

ВОСПРИЯТИЕ СТРЕССОВЫХ СИГНАЛОВ БИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ

Д. А. Лось

*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии Наук, ИФР РАН, ул. Ботаническая, 35, 127276 Москва
Тел./факс: 095-977-93-72, эл. почта: losda@ippras.ru*

Холоднокровные организмы часто испытывают изменения параметров окружающей среды, и их способность к выживанию напрямую зависит от адаптационных способностей. Перепады температур и осмоларности внешней среды вызывают изменения в текучести клеточных мембран. Эти изменения являются необходимыми для запуска ответа на стрессовые воздействия, что в конечном итоге и обеспечивает адаптацию. Молекулярные механизмы, отвечающие за восприятие изменения текучести мембран, пока полностью не охарактеризованы. Тем не менее применение новых подходов – метода мутагенеза, направленного на изменение текучести мембран, и анализ экспрессии целого генома с помощью ДНК-микрочипов – позволили значительно продвинуться в понимании механизмов регуляции текучести мембран и идентификации сенсоров, воспринимающих сигналы абиотических стрессов. В этой статье рассматриваются механизмы, регулирующие текучесть мембран, возможные сенсоры, воспринимающие сигналы об изменении текучести, а также экспрессия генов, отвечающих за адаптацию к меняющимся условиям окружающей среды.

Ключевые слова: ДНК-микрочипы, липиды мембран, низкотемпературные сенсоры, осмосенсоры, текучесть мембран, температурный стресс.

Введение

Температурный и осмотический стрессы вызывают изменения физических свойств клеточных мембран живых организмов. Вероятно, клетки воспринимают эти изменения с помощью сенсорных белков, локализованных в мембранах. Эти белки передают сигналы от окружающей среды по сетям передачи и в результате регулируют экспрессию генов стрессового ответа [1, 2]. Химические и генетические изменения физических свойств мембран могут оказывать сходный эффект на экспрессию генов, принимающих участие в акклиматизации [3–5]. Физическое состояние мембранных липидов также может регулировать активность мембраносвязанных белков – ионных каналов [6], рецепторных протеин-киназ [7, 8] и сенсорных белков [9, 10].

До недавнего времени изучение влияния текучести мембран на экспрессию генов было ограничено небольшим набором известных генов, экспрессия которых оценивалась с помощью РНК-ДНК гибридизации. В основном исследовались гены десатураз жирных кислот, вовлеченные в регуляцию текучести мембран и отвечающие за формирование оптимальных физических свойств мембранных липидов [1–3, 8]. Однако в последнее время, в связи с развитием геномики и протеомики, появилась возможность использовать ДНК-микрочипы, несущие индивидуальные гены и покрывающие полные геномы бактерий и растений. Эта технология позволяет одновременно изучать экспрессию целых геномов и выявлять практически все гены, вовлеченные в стрессовые и адаптационные ответы. ДНК-микрочипы в комбинации с направленным мутагенезом генов, отвечающих за регуляцию текучести клеточных мембран, являются мощным инструментом для изучения участия мембран в регуляции экспрессии генов и для идентификации различных сенсорных белков.

Ниже мы рассмотрим механизмы, регулирующие текучесть мембран, возможные сенсоры, воспринимающие сигналы об изменении текучести, и обсудим данные об экспрессии генов стрессовых ответов, полученные с использованием технологии ДНК-микрочипов.

1. Изменения текучести мембран

1.1. Действие температуры

Действие фактора изменения температуры на текучесть мембран показано на примере рыб [11, 12], бактерий [13] и цианобактерий [5, 14, 15]. Эти работы сфокусированы на исследовании действия низких температур и ясно показывают, что при снижении температуры окружающей среды текучесть мембран снижается (рис. 1).

Влияние высоких температур на физические свойства мембран также изучалось, хотя и менее интенсивно [4, 16]. Высокие температуры вызывают флуидизацию мембран (рис. 1), что может привести к дезинтеграции липидного бислоя. Таким образом, очевидно, что изменения температуры в сторону снижения или повышения оказывают сильное влияние на физические свойства мембранных липидов и регулируют текучесть клеточных мембран.

1.2. Действие осмотического стресса

Влияние гиперосмотического стресса на текучесть мембран изучали на фосолипидных везикулах и клетках дрожжей [17, 18]. Гиперосмотический стресс, вызванный добавлением в среду с везикулами полиэтилен-

гликоля или глюкозы к клеткам дрожжей, вызывали снижение текучести мембран [17, 18]. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что гиперосмотический стресс снижает текучесть мембран аналогично низкотемпературному стрессу.

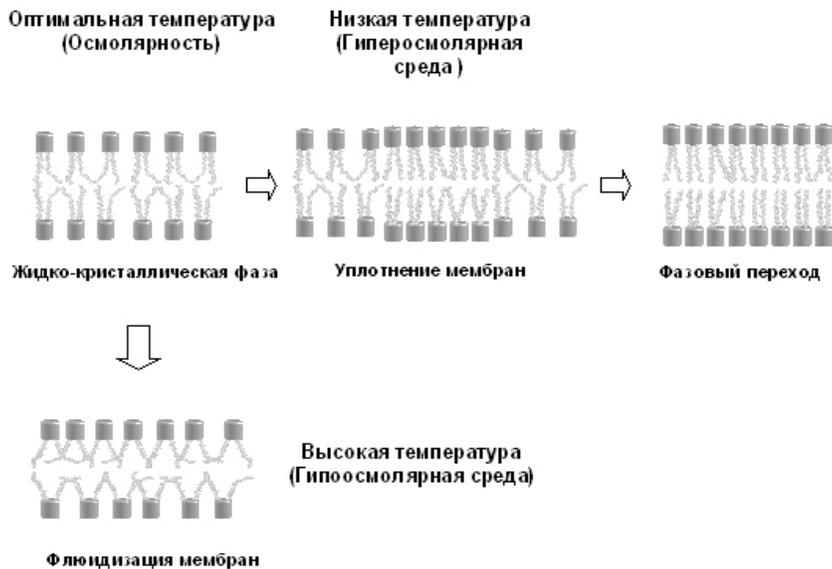


Рис. 1. Изменения структуры мембран и липидного бислоя в условиях холодового и теплового стрессов. Низкие температуры вызывают «уплотнение» мембран. Высокие температуры вызывают «растекание» (флюидизацию) мембран

Влияние гипоосмотического стресса на текучесть мембран детально не изучалось, однако высказывается предположение, о том, что этот стресс может вызывать флюидизацию мембран по аналогии с высокотемпературным стрессом. Известно, что алифатические спирты вызывают флюидизацию мембран и часто используются в качестве стимуляторов теплового и гипоосмотического стрессов [5, 19, 20]. Однако правомерность такого подхода в последнее время ставится под вопрос, поскольку было показано, что высокотемпературный стресс и бензиловый спирт (оба вызывают флюидизацию мембран) индуцируют различные гены у цианобактерии *Synechocystis* [15]. Таким образом, физиологическое влияние теплового стресса и химических агентов, вызывающих флюидизацию, может быть совершенно разным.

