated by direct interaction with the unfolded polypeptide. It is of some interest, that the replacing of the signal sequence of a CER1-dependent protein with that of a CER1-independent protein did not relieve the requirement of CER1 for import. This result suggests that an interaction with the mature portion of the protein also is important for the translocation role of Cer1p. The CER1 RNA levels increase at lower temperatures. The effects of gene deletion of this protein on folding and translocation are more severe at lower temperatures. Therefore, these results suggest that Cer1p provides an additional chaperone activity namely at low temperatures (in comparison with another members of HSP-70 family) [9].

A small heat-shock protein (smHSP), called as



делеции гена этого белка на свертывание и транслокацию более тяжелые при низких температурах. Из этого следует, что Cer1p обеспечивает дополнительную шаперонную активность именно при низких температурах (по сравнению с другими членами семейства БТШ-70) [9].

Из зрелых семян каштана *Castanea sativa* был очищен малый БТШ, названный CsHSP17.5, с шаперонной активностью. Осуществили экспрессию рекомбинантного CsHSP17.5 в *E. coli*. При переносе из 37 на 50°C (температура, вызывающая клеточный аутолиз) линии, которые накапливали CsHSP17.5, обладали повышенной жизнеспособностью по сравнению с контрольными. SDS-электрофорез клеточных лизатов позволяет предположить, что такой защитный эффект *in vivo* обусловлен способностью рекомбинантного белка сохранять растворимые цитозольные белки в их нативной конформации, при этом предполагается, что этот белок обладает малой субстратной специфичностью. Он может быть также включен в защиту клеток против холодового стресса, так как значительно повышает выживаемость клеток при температуре 4°C. Таким образом, CsHSP17.5 представляет собой пример БТШ, способных защищать клетки от обоих видов температурного стресса. Данные результаты сопоставимы с высоким уровнем индукции гомологичных транскриптов, что наблюдалось в растительных тканях побегов каштана и при высокой и при низкой температурах (но не при солевом стрессе) [19].

Клетки кортикальной паренхимы шелковицы (*Morus bombycis* Koidz.) отличаются чрезвычайно высокой устойчивостью, приобретаемой в результате сезонной холодовой акклимации. Зимой происходит значительное накопление белков 20 и 27 кДа (WAP20 и WAP27). N-концевая последовательность WAP20 обнаруживает гомологию с малыми БТШ, локализованными в ЭПР, тогда как WAP27 не гомологичен ни одному из известных белков. Подобно другим малым БТШ, WAP20 формирует высокомолекулярные комплексы при нативном электрофорезе. Более того, с антителами на WAP20 реагируют и белки 21 кДа. Накопление значительных количеств малых БТШ в ЭПР в период сезонной холодовой акклимации указывает на то, что эти белки могут играть важную роль в приобретённой холодоустойчивости клеток шелковицы [22].

У холодочувствительных томатов при низких незамораживающих температурах экспрессируется 11 из 15 известных шаперонов семейства БТШ-70. У шпината при такой же температуре обнаружены лишь некоторые из 10 членов этого семейства. Явление увеличения экспрессии шаперонов сопоставимо с гипотезой, что биогенез и/или стабильность некоторых белков нарушается при низких незамораживающих температурах. При этом умеренные замораживающие температуры, вызывающие

CsHSP17.5 with chaperone activity was purified from mature chestnut (*Castanea sativa*) cotyledons. Recombinant CsHSP17.5 was overexpressed in *Escherichia coli*. Upon transfer from 37 to 50°C (the temperature, causing cell autolysis) those cells that accumulated CsHSP17.5 showed improved viability compared with control cultures. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of cell lysates suggested that such a protective effect *in vivo* is due to the ability of recombinant protein to maintain soluble cytosolic proteins in their native conformation, with little substrate specificity. It can be also involved in cell protection against cold stress, as it considerably increases cell survival at the temperature of 4°C. Thus, CsHSP17.5 represents the HSP example, capable to protect cells against both types of temperature stress. These results are comparable with high level of homologous transcript induction, that was observed in vegetative tissues of chestnut plantlets exposed to both types of thermal stress but not salt stress [19].

Cortical parenchyma cells of mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) trees acquire extremely high freezing tolerance in winter as a result of seasonal cold acclimation. In winter a considerable accumulation of 20 and 27 kDa (WAP20 and WAP27) occurred. The N-terminal amino acid sequence of WAP20 exhibited homology to endoplasmic reticulum-localized smHSP, whereas that of WAP27 did not exhibit homology to any known proteins. Like other smHSP, WAP20 formed a complex of high molecular mass in native-polyacrylamide gel electrophoresis. Furthermore, not only WAP20 but also 21 kDa proteins reacted with antibodies against WAP20. The accumulation of a large quantity of smHSP in the endoplasmic reticulum in winter as a result of seasonal cold acclimation indicates that these proteins may play a significant role in the acquisition of freezing tolerance in cortical parenchyma cells of mulberry trees [22].