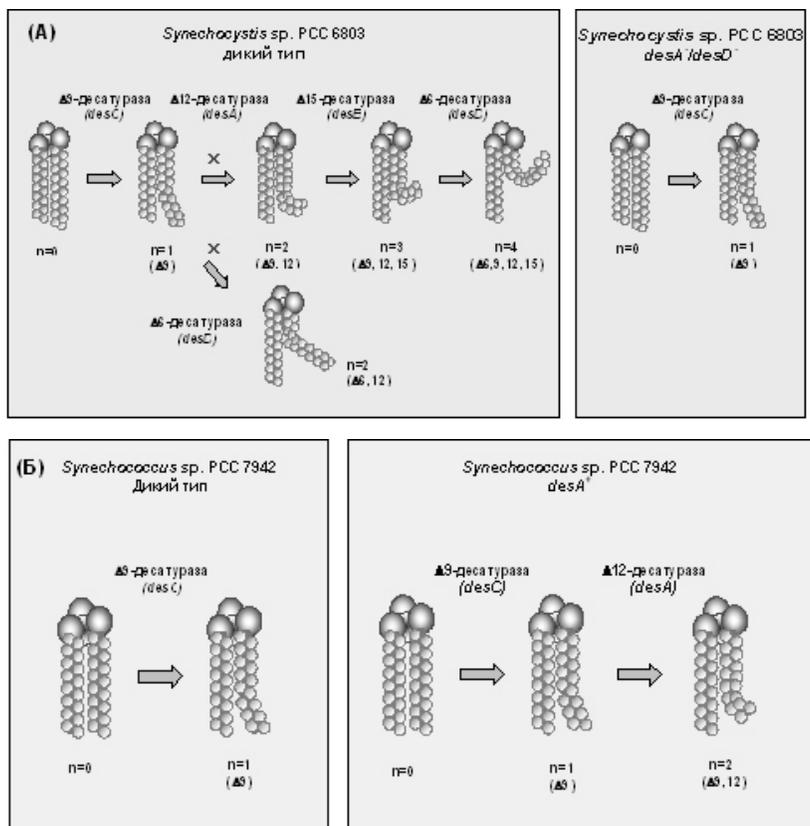


Рис. 2. Десатурация полярных липидов в клетках цианобактерий. (А) Десатурация в клетках *Synechocystis* дикого типа осуществляется четырьмя ациллипидными десатуразами с формированием C18:4 жирных кислот (левая панель). Сайт-направленный мутагенез генов *desA* и *desD* приводит к неспособности клеток синтезировать полиненасыщенные жирные кислоты и синтезируются только мононенасыщенные (правая панель). Липиды *Synechocystis* в основном несут C18 жирные кислоты в положении *sn*-1 и C16:0 – в положении *sn*-2. Десатурация происходит только в жирных кислотах, находящихся в положении *sn*-1. n=0, 1, 2, 3, 4 соответствуют количеству двойных связей в цепях жирных кислот. (Б) Десатурация в клетках *Synechococcus* дикого типа осуществляется только одной Δ9-десатуразой и образуются только мононенасыщенные жирные кислоты (левая панель). Трансформация этого штамма геном *desA*, кодирующим Δ12-десатуразу в *Synechocystis*, приводит к интенсивному синтезу жирных кислот с двумя двойными связями (правая панель). Липиды *Synechococcus* в основном несут C16 жирные кислоты в положении *sn*-1 и C16:0 – в положении *sn*-2. Десатурация осуществляется как в положении *sn*-1, так и в положении *sn*-2

1.3. Влияние степени ненасыщенности жирных кислот

Зависимость текучести мембран от степени ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов – хорошо изученный феномен, показанный на клетках животных [21], рыб, [22, 23], грибов [24, 25], растений [26, 27], бактерий [13, 28] и цианобактерий [2, 29, 30]. Цианобактерии являются наиболее удобной моделью для изучения такой зависимости [31], поскольку количество ненасыщенных двойных связей в цепях жирных кислот этих организмов может быть изменено с помощью генно-инженерных методов [32, 33]. Зависимость текучести мембран от степени ненасыщенности жирных кислот убедительно показано на примере двух штаммов цианобактерий – *Synechocystis* sp. PCC 6803 (далее – *Synechocystis*) и *Synechococcus* sp. PCC 7942 (далее – *Synechococcus*). *Synechocystis* характеризуется наличием четырех генов десатураз жирных кислот (*desA*, *desB*, *desC* and *desD*) и способностью синтезировать жирные кислоты с четырьмя двойными связями. Мембранные липиды этого организма имеют высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот (рис. 2А).

Инактивация генов *desA* и *desD* у *Synechocystis* приводит к сильному снижению текучести мембран у мутантного штамма *desA'/desD'* (Fig. 3), который теряет способность акклиматизироваться при низких температурах [33]. Таким образом, десатурация жирных кислот увеличивает текучесть мембран, что является необходимым условием для низкотемпературной устойчивости и выживания при низких температурах [1, 34, 35]. Необходимо отметить, что оптимальная температура для роста этих штаммов цианобактерий лежит в области 30–35°C, а низкотемпературный стресс клетки испытывают уже при 20–25°C.

В отличие от *Synechocystis*, клетки *Synechococcus* имеют лишь одну $\Delta 9$ -десатуразу и способны синтезировать только мононенасыщенные жирные кислоты (рис. 2Б). Трансформация *Synechococcus* геном *desA* из *Synechocystis*, который кодирует $\Delta 12$ -десатуразу, позволила штамму-трансформанту *desA*⁺ синтезировать значительные количества диеновых жирных кислот [32] (рис. 4Б). Эти изменения приводили к увеличению текучести мембран и обеспечивали способность клеток выживать при пониженных температурах (рис. 4).

Влияние изменения текучести мембран на экспрессию генов было продемонстрировано на клетках дикого типа и мутанта *desA'/desD'* при изучении экспрессии целого генома с применением ДНК-микрочипов [15]. Было обнаружено 16 генов (например, некоторые гены белков теплового шока – *hspA*, *clpB1*, *dnaK2*), экспрессия которых не индуцировалась холодом в клетках дикого типа, но сильно индуцировалась (в десятки раз) в клетках мутанта со сниженной текучестью мембран. Экспрессия другой группы из 17 генов при низкотемпературном стрессе возросла в 2–3 раза

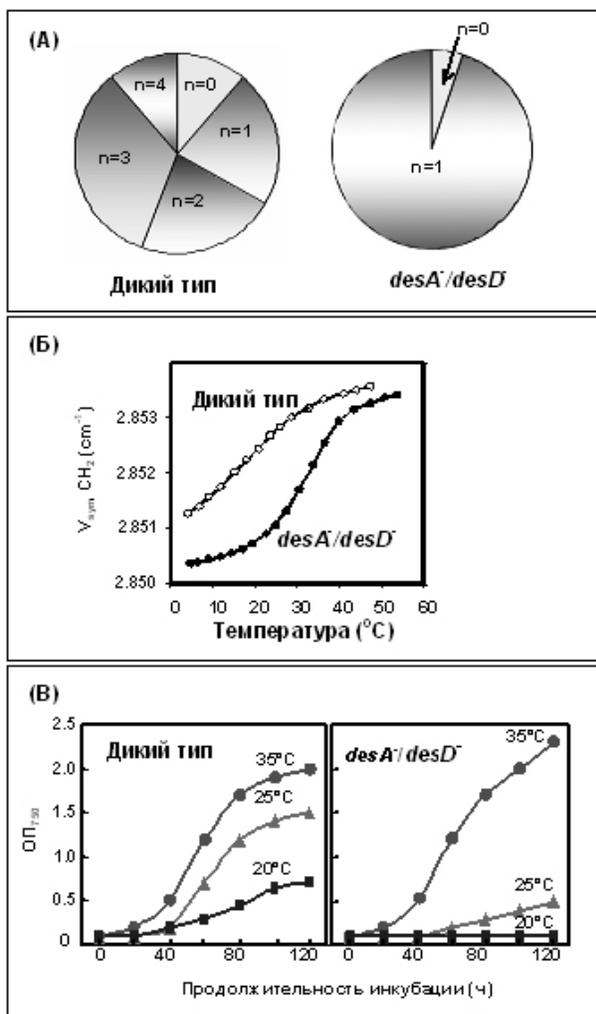


Рис. 3. Сайт-направленный мутагенез генов десатураз *desA* и *desD* в клетках *Synechocystis* приводит к накоплению мононенасыщенных жирных кислот в липидах мутанта (А). В результате снижается текучесть мембран, что показано FTIR-спектроскопией (Б). Мутантный штамм *desA/desD* не способен акклиматизироваться к низким температурам, что продемонстрировано на кривых роста клеток дикого типа и мутанта, культивируемых при 35°C, 25°C и 20°C (В). ОП₇₅₀ – оптическая плотность клеток, измеренная при 750 нм

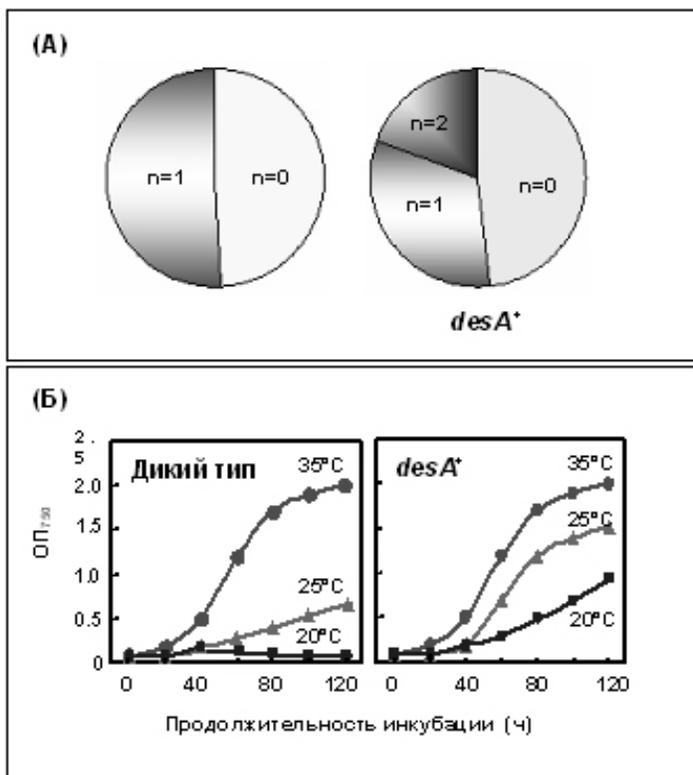


Рис. 4. Трансформация клеток *Synechococcus* геном *desA* из *Synechocystis*, кодирующим $\Delta 12$ -десатуразу, приводит к накоплению диеновых жирных кислот в липидах мембран (А). Клетки трансформанта, *desA*⁺, в отличие от клеток дикого типа, способны акклиматизироваться к низким температурам, что показано на кривых роста клеток, культивируемых при 35°C, 25°C и 20°C (В). ОП₇₅₀ – оптическая плотность клеток, измеренная при 750 нм

в результате снижения текучести мембран [15]. Эти результаты свидетельствуют о том, что экспрессия большого количества генов, индуцируемых холодом, зависит от текучести клеточных мембран.

1.4. Обратная связь между текучестью мембран и десатурацией жирных кислот

Три из четырех генов десатураз *Synechocystis* (*desA*, *desB* и *desD*) индуцируются низкими температурами [29, 36, 37]. Индуцированный *de novo* синтез этих трех десатураз при снижении температуры и последую-

щий синтез дополнительных двойных связей в цепях жирных кислот мембранных липидов отвечают за поддержание текучести мембран и предотвращают переход мембран из жидкокристаллической фазы в фазу геля [38]. Низкотемпературная индукция экспрессии десатураз, компенсирующая снижение текучести мембран при низких температурах, является широко распространенным явлением, наблюдаемым во всех группах организмов – от бактерий до растений, рыб и животных [22, 29, 30, 39, 40]. Впервые этот феномен был показан на клетках *Escherichia coli* [13] и назван «гомеовискозной адаптацией». В дальнейшем существование обратной связи между текучестью мембран и компенсаторной экспрессией генов десатураз было показано с помощью химической гидрогенизации ненасыщенных жирных кислот липидов цитоплазматической мембраны *Synechocystis* [1, 3, 36]. Насыщение небольшого количества двойных связей в липидах с использованием палладиевого катализатора при оптимальной температуре роста вызывало немедленную индукцию экспрессии десатураз, которые восстанавливали оптимальную текучесть мембран, сниженную в результате химической модификации [3].

Важно также отметить, что низкотемпературная индукция генов десатураз зависит от разницы сдвига температур, а не от абсолютной температуры воздействия [3, 36]. Если на клетки, адаптированные при 36°C, воздействовать низкими температурами, то индукция десатураз наблюдается при 28°C. Однако, если клетки были адаптированы при 32°C, индукция наблюдается только при 24°C [36].

Можно предположить, что десатурация жирных кислот может компенсировать снижение текучести мембран, вызванное и гиперосмотическим стрессом. Однако анализ экспрессии генов с помощью ДНК-микрочипов не выявил индукции генов десатураз при гиперосмотическом стрессе [41]. Однако на клетках *Bacillus subtilis* показано, что гиперосмотический стресс вызывает снижение текучести мембран с последующим возрастанием количества ненасыщенных жирных кислот в мембранных липидах [42]. Этот процесс до конца не изучен и может быть связан как с индукцией генов десатураз, так и с увеличением активности предсуществующих десатураз.

2. Восприятие низких температур

2.1. Гены цианобактерий, индуцируемые низкими температурами

Ответам цианобактерий на низкотемпературный стресс посвящен ряд подробных обзоров [1, 2, 29, 30, 43]. Гены, отвечающие на снижение температуры окружающей среды, можно разделить на шесть категорий: 1) гены десатураз жирных кислот, отвечающие за регуляцию текучести

мембран; 2) гены РНК-связывающих белков (Rbp), которые являются шаперонами РНК, подобно белкам холодового шока (Csp) *E. coli* и *Bacillus subtilis*; 3) гены РНК-геликаз, участвующих в дестабилизации вторичных структур мРНК и таким образом облегчающих инициацию трансляции при низких температурах; 4) гены рибосомных белков, избыток которых необходим для акклиматизации трансляционного аппарата к холоду; 5) гены протеаз, участвующих в регенерации фотосистемы II; 6) другие гены различных функций, не попадающие ни в одну из вышеперечисленных категорий. Появление ДНК-микрочипов для *Synechocystis* открыло новые возможности для изучения ответа целого генома этой цианобактерии на низкотемпературный стресс [44]. Оказалось, что низкие температуры сильно индуцируют экспрессию около 50 генов в клетках (таблица). Кроме перечисленных групп генов, обнаружены и другие гены с важными функциями, отвечающие на низкие температуры. Среди них ген *rpoA*, кодирующий РНК-полимеразу; *sigD*, кодирующий одну из альтернативных РНК-полимераз; ген *fus*, кодирующий фактор элонгации трансляции EF-G; гены *hliA*, *hliB* и *hliC*, кодирующие белки, индуцируемые высокой интенсивностью света; ген *ndhD2*, кодирующий субъединицу 4 NADH-дегидрогеназы; ген *cytM*, кодирующий альтернативную форму цитохрома *c*; несколько генов, которые экспрессируются в ответ на окислительный стресс; и несколько генов пока неизвестной функции (таблица). Таким образом, низкотемпературный стресс вызывает индукцию множества генов, отвечающих за поддержание текучести мембран, транскрипцию, трансляцию и энергетический статус клетки.

2.2. Сенсор низких температур у цианобактерий

Сенсор низких температур, гистидин-киназа Hik33, был идентифицирован в клетках *Synechocystis* как регулятор низкотемпературной индукции экспрессии гена *desB*, кодирующего ω 3-десатуразу жирных кислот [45, 46]. Последующий анализ экспрессии генома показал, что Hik33 регулирует экспрессию по крайней мере половины из 50 генов, индуцируемых холодом [44].

Аминокислотная последовательность Hik33 содержит несколько консервативных доменов, характерных для регуляторных белков про- и эукариот: линкер Р-типа [47], так называемый лейциновый замок, и PAS-домен [48] (рис. 5А). Линкер Р-типа состоит из двух спиральных участков, передающих стрессовый сигнал в результате внутримолекулярных структурных изменений, возникающих в результате взаимодействия между этими спиральными участками [47, 49, 50]. PAS-домен может воспринимать окислительный стресс [48], сопровождающий ранние этапы низкотемпературного стресса [51, 52]. Некоторые гены, индуцируемые окислительным