In cold-sensitive tomatoes at the low non-freezing temperatures 11 of 15 known chaperones of HSP-70 family are expressed. In spinach at the same temperature there were revealed only some of 10 members of this family. The increased chaperone expression is consistent with the hypothesis that the biogenesis and/or stability of some proteins are compromised at low non-freezing temperatures. In contrast, mild freezing sufficient to cause injury of spinach did not practically affect the chaperone expression [15].

There are the data, which testify to the existence of different protein patterns synthesised at high and low temperatures. Trigger factor (TF) in *E. coli* is a molecular chaperone with remarkable properties: it has prolyl-isomerase activity, associates with nascent

повреждения у шпината, практически не влияли на экспрессию шаперонов [15].

Имеются данные, которые свидетельствуют о существовании различных белков, синтезируемых при высоких и низких температурах. Триггерный фактор (ТФ) *E. coli* является молекулярным шапероном: он обладает пропил-изомеразной активностью, присоединяется к рождающимся на рибосомах белкам, связывается с GroEL (другой шаперон *E. coli*), увеличивая его сродство к несвёрнутым белкам и ускоряя деградацию определенных полипептидов. Поскольку последний эффект ярче проявляется при 20°C, Kandror O. с соавт. [13] исследовали влияние температуры на экспрессию ТФ. В отличие от большинства шаперонов (таких как GroEL), которые являются БТШ, уровень ТФ прогрессивно нарастает при снижении температуры от 42 до 16°C и даже возрастает при хранении клеток при 4°C. Синтез ТФ индуцируется при температурном сдвиге от 37 до 10°C при инкубации с хлорамфениколом, что характерно для большинства белков холодового шока. Исследователи проверили, важна ли экспрессия ТФ для жизнеспособности при низких температурах. В условиях хранения при 4°C у *E. coli* отмечено экспоненциальное снижение жизнеспособности. Клетки со сниженным содержанием ТФ умирают быстрее, тогда как клетки с его повышенным содержанием характеризуются большей жизнеспособностью. Несмотря на то, что дополнительная продукция ТФ защищает от холода, она же снижает жизнеспособность при 50°C, в то время как дефицит ТФ увеличивает жизнеспособность при этой температуре. В противоположность этому сверхпродукция GroEL/ES или БТШ в целом имеет защитный эффект при высоких температурах и снижает жизнеспособность при 4°C, что, возможно, объясняет подавление синтеза БТШ на холоде. Таким образом, ТФ представляет собой образец белков *E. coli*, которые защищают клетки при понижении температуры. Дифференциальная индукция ТФ при низких температурах и БТШ при высоких, по-видимому, свидетельствует о существовании селективных механизмов, защищающих от противоположных экстремальных температур.

БТШ ClpB важен для приобретения термоустойчивости у цианобактерий и эукариот и принадлежит к группе, включающей разнообразные полипептиды, которые функционируют как молекулярные шапероны. Porankiewicz J. с соавт. [18] показал, что ClpB интенсивно синтезируется при умеренном холодовом стрессе у одноклеточной цианобактерии *Synechococcus sp.* линия PCC 7942. Если клетки акклиматизировать в течение 24 ч и более при 25°C (оптимальная температура роста 37°C), содержание ClpB (92 кДа) возрастает в 5 раз. Соответствующее увеличение содержания наблюдается и для БТШ ClpB 78 кДа,

polypeptides on ribosomes, binds to GroEL (other *E. coli* chaperones), and enhances its affinity for unfolded proteins, and promotes degradation of certain polypeptides. Because the latter effect appeared larger at 20°C, Kandror O. et al. [13] studied the influence of temperature on TF expression. Unlike most chaperones (e.g., GroEL), which are heat-shock proteins, TF level increased progressively as growth temperature decreased from 42 to 16°C and even rose in cells stored at 4°C. Upon temperature downshift from 37 to 10°C or exposure to chloramphenicol, TF synthesis was induced, like that of many cold-shock proteins. The researchers therefore tested if TF expression might be important for viability at low temperatures. When stored at 4°C, *E. coli* loses viability at exponential rates. Cells with reduced TF content die faster, while cells overexpressing TF showed greater viability. Although TF overproduction protected against cold, it reduced viability at 50°C, while TF deficiency enhanced viability at this temperature. By contrast, overproduction of GroEL/ES, or HSP generally, had protective effect against high temperatures and reduced viability at 4°C, which may explain why expression of HSP is suppressed in the cold. Thus, TF represents an example of an *E. coli* protein, which protects cells against low temperatures. Differential induction of TF at low temperatures and HSP at high temperatures appears to provide selective protection against these opposite thermal extremes.

The heat-shock protein ClpB is essential for acquired thermotolerance in cyanobacteria and eukaryotes and belongs to a diverse group of polypeptides, which function as molecular chaperones. Porankiewicz J. et al. [18] showed that ClpB was also strongly induced during moderate cold stress in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7942. A fivefold increase in ClpB (92 kDa) content occurred when cells were acclimated to 25°C over 24 h after being shifted from the optimal growth temperature of 37°C. A corresponding increase occurred for the ClpB' HSP (78 kDa), which arises from a second translational start within the clpB gene of prokaryotes. Shifts to more extreme cold (i.e. 20 and 15°C) progressively decreased the level of ClpB induction, presumably due to retardation of protein synthesis within this relatively cold-sensitive strain. Inactivation of clpB in *Synechococcus sp.* increased the extent of inhibition of photosynthesis upon the shift to 25°C and markedly reduced the mutant's ability to acclimate to the new temperature regime, with a threefold drop in growth rate. Furthermore, around 30% fewer delta clpB cells survived the shift to 25°C after 24 h compared to the wild type. The majority of mutant cells were also arrested during cell division

получаемого при втором старте трансляции, который имеется у прокариотического гена *clpB*. Сдвиг в сторону еще более низкой температуры (т.е. 20 и 15°C) ведет к прогрессивному снижению индукции *clpB*, что, как предполагают, обусловлено замедлением синтеза белка у этой относительно холодоустойчивой линии. Инактивация *clpB* у *Synechococcus sp.* увеличивает степень ингибирования фотосинтеза при температурном сдвиге до 25°C и существенно снижает способность мутантных клеток акклиматизироваться к новому температурному режиму, при этом происходит 3-кратное снижение скорости роста. После 24 - часовой экспозиции при 25°C выживает на 30 % меньше клеток, несущих мутацию гена *clpB*, по сравнению с диким типом. Большому количеству мутантных клеток свойственна также задержка деления при 25°C, при этом они остаются соединенными после формирования перегородки. Оценка холодоустойчивости по выживаемости клеток ясно продемонстрировала, что клетки дикого типа способны приобретать значительную устойчивость к непермиссивной температуре 15°C, будучи предварительно акклиматизированы при 25°C. Такой же уровень холодоустойчивости, однако, характерен и для мутантной линии, что указывает на то, что индукция *clpB* не является необходимой для этой формы устойчивости у *Synechococcus sp.* В целом эти результаты свидетельствуют, что индукция *clpB* вносит существенный вклад в процесс акклиматизации цианобактерий к пермиссивным низким температурам.

Представители семейства белков холодового шока (БХШ) обнаружены у многих эубактерий. Полагают, что белки действуют, как РНК-шапероны, препятствуя сворачиванию РНК во вторичную структуру [23]. Они участвуют в различных клеточных процессах, включая адаптацию к низким температурам, рост клеток, стационарную фазу и др.

В БХШ открыт домен – домен холодового шока, - который обнаруживает удивительно высокую гомологию и сходные РНК-связывающие свойства со все более многочисленным рядом эукариотических белков, способных связывать нуклеиновые кислоты, что указывает на древнее происхождение этих белков [7].

Подобно другим бактериям, *Bacillus subtilis* обладает семейством гомологичных малых кислых белков (CspB, CspC и CspD, идентичность >70%), которые интенсивно индуцируются в ответ на холодовой шок. Graumann P. с соавт. [8] показал, что делеция в генах *cspC* или *cspD* фенотипически не проявляется, тогда как двойные мутанты характеризуются серьезной задержкой клеточного роста как при 15, так и при 37°C, включая сниженную выживаемость во время стационарной фазы. Двумерный электрофорез подтвердил, что у двойных мутантов нарушена регуляция синтеза белка и что потеря одного или двух БХШ приводила к возраста-

at 25°C, remaining attached after septum formation. Development of a cold thermotolerance assay based on cell survival clearly demonstrated that wild-type cells could acquire substantial resistance to the nonpermissive temperature of 15°C by being pre-exposed to 25°C. The same level of cold thermotolerance, however, occurred in the delta *clpB* strain, indicating *clpB* induction is not necessary for this form of thermal resistance in *Synechococcus spp.* Overall, these results demonstrate that the induction of *clpB* contributes significantly to the acclimation process of cyano-bacteria to permissive low temperatures.

Members of a family of cold-shock proteins (CSP) are found throughout the eubacterial domain. It is believed that these proteins act as RNA chaperones, thereby reducing the increased secondary folding of RNA [23]. They have been implicated in various cellular processes, including adaptation to low temperatures, cellular growth, stationary phase etc.

The discovery in CSP of a domain: the cold-shock domain, that shows strikingly high homology and similar RNA-binding properties to a growing number of eukaryotic nucleic-acid-binding proteins suggests that these proteins have an ancient origin [7].

Like other bacteria, *Bacillus subtilis* possesses a family of homologous small acidic proteins (CspB, CspC and CspD, identity >70%) that are strongly induced in response to cold shock. Graumann P.L. et al. [8] showed that deletion of *cspC* or *cspD* genes did not result in a detectable phenotype; in contrast, CSP double mutants exhibited severe reduction in cellular growth both at 15 and 37°C, including impairment of survival during the stationary phase. Two-dimensional gel analysis showed that protein synthesis was deregulated in CSP double mutants and that the loss of one or two CSP led to an increase in the synthesis of the remaining CSP(s) at 37°C and after cold shock. Consequently we can suggest that CSPs down-regulate production of members from this protein family. A *cspB/C/D* triple mutant (64BCD<sub>bt</sub>) could only be generated in the presence of *cspB* in trans on a plasmid, indicating that a minimum of one CSP gene is essential for viability of *B. subtilis*. After cold shock, synthesis of CspB in 64BCD<sub>bt</sub> was drastically lower than in wild-type cells accompanied by cessation in growth and strong reduction in general protein synthesis. As CspB, CspC and CspD are shown to bind to RNA in a cooperative and interactive manner, CSPs are suggested to function as RNA chaperones facilitating the initiation of translation under optimal and low temperatures.