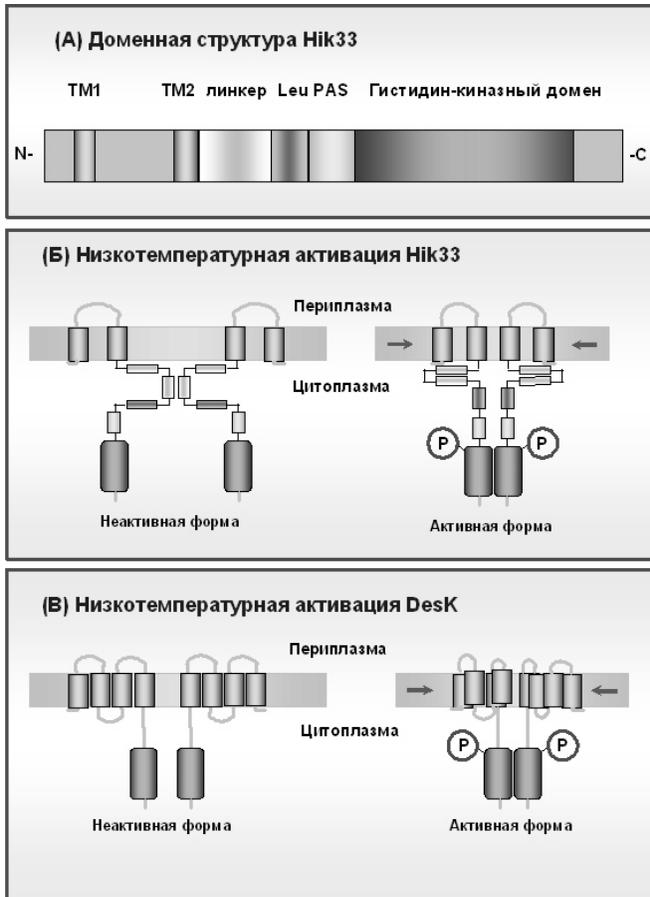


Рис. 5. Гипотетическая схема структуры и активации гистидин-киназ-сенсоров низких температур. (А) Доменная структура Nik33 из *Synechocystis*. TM1 и TM2 – трансмембранные домены 1 и 2; линкер, линкер Р-типа; Leu, лейциновая молния; PAS, PAS-домен. (Б) Схема активации Nik33 при снижении температуры. Снижение температуры приводит к уплотнению мембраны, что вызывает компрессию липидного бислоя (показано стрелками). В этих условиях трансмембранные домены сближаются с изменением конформации в районе линкера, что приводит к димеризации сенсора с последующим автофосфорилированием. (В) Активация DesK из *Bacillus subtilis* при снижении температуры. Каждый мономер DesK имеет четыре трансмембранных домена. Фосфорилирование может происходить по схеме, сходной с Nik33

стрессом, также активируются и низкими температурами (таблица). Структурные особенности Hik33 позволяют предполагать, что низкотемпературный стресс может вызывать конформационные изменения в районе Р-линкера с последующей димеризацией сенсорного белка (рис. 5Б) [2].

Аминоконцевой участок Hik33 содержит два трансмембранных домена (рис. 5) [46]. Результаты анализа изменений текучести мембран [14, 15] дают основания полагать, что Hik33 может распознавать эти изменения при снижении температуры [2]. Такая возможность была проверена путем мутации гена *hik33* в штамме *desA/desD*. В клетках тройного мутанта *desA/desD/hik33⁻* экспрессия генов, находящихся под контролем Hik33, перестала индуцироваться низкими температурами [15]. Видимо, Hik33 воспринимает снижение текучести мембраны как первичный сигнал холодового стресса.

В клетках *B. subtilis* идентифицирована гистидин-киназа DesK, воспринимающая холодовой стресс и отвечающая за регуляцию индукции гена $\Delta 5$ -десатуразы (рис. 5В) [53]. Как и Hik33, DesK является трансмембранным сенсором. Каждый мономер DesK имеет четыре трансмембранных домена и гистидин-киназный домен. В отличие от Hik33, DesK не несет PAS-домена и лейциновой молнии.

Ген *desK* формирует оперон с геном *desR*, который кодирует регулятор ответа, специфически связывающийся с промоторной областью гена десатуразы. Индукция экспрессии гена десатуразы через двухкомпонентную систему регуляции DesK-DesR ингибируется добавлением экзогенных ненасыщенных жирных кислот [28, 53], что свидетельствует о наличии обратной связи между сенсором и степенью ненасыщенности мембранных липидов.

2.3. Гены растений, индуцируемые низкими температурами

В растениях идентифицировано большое количество генов, индуцируемых низкими температурами [51, 52, 54–66]. Среди них гены десатураз жирных кислот [34, 40, 67], что подтверждает важную роль десатурации мембранных липидов в регуляции текучести мембран и акклиматизации растений к низким температурам, о чем говорилось выше [1, 27, 29, 68, 68].

Анализ экспрессии 8,000 генов у *Arabidopsis thaliana* с помощью ДНК-микрочипов показал, что экспрессия 218 генов индуцируется в ответ на низкотемпературный стресс. Эти гены кодируют транскрипционные факторы, передатчики сигналов, переносчики ионов и молекул, ферменты, вовлеченные в синтез клеточной стенки и в ответы на окислительный стресс [52].

2.4. Восприятие низких температур растениями

Открытие у растений пути регуляции передачи низкотемпературного сигнала (CBF) значительно расширило фронт исследований проблемы ответа растений на низкие температуры [59, 60, 66, 70–73]. Анализ транскрипционного контроля двух генов, индуцируемых низкими температурами (*rd29A* and *cor15a*) у *A. thaliana*, привел к открытию холодозависимого цис-элемента CRT/DRE [от англ. (C-repeat)/(dehydration responsive element)], локализованного в промоторных областях этих генов [71]. Белки семейства AP2-доменных транскрипционных факторов, DREB1 (от англ. DRE-binding protein) и CBF (от англ. CRT-binding factor), связываются с цис-элементом CRT/DRE и активируют транскрипцию [59–61, 74]. Экспрессия генов, кодирующих эти транскрипционные факторы индуцируется в растениях очень быстро в ответ на холододовый стресс. Кроме того, дополнительная экспрессия CBF1, CBF2 и CBF3 в трансгенном *Arabidopsis* при нормальной температуре приводила к активации экспрессии 41 гена, 30 из которых идентифицированы как холодоиндуцируемые гены в растениях дикого типа [63]. Вероятно, что транскрипционные факторы CBF могут регулировать экспрессию генов не только при холододовом стрессе, но и передавать сигналы других стрессовых воздействий. Однако, около 60 генов, индуцируемых холодом, не контролируются системой CBF, что свидетельствует в пользу существования других регуляторных систем восприятия и передачи холододового сигнала [52].

Несмотря на накопление важнейших данных о путях передачи сигналов холододового стресса в растениях, практически ничего не известно о механизмах восприятия этих сигналов и о возможных сенсорах. Эксперименты, показавшие низкотемпературную индукцию генов, десатураз и данные, полученные с использованием химических модуляторов текучести мембран [55, 58, 75, 76], позволяют предположить, что снижение текучести может быть вовлечено в восприятие холододового стресса клетками растений. Однако истинные температурные сенсоры пока еще не найдены.

В животных клетках в качестве низкотемпературных сенсоров идентифицированы трансмембранные кальциевые каналы [77–81]. Ионы кальция играют важную регуляторную роль в качестве вторичных передатчиков сигнала во многих известных регуляторных путях [82–84]. Быстрый вход ионов Ca^{2+} в клетки растений при холододовом стрессе [85, 86] предполагает, что кальциевые или какие-то неспецифические ионные каналы могут функционировать в качестве сенсоров низких температур в растениях [86, 87]. Но для окончательного вывода на этот счет необходимы прямые экспериментальные доказательства.