CspA, the major cold-shock protein of *E. coli*, is an RNA chaperone, which is thought to facilitate



нию синтеза оставшихся БХШ при 37°C и после холодого шока. Следовательно, можно предположить, что БХШ регулируют продукцию членов собственного семейства. Тройные мутанты по генам *cspB/C/D* могут существовать только при наличии плазмиды, несущей ген *cspB*, что указывает на необходимость, по крайней мере, одного гена БХШ для жизнеспособности *B. subtilis*. После холодого шока синтез *CspB* у тройного мутанта был гораздо ниже по сравнению с диким типом, что сопровождалось остановкой роста и сильной редукцией общего синтеза белка. Поскольку связывание *CspB*, *CspC*, *CspD* с РНК носит кооперативный характер, предполагают, что БХШ функционируют РНК шапероны, облегчая индукцию трансляции при оптимальных и низких температурах.

*CspA*, основной БХШ *E. coli*, является РНК-шапероном, который облегчает трансляцию при низких температурах, дестабилизируя структуру мРНК. Аминокислотная последовательность *CspA* на 43% идентична “домену холодого шока” эукариотического семейства Y-box белков, которые взаимодействуют с РНК и ДНК, регулируя их функции. Jiang W. и соавт. [12] продемонстрировал, что *CspA* взаимодействует с РНК как шаперон. *CspA* кооперативно связывается термоденатурированной одонитевой РНК, если ее длина больше 74 оснований. Минимально необходимая для этого концентрация *CspA* более чем на порядок ниже измеренной внутриклеточной концентрации после холодого шока. *CspA* не требуется никаких специфических последовательностей РНК для связывания. Когда 5'-нетранслируемая область мРНК была использована в качестве субстрата для рибонуклеаз, добавление *CspA* существенно стимулировало гидролиз РНК, предотвращая формирование устойчивых к действию РНКаз стабильных вторичных структур в 5'-нетранслируемой области. Эти результаты указывают на то, что связывание *CspA* с РНК дестабилизирует вторичную структуру РНК, делая ее чувствительной к действию РНКаз. Такая функция, возможно, является ключевой для эффективной трансляции мРНК при низких температурах и может также оказывать влияние на транскрипцию.

Вае W. и соавт. [3] показали, что *CspA*, так же как и гомологичные шапероны *CspE* и *CspC*, являются антитерминаторами транскрипции. Добавление *in vitro* физиологических концентраций рекомбинантных *CspA*, *CspE* или *CspC* снижало терминацию транскрипции на нескольких терминаторах, а также уменьшало паузы в транскрипции. Известно, что гены *nusA*, *rbfB*, *pnpA* и ряд других включаются при холодом шоке. Авторы считают, что “включение” этих генов при низких температурах происходит в результате антитерминации транскрипции, которая

translation at low temperature by destabilising mRNA structures. The amino acid sequence of *CspA* shows 43% identity to the “cold-shock domain” of the eukaryotic Y-box protein family, which interacts with RNA and DNA to regulate their functions. Jiang W. [12] demonstrated that *cspA* bound to RNA as a chaperone. *CspA* co-operatively binds to heat-denatured single-stranded RNA if it is larger than 74 bases. A minimal concentration of *CspA* is sufficiently lower than the estimated cellular concentration after cold shock. No specific RNA sequences for *CspA* binding were identified. When the 5'-untranslated region of the *CspA* mRNA was used as a substrate for ribonucleases, the addition of *CspA* significantly stimulated RNA hydrolysis by preventing the formation of RNase-resistant bands due to stable secondary structures in the 5'-untranslated region. These results indicate that binding of *CspA* to RNA destabilises RNA secondary structures to make them susceptible to ribonucleases. Such a function may be crucial for efficient translation of mRNAs at low temperatures and may also have an effect on transcription.

Bae W. et al. [3] demonstrated that *CspA*, as well as homologous chaperones *CspE* and *CspC*, are transcription antiterminators. *In vitro*, the addition of physiological concentrations of recombinant *CspA*, *CspE*, or *CspC* decreased transcription termination at several intrinsic terminators and also decreased transcription pausing. The genes of *nusA*, *rbfB*, *pnpA* and some others are known to be induced at cold shock. The authors think, that these genes “triggering” to cold occurs through transcription antitermination, which is mediated by *CspA* and other CSP.

One more family of evolutionary conservative proteins, found out practically in all organisms, which accomplishes the molecular chaperone functions, is cyclophilins [2]. These proteins possess the peptidyl-prolyl isomerase activity, which is necessary for protein folding *in vivo*. For example, a mitochondrial cyclophilin is an integral part of the mitochondrial transmitter complex, which is considered is a key component in cell death mechanisms. Recently it has been shown that the expression of some cyclophilins increases under various stress effects. Important role in the processes of cell apoptosis and necrosis is assigned to this group of proteins.

The attempts to manifest chaperone activity of the stress proteins in the model systems, such as isolated enzymes, tissues and organs, were undertaken.

The guanidine-induced unfolding of firefly (*Photinus pyralis*) luciferase involves two inactive equilibrium intermediates and is freely reversible at

опосредуется CspA и другими БХШ.

Ещё одно семейство эволюционно консервативных белков, обнаруженное практически у всех организмов, выполняет функции молекулярных шаперонов – циклофилины [2]. Эти белки обладают пептидил-пролил-изомеразной активностью, которая необходима для сворачивания белков *in vivo*. Например, митохондриальный циклофилин является интегральной частью комплекса митохондриальных переносчиков, который считается ключевым компонентом в механизмах клеточной смерти. Недавно было показано, что экспрессия некоторых циклофилинов повышается при различных стрессовых воздействиях. Этой группе белков отводится важная роль в процессах апоптоза и некроза клеток.

Предпринимаются попытки оценить шаперонную активность стрессовых белков в таких модельных системах, как изолированные ферменты, ткани и органы.

Гуанидин-индуцированное разворачивание люциферазы светляка *Photinus pyralis* вовлекает 2 неактивных равновесных интермедиата и является обратимым при низких концентрациях белка и низкой температуре. Однако реактивация происходит чрезвычайно медленно и равновесие наступает только после 7 дней инкубации, кроме того, реактивация сильно замедляется при увеличении концентрации белка, что свидетельствует об агрегации как конкурирующей реакции. Herbst R. и соавт. [10] исследовали роль промежуточных продуктов в процессе агрегации для того, чтобы определить их ассоциацию. Реактивные интермедиаты способны к быстрой реактивации в присутствии клеточных экстрактов. По-видимому, существует кинетическая ловушка при сворачивании люциферазы при низкой температуре, которая достигается при особых равновесных конформациях интермедиатов и которой можно избежать в присутствии молекулярных шаперонов, что подтверждается данными кругового дихроизма и флюоресценции.

### **Возможные направления развития исследований молекулярных шаперонов**

Молекулярные шапероны могут быть полезны при консервации органов для трансплантации. Было показано, что избыточная продукция БТШ-72 обеспечивает защиту от ишемии сердца. Gowda A. et al [6] исследовали способность крыс, подвергнутых тепловому шоку с 6-часовым периодом восстановления, приобретать защиту при последующем хранении сердца при 4°C в течение 12 часов. Были изучены 3 группы животных – контрольные и подвергнутые ложному и настоящему тепловому шоку. После ишемии на холоде сердца реперфузировали, после чего измеряли функцию сердца и утечку лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Сердца животных после теплового шока имели гораздо лучшие

low protein concentration and low temperature. However, reactivation is exceedingly slow so that the equilibrium is attained only after 7 days of incubation and reactivation yields decrease strongly with increasing protein concentration, suggesting that aggregation is a competing side reaction. Herbst R. et al [10] investigated the role of the equilibrium intermediates in the aggregation process to monitor their association state. Reactive intermediates are capable to high reactivation in the presence of cellular extracts. Apparently, there is a kinetic trap in luciferase refolding at low temperatures that is accessible from both equilibrium intermediate conformations and is avoided in the presence of molecular chaperones, that is confirmed by the data of circular dichroism and fluorescence.

### **Possible directions of further studies on molecular chaperones**

Molecular chaperones can be useful in organ preservation procedures for transplantation. It has been shown that overexpression of HSP-72 provides protection against ischemic cardiac damage. Gowda A. et al. [6] sought to determine whether rats subjected to heat stress with only 6-hour recovery could acquire protection to a subsequent heart storage for 12 hours at 4°C. The following three groups of animals were studied: the control, sham-treated, and heat-shocked rats. After cold ischemia hearts were reperfused, after that the heart function and lactate dehydrogenase (LDG) leakage were measured. Heat-shocked animals' hearts showed much better indices of heart rate, of left ventricular pressure and rate of its change in comparison with the control and pseudotreated animals. Diastolic compliance and lactate dehydrogenase release were improved in heat-shocked animals. Western blot experiments confirmed increased HSP-72 levels in heat-shocked animals (>threefold) compared with sham-treated animals and controls. Heat shock 6 hours before heart removal resulted in marked expression of HSP-72 and protected isolated rat hearts by increased functional recovery and decreased cellular necrosis after 12-hour cold ischemia in a protocol mimicking that of heart preservation for transplantation. Endothelial activation is a central feature of preservation-induced allograft injury. Human umbilical vein endothelial cells were exposed to cold, under hypoxic conditions in histidine-tryptophane-ketoglutarate (HTK), and EuroCollins solutions for 8 h with subsequent rewarming/reoxygenation (rew/reox) for 1 and 4 h. A cell-based ELISA was designed for detection of HSP-60 and HSP-70. HSP-70 was expressed after cold storage in HTK and EuroCollins solutions and after rew/reox in all groups. A constitutive