3. Восприятие высоких температур

Высокотемпературный стресс увеличивает текучесть мембран [5, 16]. Если холодовые сенсоры активируются при снижении текучести [2, 3, 45], было бы логичным предполагать, что возможные тепловые сенсоры могут активироваться при флюидизации мембран. Однако до настоящего времени кандидаты на роль трансмембранных тепловых сенсоров не найдены ни в бактериях, ни в растениях. Тем не менее показано, что генно-инженерное увеличение степени насыщенности жирных кислот в липидах цитоплазматической мембраны дрожжей приводило к индукции экспрессии гена белка теплового шока Hsp90 [4]. Возможно, в данном случае экспрессия гена теплового шока действительно зависела от текучести мембраны [4, 16]. Данные в поддержку такой возможности были получены при изучении ответов клеток *Synechocystis* на тепловой стресс [5, 88]. Бензиловый спирт, разжижающий мембраны, активировал транскрипцию гена теплового шока *hspA* при нормальной температуре с такой же эффективностью, как и тепловой стресс. Однако данные других исследований не подтверждают возможное участие текучести мембран в регуляции ответа на высокие температуры. Замещение полиненасыщенных липидов на мононенасыщенные липиды в клетках *Synechocystis* [33] (рис. 3) не повлияло на экспрессию генов теплового ответа. [15]. Более того, было показано, что бензиловый спирт и тепловое воздействие индуцируют в основном разные группы генов. Гены, которые индуцировались и теплом и бензиловым спиртом, составляют группу генов, индуцируемых различными стрессами: тепловым, солевым и гипер- и гипоосмотическим. Эти гены, называемые в литературе генами теплового шока (*hspA*, *cplB*, *htpG*, *dnaJ*, *dnaK2*, *groESL* and *cpn60*, *sodB*, *sigB*), и некоторые другие принадлежат к различным классам метаболических и регуляторных генов. Видимо, правильнее было бы определять эти гены как гены общего стрессового ответа. Так или иначе, стало понятным, что обработка клеток бензиловым спиртом (и, видимо, другими химическими агентами, увеличивающими текучесть мембран) не воссоздает адекватную картину теплового стресса. А следовательно, проблема восприятия высоких температур через изменение текучести мембран пока еще имеет ряд противоречий, требующих дополнительных исследований.

В клетках *E. coli* тепловой сигнал передается частично через двухкомпонентную систему CpxA-CpxR [89–92]. CpxA является гистидинкиназой с двумя трансмембранными участками, а CpxR представляет собой регулятор ответа генов, индуцируемых теплом [93–95]. Активность CpxA зависит от состава липидов мембран [96], а следовательно, этот сенсор может улавливать изменения текучести. Эта регуляторная система была обнаружена только в клетках *E. coli*, *Salmonella typhi* и *Yersinia pestis* [97],

но не у других бактерий. Поэтому эта регуляторная система, по-видимому, не может претендовать на универсальность. Возможно, тепловые сенсорные системы других организмов имеют отличную от *Srx* природу. Так, у *Mucosoccus xanthus* в качестве системы восприятия и передачи теплового стресса идентифицированы гистидин-киназа HsfA и регулятор ответа [98]. В данном случае HsfA оказался растворимым белком с доменом получения фосфата, а значит, скорее всего этот белок является передатчиком сигнала, а не сенсором [98]. Семейство трансмембранных тепловых рецепторов, большинство из которых реагируют также и на капсаицин (основной горький элемент в перце), идентифицировано у млекопитающих [81, 99]. Однако пока ничего не известно о тепловых сенсорах у фотосинтезирующих организмов.

4. Восприятие осмотического стресса

4.1. Гены, индуцируемые гиперосмотическим стрессом

Повышение осмолярности внешней среды вызывает выход воды из клеток, уменьшение объема цитоплазмы, снижение тургора клеток и в конечном итоге, может вызвать плазмолиз и гибель клеток [7]. Исследование экспрессии генов в ответ на гиперосмотический стресс было сосредоточено в основном на генах осмопротекторов, обеспечивающих синтез пролина, трегалозы, бетаина и сахарозы [7, 8].

Анализ экспрессии генома *Synechocystis* в ответ на гиперосмотический стресс показало, что гиперосмотический стресс индуцирует экспрессию 257 генов [41]. Продукты этих генов отвечают за синтез компонентов клеточной стенки, мембран, фосфат-транспортных систем, а также регуляторов фотосинтеза, компонентов передачи стрессовых сигналов, регуляторов экспрессии генов и метаболизма белков. Кроме того, индуцируются гены, отвечающие за синтез основного осмопротектора, глюкозилглицерина [100, 101]. Сходные события наблюдаются и при исследовании ответа генома дрожжей на гиперосмотический стресс [102–105]. Кроме того, было обнаружено, что и у *Synechocystis* [41], и у дрожжей [8] гиперосмотический стресс специфически индуцирует лишь небольшое количество генов. Большинство же индуцируемых генов также активируются и другими стрессовыми воздействиями – высокими и низкими температурами, солевым стрессом и светом высокой интенсивности [15, 41, 47, 106–109]. Среди всех генов, индуцируемых гиперосмотическим стрессом, обнаруживается большое количество генов неизвестной функции, и пока еще сложно делать какие-либо заключения о функциях этих генов и их значении для акклиматизации к стрессовым условиям.

4.2. Сенсоры гиперосмотического стресса

В клетках *E. coli* предполагаемым осмосенсором является трансмембранная гистидин-киназа EnvZ [10, 110]. Этот белок регулирует экспрессию генов *omp*, кодирующих порины внешней мембраны [111]. Химические агенты прокаин и хлорпромазин, разжижающие мембраны, стимулируют фосфорилирование EnvZ и перенос фосфатной группы к регулятору ответа OmpR [9, 112–114]. Эти результаты позволяют предполагать, что активность осмосенсора может регулироваться при изменении физического состояния липидов мембран.

В клетках *Lactococcus lactis* возможным осмосенсором является OpuA – трансмембранный белок, отвечающий за транспорт аммонийных соединений и играющий ключевую роль в защите этой бактерии от гиперосмотического стресса [115, 116]. Реконституция активной системы OpuA в искусственных мембранах из фосфолипидов показала, что OpuA является необходимой и достаточной системой для активации поглощения глицин-бетаина при гиперосмотическом стрессе. Химические агенты катионной (тетракаин и хлорпромазин) и анионной (дипириmidол) природы, взаимодействующие с заряженными группами фосфолипидов и изменяющие текучесть мембран, активировали OpuA в такой же степени, как гиперосмотический стресс. Таким образом, и в данном случае наблюдается регуляция активности предполагаемого осмосенсора на уровне изменения текучести мембран [115].

Системы осмосенсоров дрожжей подробно описана в обзоре Хохманна [8]. Клетки *S. cerevisiae* имеют два трансмембранных белка, Sho1p и Sln1p, предположительно являющиеся сенсорами гиперосмотического стресса. Sho1p характеризуется наличием четырех трансмембранных доменов и SH3-домена, отвечающего за белок-белковые взаимодействия, но киназный и фосфатазный домены в этом белке отсутствуют [117]. Поэтому маловероятно, что сам Sho1p является осмосенсором. Однако он может работать в ассоциации с другими сенсорами, которые пока неизвестны. Sln1p является гибридной гистидин-киназой с доменом регулятора ответа и двумя трансмембранными доменами. Роль этого белка в восприятии гиперосмотического стресса и дальнейшей передаче сигнала хорошо документирована [118, 119]. Этот сенсор активирует HOG (от англ. high osmolarity glycerol) MAP-киназный регуляторный путь, регулирующий биосинтез глицерина – основного осмопротектора в клетках *S. cerevisiae* [8, 120]. В настоящее время неизвестно, регулируется ли активность Sln1p при изменении текучести мембран. Можно лишь предположить, что этот трансмембранный сенсор может воспринимать уплотнение или механическое сжатие мембраны в результате выхода воды из клеток при гиперосмотическом стрессе.

Одна из проблем в изучении осмосенсора дрожжей Sln1p заключается в том, что гиперосмотический стресс в экспериментах формировался добавлением NaCl [8, 104, 121]. Следует иметь в виду, что NaCl оказывает на клетки двойной эффект: соль индуцирует как гиперосмотический, так и ионный стресс [122]. На клетках *Synechocystis* показано, что солевой стресс (0.5 М NaCl) и гиперосмотический стресс (0.5 М сорбит) индуцируют экспрессию разных наборов генов [41]. Эти наблюдения заставляют сделать предположение о том, что эти стрессы могут восприниматься разными сенсорами, хотя и наличие общих сенсоров также не может быть исключено.

Исследование экспрессии целого генома *Synechocystis* показало, что гистидин-киназа Hik33, ранее идентифицированная как сенсор холодового стресса (см. выше), контролирует индукцию около 60% от общего числа генов, индуцируемых гиперосмотическим стрессом [107]. Hik33 контролирует экспрессию генов, которые вовлечены в синтез компонентов клеточной стенки и клеточных мембран, формирование системы транспорта фосфатов, защиту фотосинтетического аппарата и некоторые другие процессы, важные для акклиматизации клеток к гиперосмотическому стрессу.