показатели частоты сердечных сокращений, давления в левом желудочке и скорости его изменения по сравнению с контролем и ложно обработанными животными. Параметры диастолического расслабления желудочков и утечки ЛДГ также были лучше у особей после теплового шока. Методом Вестерн-блоттинга было подтверждено, что уровень БТШ-72 у животных после теплового шока был в 3 раза выше по сравнению с двумя другими группами. Шести-часовой тепловой шок перед извлечением сердца вызывал усиленную экспрессию БТШ-72 и защищал сердца крыс, судя по функциональным показателям, а также уменьшал клеточный некроз после 12-часовой холодовой ишемии в процедуре, имитирующей консервацию сердца для трансплантации. Эндотелиальная активация – центральная проблема при индуцированном консервацией повреждении аллотрансплантатов. Эндотелиальные клетки umbilicalной вены человека хранили на холоде в условиях гипоксии в течение 8 ч в растворах Eugocollins и гистидин-триптофан-кетоглутарат с последующим отогревом-реоксигенацией в течение 1 и 4 часов. Для определения БТШ-60 и БТШ-70 использовали иммуоферментный метод. БТШ-70 экспрессировался после хранения на холоде в обоих растворах и после отогрева-реоксигенации во всех группах. Конститутивную экспрессию БТШ-60 наблюдали после отогрева-реоксигенации также во всех экспериментальных группах. Экспрессия стрессовых белков может быть предложена как новый параметр при оценке эндотелиальной активации, вызванной консервацией [5].

Индуцированные температурой онтогенетические аномалии представляют собой огромное поле для защитного действия молекулярных шаперонов. У имаго дрозофилы наблюдается целый ряд дефектов, если куколки были подвергнуты действию высоких температур. Этот феномен не ограничивается только классом насекомых. Онтогенетические аномалии, индуцированные теплом и химикатами, достаточно хорошо изучены на эмбрионах птиц и млекопитающих [16]. Низкие температуры могут также вызывать сходные дефекты. В зависимости от температуры и длительности экспозиции на холоде был получен спектр дефектов развития у совки *Mamesta configurata*, включающий гибель на стадии куколки в период диапаузы, гибель после выхода из диапаузы, неполную линьку, дефекты развития имаго, задержки развития [21]. Тератогенные агенты также индуцируют синтез стрессовых белков. Можно предположить существование прямой связи между этими явлениями. Сильный тепловой шок у куколок дрозофилы приводит к разобщению в белковом синтезе, за которым следует дискоординация экспрессии генов. У насекомых, которые предварительно были подвергнуты умеренному тепловому шоку, синтез белка восстанавливался гораздо быстрее, как и координация

expression of HSP60 was observed with further upregulation after rew/reox following cold storage in all experimental groups. Expression of stress proteins can be proposed as a new parameter of preservation-associated endothelial activation [5].

Another field for protective actions of molecular chaperones is the temperature-induced developmental anomalies. A broad range of defects was observable in adult *Drosophila* when their pupae had been subjected to high temperature effect. This phenomenon is not limited to insects. Developmental anomalies induced by heat and chemicals have been extensively studied in avian and mammal embryos [16]. Low temperatures can also cause similar effects. Depending on the temperature and duration of exposure to cold, there was a continuum of effects in the bertha armyworm *Mamesta configurata* ranging from death during the diapause stage (pupae), death during post-diapause development, incomplete ecdysis, malformation of emerged adults, to delayed emergence [21]. Agents that are teratogenic also induce the synthesis of stress proteins. One can assume a direct connection between the two phenomena. Severe heat shock in the fruit fly pupae resulted in disruption of protein synthesis followed by discoordination of gene expression. In insects that have been given a mild pre-shock, protein synthesis recovered much more rapidly, as well as the co-ordination between these two processes. Similar results were obtained for mice and rats. In rat embryos, a mild pre-treatment has been shown to induce the synthesis of HSP-71 and HSP-83 in cells of the neural plate (which are heat-sensitive), to prevent such neural tube defects as microcephaly, anencephaly and spina bifida and to greatly enhance the recovery of normal protein synthesis [16]. It would be reasonable to presume that molecular chaperones are also able to prevent cold-induced developmental defects.

Protective abilities of chaperones suggest the possibility of their utilisation in protective media for hypothermic and cryogenic storage of biological material. That is why one can expect the expansion of investigations of the stress protein effect on the biological material safety.

Prevention of developmental anomalies using stress proteins can serve as an apt model for investigating the genetic apparatus functioning under stressful conditions. Determining the specific causes of cold-induced lethality and injuries and elucidating the molecular mechanisms of protection are not easy, especially because these phenomena are likely to vary from cell to cell. “Dead cells, like dead men, tell no tales”,- said S. Lindquist [16]. The molecular mechanisms of defect induction are more amenable to analysis. Tissues involved in defect induction

между этими двумя процессами. Подобные результаты были получены на мышах и крысах. Было показано, что мягкая предварительная гипертермия эмбрионов крыс индуцирует синтез БТШ-71 и БТШ-83 в клетках нервной пластинки (которые являются термочувствительными), что предотвращает такие дефекты нервной трубки, как микроцефалия, анэнцефалия и расщелина позвоночника, и существенно ускоряет восстановление нормального синтеза белка [16]. Есть основания предполагать, что молекулярные шапероны также способны предотвращать онтогенетические дефекты, вызванные действием низких температур.

Защитные свойства шаперонов наталкивают на мысль об их использовании в средах для гипотермического и криогенного хранения биоматериала. Поэтому можно ожидать расширения исследования действия стрессовых белков на сохранность биоматериала.

Предотвращение онтогенетических аномалий с помощью стрессовых белков может служить адекватной моделью для исследования функционирования генетического аппарата в стрессовых условиях. Выяснение специфических причин гибели и повреждений, вызванных в результате холодового воздействия, и защитных механизмов действия на молекулярном уровне является трудной задачей, особенно если принять во внимание высокую вариабельность этих явлений от клетки к клетке. Как сказала Lindquist S.: “Мертвые клетки, как и мертвые люди, ничего не расскажут” [16]. Молекулярные механизмы индукции аномалий более доступны для анализа. Ткани, вовлеченные в индукцию аномалий, продолжают расти и развиваться и могут быть детально исследованы.

В центре исследования по-прежнему остается механизм индукции синтеза молекулярных шаперонов. Кроме изучения подробностей регуляции в отдельных системах, важно определить, насколько эти механизмы похожи у разных видов. Решение этой проблемы, несомненно, приведет к более глубокому пониманию того, как клетки справляются с неоптимальными условиями внешней среды, включая не только изменения температуры, но и другие виды стрессов.

Прояснение каждой ступени “включения” и “выключения” генов стрессовых белков может дать более глубокие знания о работе генома в целом.

Универсальность ответа и консервативность индуцибельных генов поднимают вопрос о происхождении молекулярных шаперонов. Возникли ли они однажды, оставались ли их структура и функции практически неизменными в течение миллионов лет? Или они появлялись многократно у различных видов и представляют собой прекрасный образец конвергенции на молекулярном уровне?

Таким образом, со времени открытия молекулярных шаперонов достигнут огромный прогресс в

continue their growth and development, and can be analysed in details.

The induction mechanism of the molecular chaperone synthesis remains to be the central point of the investigation. Besides learning the details of regulation in particular systems, it is important to determine how similar the mechanisms are in diverse species. An understanding of this problem will undoubtedly lead to a better understanding of the fact how the cells can cope with less optimal conditions, including not only the changes in temperature, but another kinds of stress as well.

The elucidation of each stage of “switching on” and “switching off” of stress protein genes can provide more profound knowledge on the genome work on the whole.

The universality of the response and the conservatism of the inducible genes arouse the questions of molecular chaperon origin. Did they arise only once and retain their structure and functions almost unchangeable for millions years? Or did they appear many times in diverse species, and so that is an excellent example of convergence on the molecular level?

Thus, the great progress has been made since the discovery of molecular chaperons was done. Much remains to be done.

## References

1. Gulevsky A.K., Ryazantsev V.V., Grischenkova E.A., Relina L.I. Changes in protein spectrum of *Tenebrio molitor* larvae during cold acclimation // Problems of cryobiology. – 1995. – N4. – P.29-32.
2. Andreeva L., Heads R., Green C.J. Cyclophilins and their possible role in the stress response // Int. J. Exp. Pathol. – 1999. – Vol. 6. – P. 305-315.
3. Bae W., Xia B., Inouye M., Severinov K. Escherichia coli CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – N5. – P. 7784-7789.
4. Burton V., Mitchell H. K., Young P., Petersen N.S. Heat shock protection against cold stress of *Drosophila melanogaster* // Mol. Cell. Biol. – 1988. – N11. – P. 3550-3552.
5. Eberl T., Amberger A., Herold M. et al. Expression of stress proteins, adhesion molecules, and interleukin-8 in endothelial cells after preservation and reoxygenation // Cryobiology. – 1999. – Vol. 38. – P. 106-118.
6. Gowda A., Yang C., Asimakis G.K. et al. Heat shock improves recovery and provides protection against global ischemia after hypothermic storage // Ann. Thorac. Surg. – 1998. – Vol.66. – P. 1991-1997.
7. Graumann P.L., Marahiel M.A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain // Trends Biochem. Sci. – 1998. – Vol. 23. – P. 286-290.
8. Graumann P., Wendrich T.M., Weber M.H. et al. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures // Mol. Microbiol. – 1997. – Vol. 25. – P. 741-756.
9. Hamilton T.G., Norris T.B., Tsuruda P.R., Flynn G.C. Cer1p functions as a molecular chaperone in the endoplasmic

выяснении механизмов регуляции их экспрессии и функционирования. Еще больше проблем ждут своего решения.