Вероятно, изменения текучести мембран являются первичным сигналом для Hik33 как при холодовом, так и при гиперосмотическом стрессах.

Гистидин-киназа AtHK1 из *Arabidopsis* комплементирует мутации осмосенсора Sln1p в *Saccharomyces cerevisiae*, поэтому вполне вероятно, что AtHK1 является сенсором гиперосмотического стресса у растений [124]. Комплементация показывает, что эта гистидин-киназа из *Arabidopsis* может замещать осмосенсор дрожжей и эффективно передавать сигнал на MAP-киназный модуль. К настоящему времени AtHK1 является единственным осмосенсором, найденным в растениях.

4.3. Сенсоры гипоосмотического стресса

Молекулярные механизмы восприятия гипоосмотического стресса пока еще недостаточно изучены. Исследования в этой области в основном сфокусированы на изучении механосенсорных каналов, активность которых меняется при изменении объема клетки и натяжении мембран. Считается, что эти каналы регулируют клеточный объем и участвуют в транспорте ионов и небольших молекул из клетки. Наиболее изученным является механосенсорный канал большой проводимости бактерий MscL (от англ. mechanosensitive channel of large conductance) [6, 125, 126]. Этот канал осуществляет неселективный транспорт растворов из бактериальных клеток при сильном гипоосмотическом стрессе [127, 128]. Моделирование,

основанное на данных о кристаллической структуре MscL [129] в сочетании с результатами кросс-сшивок и направленного мутагенеза индивидуальных аминокислот, позволило предложить схему двухстадийного открытия канала, приводящего к увеличению диаметра проводящей поры с 1 до 13 Å. Согласно этой модели, напряжение мембраны приводит к конформационным изменениям белка от закрытого, через частично открытый, к полностью открытому каналу [6, 127, 128, 130].

Наши последние исследования функционирования MscL у пресноводной бактерии *Synechocystis* показали, что этот канал может воспринимать сигнал не только при натяжении мембраны, но также при деполяризации цитоплазматической мембраны, вызванной холодовым стрессом [130]. В дополнение к роли регуляции клеточного объема, как это показано для клеток *E. coli* [131-133], MscL цианобактерий функционирует как основной канал выброса ионов Ca^{2+} из клеток при холодовом стрессе [130].

Функциональным (но не структурным) гомологом MscL бактерий является канал Fps1p дрожжей [134, 135]. Механизм его активации до конца не ясен. Возможно, регуляторный домен Fps1p сворачивается таким образом, что закрывает канал, как это происходит в случае калиевых каналов животных [78, 136]. Возможно также, что трансмембранные домены Fps1p ориентированы в мембране таким образом, что способны распознавать ее натяжение, как это происходит с MscL [127, 137]. Попытки идентификации белков, которые могли бы взаимодействовать с Fps1p, пока не увенчались успехом [8]. Очевидно, для дальнейшего исследования возможных сенсорных белков необходима разработка тестовых систем *in vitro*, состоящих из очищенных белков. Эффективность таких систем уже продемонстрирована: недавно было показано, что активность белка BetP (осморегулируемого переносчика бетаина) в *Corynebacterium glutamicum* регулируется скорее внутриклеточной концентрацией ионов K^+ , а не механическим стимулом. Этот белок функционирует как хемосенсор ионов K^+ , которые служат вторичным передатчиком сигнала при изменении объема клеток [138]. Такой же тип регуляции предполагается и для белка KdpD *E. coli*, являющегося сенсором калиевого статуса клеток [7].

Прямые данные, показывающие изменение текучести мембран при гипоосмотическом стрессе, на сегодняшний день отсутствуют. Поэтому участие текучести мембран в регуляции клеточного ответа на гипоосмотический стресс все еще остается предметом дискуссий и предположений.

5. Мультифункциональные сенсоры

Накапливается все больше данных, свидетельствующих о существовании множественных связей между различными регуляторными путями, контролирующими различные стрессовые, а также гормональные [2, 51, 107, 139–143]. Становится все более ясным, что различные внешние сти-

мулы могут восприниматься общими сенсорными системами. Так, гистидин-киназа Nik33 *Synechocystis* была сначала идентифицирована как компонент системы, отвечающей за устойчивость к химическим агентам, ингибирующим фотосинтез [144]. Далее, киназа Nik33 была охарактеризована как сенсор низких температур, воспринимающий уплотнение мембраны при холодовом стрессе [44–46]. Затем оказалось, что Nik33 вовлечена в восприятие гиперосмотического [107] и солевого стрессов [109]. Изучение Nik33 с помощью ДНК-микрочипов показывает, что этот сенсор контролирует индукцию различных наборов генов при разных стрессах. Молекулярные механизмы, с помощью которых Nik33 распознает холодовой, осмотический и солевой стрессы, все еще не выяснены. Возможно, Nik33 воспринимает изменения текучести мембран [2, 16, 130]. Однако остается неясным, что именно вызывает активацию сенсора – изменение физической подвижности жирных кислот в мембранных липидах или изменения (распределения?) поверхностного заряда липидов [2].

Проблемы существования и функционирования мультисенсоров также актуальны и для растений [62]. Низкие температуры, обезвоживание и солевой стресс индуцируют транзистентный вброс ионов Ca^{2+} в цитоплазму растительных клеток [148, 149]. Предполагается, что именно кальциевые каналы могут служить мультифункциональными сенсорами, воспринимающими стресс-индуцированные пертурбации в цитоплазматической мембране, включая и изменение текучести [58, 76].

Открытие мультифункциональных сенсоров открывает очень интересную серию исследований. Считая текучесть мембран основным параметром, позволяющим клеткам адекватно воспринимать сигналы об изменении параметров окружающей среды, можно сделать вывод о существовании сенсоров, чувствующих изменения физических свойств мембран вне зависимости от природы стрессового воздействия, вызывающего эти изменения. Эти сенсоры должны быть либо трансмембранными, либо, по крайней мере, быть ассоциированными с мембранами, как, например, Nik33, Sln1p или механосенсорные кальциевые и калиевые каналы.

6. Заключение и перспективы

Предполагается, что изменения текучести биологических мембран является первичным сигналом при восприятии температурного и, возможно, осмотического стресса. Однако молекулярные механизмы, контролирующие восприятие и передачу этих сигналов через мембраны, все еще до конца не понятны. Наличие информации о полных нуклеотидных последовательностях множества геномов в сочетании с технологией геномных ДНК-микрочипов позволяет перенести исследования генной экспрессии на качественно более высокий уровень и идентифицировать группы генов, отвечающих на разные стрессы специфически и неспецифически. Также

появилась возможность поиска сенсоров и передатчиков различных стрессовых сигналов.

Вполне вероятно, что уплотнение мембранных липидов при снижении температуры и в условиях гиперосмотического стресса запускает соответствующие стрессовые ответы. У цианобактерий за восприятие этих сигналов отвечает Hik33. Однако, по-видимому, существует какой-то дополнительный низкотемпературный сенсор, т.к. не все гены, индуцируемые холодом, находятся под контролем Hik33 и, следовательно, под контролем текучести мембран [55]. Участие текучести мембран в восприятии теплового стресса все еще остается под вопросом [5, 18]. Необходимы дальнейшие исследования, для того чтобы понять тонкие механизмы восприятия температурных и других сигналов.