### Литература

1. Гулевский А.К., Рязанцев В.В., Грищенко Е.А., Релина Л.И. Изменения в спектре белков личинок *Tenebrio molitor* во время холодной акклимации // Пробл. криобиологии.– 1995.– № 4. – С. 29-32.
2. Andreeva L, Heads R., Green C.J. Cyclophilins and their possible role in the stress response // Int. J. Exp. Pathol.– 1999.– Vol. 6.– P. 305-315.
3. Bae W., Xia B., Inouye M., Severinov K. Escherichia coli CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2000.– N5.– P. 7784-7789.
4. Burton V., Mitchell H. K, Young P, Petersen N.S. Heat shock protection against cold stress of *Drosophila melanogaster* // Mol. Cell. Biol.– 1988.– Vol. 11.– P. 3550-3552.
5. Eberl T., Amberger A., Herold M. et al. Expression of stress proteins, adhesion molecules, and interleukin-8 in endothelial cells after preservation and reoxygenation // Cryobiology. – 1999.– Vol. 38.– P. 106-118.
6. Gowda A., Yang C., Asimakis G.K. et al. Heat shock improves recovery and provides protection against global ischemia after hypothermic storage // Ann. Thorac. Surg.– 1998.– Vol.66.– P. 1991-1997.
7. Graumann P.L., Marahiel M.A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain // Trends Biochem. Sci.– 1998.– Vol. 23. – P. 286-290.
8. Graumann P., Wendrich T.M., Weber M.H. et al A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures // Mol. Microbiol. – 1997.– Vol. 25. – P. 741-756.
9. Hamilton T.G., Norris T.B., Tsuruda P.R., Flynn G.C. Cer1p functions as a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Cell. Biol.– 1999.– Vol. 19.– P. 5298-5307
10. Herbst R., Gast K., Seckler R. Folding of firefly (*Photinus pyralis*) luciferase: aggregation and reactivation of unfolding inter-mediate // Biochemistry. – 1998.– Vol. 37.– P. 6586-6597.
11. Hofmann G.E., Buckley B.A., Airaksinen S. et al. Heat-shock protein expression is absent in the antarctic fish *Trematomus bernacchii* // J. Exp. Biol.– 2000.– Vol. 203.– P. 2331-2339.
12. Jiang W., Hou Y., Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone // J. Biol. Chem.– 1997.– Vol. 3.– P. 196-202.
13. Kandrор O, Goldberg A.L. Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1997.– N 13.– P. 4978-4981.
14. Lee R. E. Insect cold-hardiness: to freeze or not to freeze? How insects survive low temperatures // BioScience.– 1990.– N 39.– P. 308-313.
15. Li Q.B., Haskell D.W., Guy C.L. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato // Plant. Mol. Biol. – 1999. – N 39. – P. 21-34.
16. Lindquist S. The heat shock response // Ann. Rev. Biochem.– 1986.– N 55.– P. 1151-1191.
17. Miller D. Heat-shock proteins to the rescue // New Scientist.– 1989.– N1.– P. 47-50
18. Porankiewicz J., Clarke A.K. Induction of the heat shock protein ClpB affects cold acclimation in the cyanobacterium *Synecho-coccus* sp. strain PCC 7942 // J. Bacteriol.– 1997. – Vol. 179. – P. 5111-5117.
19. Soto A., Allona I., Collada C. et al. Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress // Plant Physiol. – 1999. – Vol. 120. – P. 521-528.
20. Tsutsaeva A. A., Sevryukova L. G. Effect of cold exposure on survival and stress protein expression of *Drosophila melanogaster* at different development stages // Cryo Letters.– 2001. – Vol. 22. – P. 145-150.
21. Turnock W. J., Lamb R. J., Bodnaryk R. P. Effect of cold stress during pupal diapause on the survival and development of *Mamesta configurata* (*Lepidoptera: Noctuidae*) // Oecologia. – 1983.– Vol. 63.– P. 185-192.
22. Ukaji N., Kuwabara C., Takezawa D. et al. Accumulation of small heat-shock protein homologs in the endoplasmic reticulum of cortical parenchyma cells in mulberry in association with seasonal cold acclimation // Plant. Physiol. – 1999.– Vol. 120. – P. 481-490.
23. Wouters J.A., Rombouts F.M., Kuipers O.P. et al. The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria // Syst. Appl. Microbiol. – 2000.– Vol. 23.– P. 165-173.

Accepted in 2.07.2002



19. Soto A., Allona I., Collada C. et al. Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress // Plant Physiol. – 1999. – Vol. 120. – P. 521-528.
20. Tsutsaeva A. A., Sevryukova L. G. Effect of cold exposure on survival and stress protein expression of *Drosophila melanogaster* at different development stages // Cryo Letters. – 2001. – Vol. 22. – P. 145-150.
21. Turnock W. J., Lamb R. J., Bodnaryk R. P. Effect of cold stress during pupal diapause on the survival and development of *Mamesta configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) // Oecologia. – 1983. – Vol. 63. – P. 185-192.
22. Ukaji N., Kuwabara C., Takezawa D. et al. Accumulation of small heat-shock protein homologs in the endoplasmic reticulum of cortical parenchyma cells in mulberry in association with seasonal cold acclimation // Plant. Physiol. – 1999. – Vol. 120. – P. 481-490.
23. Wouters J.A., Rombouts F.M., Kuipers O.P. et al. The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria // Syst. Appl. Microbiol. – 2000. – Vol. 23. – P. 165-173.

Поступила 2.07.2002