Возможно, что некоторые сенсоры (такие как Hik33) чувствуют уплотнение мембранных липидов вне зависимости от природы стрессового стимула (холодовой, гиперосмотический или солевой стресс). Пока мы не знаем ни каким образом сенсорные трансмембранные белки распознают изменения текучести мембран, ни какие именно домены и аминокислоты вовлечены в восприятие сигналов. Очень важно также определить специфические липиды и липидные домены, взаимодействующие с сенсорными белками и участвующие в регуляции их конформации и/или активности. Когда мы поймем, каким образом организмы отвечают на внешние стрессы, у нас будет больше шансов сохранить и защитить растения и животных от неблагоприятных факторов окружающей среды.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (03-04-48581), Фонда содействия отечественной науке и грантом Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Таблица. Гены цианобактерий, индуцируемые низкими температурами

Ген	Продукт гена	Штамм цианобактерий
Genes for desaturases		
<i>desA</i>	$\Delta 12$ -десатураза	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714 <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 <i>Spirulina platensis</i>
<i>desB</i>	$\Delta 3$ -десатураза	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002
<i>desC</i>	$\Delta 9$ -десатураза	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6301 <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6301 <i>Synechococcus vulcanus</i>
<i>desD</i>	$\Delta 6$ -десатураза	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 <i>Spirulina platensis</i>
Гены РНК-связывающих белков		
<i>rbpA1</i>	Rbp1	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803

3. Проблемы регуляции в живых и предбиологических системах

<i>rbpA2</i>	Rbp2	<i>Anabaena variabilis</i> M3
<i>rbpA3</i>	Rbp3	<i>Anabaena variabilis</i> M3
<i>rbpB</i>	RbpB	<i>Anabaena variabilis</i> M3
<i>rbpC</i>	RbpC	<i>Anabaena variabilis</i> M3
<i>rbpF</i>	RbpE	<i>Anabaena variabilis</i> M3
<i>rbpF</i>	RbpF	<i>Anabaena variabilis</i> M3
<i>crhB</i>	РНК-геликаза CrhB	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
<i>crhC</i>	РНК-геликаза CrhC	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
<i>deaD</i>	РНК-геликаза DeaD	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
Гены протеаз		
<i>clpB</i>	Молекулярный шаперон ClpB	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942
<i>clpP1</i>	Протеаза ClpP	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942
<i>clpX</i>	Гипотетический регулятор	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942
Гены рибосомных белков		
<i>rpsU</i>	Белок субъединицы 30S S21	<i>Anabaena variabilis</i> M3
<i>rps12</i>	Белок субъединицы 30S S12	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>rps13</i>	Белок субъединицы 30S S13	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>rp11</i>	Белок субъединицы 50S L1	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>rp13</i>	Белок субъединицы 50S L3	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>rp14</i>	Белок субъединицы 50S L4	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>rp111</i>	Белок субъединицы 50S L11	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>rp12(j)</i>	Белок субъединицы 50S L20	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>rptt1</i>	Белок субъединицы 50S L21	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>rp123</i>	Белок субъединицы 50S L23	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>fus</i>	Фактор элонгации EF-G	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
Гены других функций		
<i>rpoA</i>	α субъединица РНК-полимеразы	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>rpoD</i>	σ^{70} фактор РНК-полимеразы	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>cbiM</i>	Белок биосинтеза кобаламина	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>cytM</i>	Цитохром c_M	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>ndhC</i>	Субъединица 3 NADH-дегидрогеназы	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>ndhD2</i>	Субъединица 4 NADH-дегидрогеназы	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>ndhD6</i>	Субъединица 6 NADH-дегидрогеназы	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>fo1E</i>	GTP-циклогидролаза	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>Ss11633</i>	семейство CAV/ELIP/FLIP	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>hliA</i>	Семейство HLIP	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
Гены белков неизвестной функции		
<i>slr1544</i>		<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>slr0082</i>		<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>sll0551</i>		<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>sll0668</i>		<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>slr1974</i>		<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>slr0955</i>		<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803

Полный список генов имеется на сайте <http://www.genome.ad.jp/keg/expression>.

Литература

- [1] N. Murata, D.A. Los, Membrane fluidity and temperature perception, *Plant Physiol.* 115 (1997) 875-879.
- [2] D.A. Los, N. Murata, Regulation of enzymatic activity and gene expression by membrane fluidity, *Science's Signal Transduction Knowledge Environment*. http://www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2000/62/pe1 (2000).
- [3] L. Vigh, D.A. Los, I. Horvath, N. Murata, The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 9090-9094.
- [4] L. Carratu, S. Franceschelli, C.L. Pardini, G.S. Kobayashi, I. Horvath, L. Vigh, B. Maresca, Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 3870-3875.
- [5] I. Horvath, A. Glatz, V. Varvasovszki, Z. Torok, T. Pali, G. Balogh, E. Kovacs, L. Nadasdi, S. Benko, F. Joo, L. Vigh, Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of *hsp17* as a "fluidity gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 3513-3518.
- [6] S. Sukharev, Mechanosensitive channels in bacteria as membrane tension reporters, *FASEB J.* 13 Suppl. (1999) S55-S61.
- [7] J.M. Wood, Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (1999) 230-262.
- [8] S. Hohmann, Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (2003) 300-372.
- [9] S. Tokishita, T. Mizuno, Transmembrane signal transduction by the *Escherichia coli* osmotic sensor, *EnvZ*: intermolecular complementation of transmembrane signaling, *Mol. Microbiol.* 13 (1994) 435-444.
- [10] A. Sugiura, K. Hirokawa, K. Nakashima, T. Mizuno, Signal-sensing mechanisms of the putative osmosensor KdpD in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 14 (1994) 929-938.
- [11] A.R. Cossins, J. Christiansen, C.L. Prosser, Adaptation of biological membranes to temperature. The lack of homeoviscous adaptation in the sarcoplasmic reticulum, *Biochim. Biophys. Acta* 511 (1978) 442-452.
- [12] D.J. Pehowich, P.M. Macdonald, R.N. McElhaney, A.R. Cossins, L.C. Wang, Calorimetric and spectroscopic studies of lipid thermotropic phase behavior in liver inner mitochondrial membranes from a mammalian hibernator, *Biochemistry* 27 (1988) 4632-4638.

- [13] M. Sinensky, Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 522-525.
- [14] B. Szalontai, Y. Nishiyama, Z. Gombos, N. Murata, Membrane dynamics as seen by Fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio, Biochim. Biophys. Acta 1509 (2000) 409-419.
- [15] M. Inaba, I. Suzuki, B. Szalontai, Y. Kanasaki, D. A. Los, H. Hayashi, N. Murata, Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis*, J. Biol. Chem. 278 (2003) 12191-12198.
- [16] L. Vigh, B. Maresca, J.L. Harwood, Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? Trends Biochem. Sci. 23 (1998) 369-374.
- [17] M. Yamazaki, S. Ohnishi, T. Ito, Osmoelastic coupling in biological structures: decrease in membrane fluidity and osmophobic association of phospholipid vesicles in response to osmotic stress, Biochemistry 28 (1989) 3710-3715.
- [18] C. Laroche, L. Beney, P.A. Marechal, P. Gervais, The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures, Appl. Microbiol. Biotechnol. 56 (2001) 249-254.
- [19] S. Gudi, J.P. Nolan, J.A. Frangos, Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 2515-2519.
- [20] N. Kabelitz, P.M. Santos, H.J. Heipieper, Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*, FEMS Microbiol. Lett. 220 (2003) 223-227.
- [21] D. Thewke, M. Kramer, M.S. Sinensky, Transcriptional homeostatic control of membrane lipid composition, Biochem. Biophys. Res. Commun. 273 (2003) 1-4.
- [22] P.E. Tiku, A.Y. Gracey, A.I. Macartney, R.J. Beynon, A.R. Cossins, Cold-induced expression of $\Delta 9$ -desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms, Science 271 (1996) 815-818.
- [23] A.I. Macartney, P.E. Tiku, A.R. Cossins, An isothermal induction of $\Delta 9$ -desaturase in cultured carp hepatocytes, Biochim. Biophys. Acta 1302 (1996) 207-216.
- [24] B. Maresca, G. Kobayashi, Changes in membrane fluidity modulate heat shock gene expression and produced attenuated strains in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*, Arch. Med. Res. 24 (1993) 247-249.
- [25] M.A. Bossie, C.E. Martin, Nutritional regulation of yeast $\Delta 9$ fatty acid desaturase activity, J. Bacteriol. 171 (1989) 6409-6413.

- [26] J.M. Lyons, J.K. Raison, Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury, *Plant Physiol.* 45 (1970) 386-389.
- [27] I. Nishida, N. Murata, Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1996) 541-568.
- [28] L.E. Cybulski, M.C. Mansilla, P.S. Aguilar, D. de Mendoza, Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase, *Mol. Microbiol.* 45 (2002) 1379-1388.
- [29] D.A. Los, N. Murata, Structure and expression of fatty acid desaturases, *Biochim. Biophys. Acta* 1394 (1998) 3-15.
- [30] D.A. Los, N. Murata, Responses to cold shock in cyanobacteria, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1 (1999) 221-230.
- [31] A. Glatz, I. Vass, D.A. Los, L. Vigh, The *Synechocystis* model of stress: from molecular chaperones to membranes, *Plant Physiol. Biochem.* 37 (1999) 1-12.
- [32] H. Wada, Z. Gombos, N. Murata, Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation, *Nature* 347 (1990) 200-203.
- [33] Y. Tasaka, Z. Gombos, Y. Nishiyama, P. Mohanty, T. Ohba, K. Ohki, N. Murata, Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis, *EMBO J.* 15 (1996) 6416-6425.
- [34] O. Ishizaki-Nishizawa, T. Fujii, M. Azuma, K. Sekiguchi, N. Murata, T. Ohtani, T. Toguri, Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase, *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 1003-1006.
- [35] I.V. Orlova, T.S. Serebriiskaya, V. Popov, N. Merkulova, A.M. Nosov, T.I. Trunova, V.D. Tsydendambaev, D.A. Los, Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid desaturase enhances the chilling tolerance of plants, *Plant Cell Physiol.* 44 (2003) 447-450.
- [36] D. Los, I. Horvath, L. Vigh, N. Murata, The temperature-dependent expression of the desaturase gene *desA* in *Synechocystis* PCC6803, *FEBS Lett.* 318 (1993) 57-60.
- [37] D.A. Los, M.K. Ray, N. Murata, Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes for desaturases in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Mol. Microbiol.* 25 (1997) 1167-1175.
- [38] J.R. Hazel, Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57 (1995) 19-42.
- [39] A.I. Macartney, B. Maresca, A.R. Cossins, Acyl-CoA desaturases and the adaptive regulation of membrane lipid composition, in: A.R. Cossins

- (Ed.), Temperature Adaptation of Biological Membranes, Portland Press, London, 1994, pp. 129-139.
- [40] E. Wodtke, A.R. Cossins, Rapid cold-induced changes of membrane order and $\Delta 9$ -desaturase activity in endoplasmic reticulum of carp liver: a time-course study of thermal acclimation, *Biochim. Biophys. Acta* 1064 (1991) 342-350.
- [41] Y. Kanesaki, I. Suzuki, S.I. Allakhverdiev, K. Mikami, N. Murata, Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (2002) 339-348.
- [42] C.S. Lopez, H. Heras, H. Garda, S. Rusal, C. Sanches-Rivas, E. Rivas, Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress, *Int. J. Food Microbiol.* 55 (2000) 137-142.
- [43] N. Murata, H. Wada, Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria, *Biochem. J.* 308 (1995) 1-8.
- [44] I. Suzuki, Y. Kanesaki, K. Mikami, M. Kanehisa, N. Murata, Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*, *Mol. Microbiol.* 40 (2001) 235-244.
- [45] I. Suzuki, D.A. Los, Y. Kanesaki, K. Mikami, N. Murata, The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*, *EMBO J.* 19 (2000) 1327-1334.
- [46] I. Suzuki, D.A. Los, N. Murata, Perception and transduction of low-temperature signals to induce desaturation of fatty acids, *Biochem. Soc. Trans.* 28 (2000) 628-630.
- [47] S.B. Williams, V. Stewart, Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction, *Mol. Microbiol.* 33 (1999) 1093-1102.
- [48] B.L. Taylor, I.B. Zhulin, PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (1999) 479-506.
- [49] L. Aravind, C.P. Ponting, The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins, *FEMS Microbiol. Lett.* 176 (1999) 111-116.
- [50] L. Aravind, V. Anantharaman, L.M. Iyer, Evolutionary connections between bacterial and eukaryotic signaling systems: a genomic perspective, *Curr. Opin. Microbiol.* 6 (2003) 490-507.
- [51] L. Xiong, K.S. Schumaker, J.K. Zhu, Cell signaling during cold, drought, and salt stress, *Plant Cell, Supplement* (2002) S165-S183.
- [52] S. Fowler, M.F. Thomashow, *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclima-

- tion in addition to the CBF cold-response pathway, *Plant Cell* 14 (2003) 1675-1690.
- [53] P.S. Aguilar, A.M. Hernandez-Arriaga, L.E. Cybulski, A.C. Erazo, D. de Mendoza, Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*, *EMBO J.* 20 (2001) 1681-1691.
- [54] L.A. Wolfrain, R.S. Dhindsa, Cloning and sequencing of the cDNA for cas17, a cold acclimation-specific gene of alfalfa, *Plant Physiol.* 103 (1993) 667-668.
- [55] A.F. Monroy, R.S. Dhindsa, Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C, *Plant Cell* 7 (1995) 321-331.
- [56] A.F. Monroy, E. Labbe, R.S. Dhindsa, Low-temperature perception in plants: effects of cold on protein phosphorylation in cell-free extracts, *FEBS Lett.* 410 (1997) 206-209.
- [57] S. Tahtiharju, V. Sangwan, A.F. Monroy, R.S. Dhindsa, M. Borg, The induction of *kin* genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium, *Planta* 203 (1997) 442-447.
- [58] B.L. Orvar, V. Sangwan, F. Omann, R.S. Dhindsa, Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity, *Plant J.* 23 (2000) 785-794.
- [59] Q. Liu, M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, 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*, *Plant Cell* 10 (1998) 1391-1406.
- [60] Z.K. Shinwari, K. Nakashima, S. Miura, M. Kasuga, M. Seki, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT-binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250 (1998) 161-170.
- [61] K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways, *Curr. Opin. Plant Biol.* 3 (2000) 217-223.
- [62] M. Seki, M. Narusaka, H. Abe, M. Kasuga, K. Yamaguchi-Shinozaki, P. Carninci, Y. Hayashizaki, K. Shinozaki, Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray, *Plant Cell* 13 (2001) 61-72.
- [63] J.K. Zhu, Cell signaling under salt, water and cold stresses, *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 (2001) 401-406.
- [64] S.J. Gilmour, N.N. Artus, M.F. Thomashow, cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.* 18 (1992) 13-21.

- [65] M.S. Webb, S.J. Gilmour, M.F. Thomashow, P.L. Steponkus, Effects of COR6.6 and COR15am polypeptides encoded by COR (cold-regulated) genes of *Arabidopsis thaliana* on dehydration-induced phase transitions of phospholipid membranes, *Plant Physiol.* 111 (1996) 301-312.
- [66] M.F. Thomashow, Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance, *Plant Physiol.* 118 (1998) 1-8.
- [67] T. Hamada, H. Kodama, M. Nishimura, K. Iba, Cloning of a cDNA encoding tobacco ω 3 fatty acid desaturase, *Gene* 147 (1994) 293-294.
- [68] J.K. Raison, J.M. Lyons, R.J. Mehlhorn, A.D. Keith, Temperature-induced phase changes in mitochondrial membranes detected by spin labeling, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 4036-4040.
- [69] J.K. Raison, Temperature-induced phase changes in membrane lipids and their influence on metabolic regulation, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27 (1973) 485-512.
- [70] K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress, *Plant Cell* 6 (1994) 251-264.
- [71] E.J. Stockinger, S.J. Gilmour, M.F. Thomashow, *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 1035-1040.
- [72] K.R. Jaglo-Ottosen, S.J. Gilmour, D.G. Zarka, O. Schabenberger, M.F. Thomashow, *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance, *Science* 280 (1998) 104-106.
- [73] S.J. Gilmour, A.M. Sebolt, M.P. Salazar, J.D. Everard, M.F. Thomashow, Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation, *Plant Physiol.* 124 (2000) 1854-1865.
- [74] K. Nakashima, Z.K. Shinwari, Y. Sakuma, M. Seki, S. Miura, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Organization and expression of two *Arabidopsis DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression, *Plant Mol. Biol.* 42 (2000) 657-665.
- [75] V. Sangwan, I. Foulds, J. Singh, R.S. Dhindsa, Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca^{2+} influx, *Plant J.* 27 (2001) 1-12.
- [76] V. Sangwan, B.L. Orvar, J. Beyerly, H. Hirt, R.S. Dhindsa, Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways, *Plant J.* 31 (2002) 629-638.

- [77] D.D. McKemy, W.M. Neuhausser, D. Julius, Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation, *Nature* 416 (2002) 52-58.
- [78] S.E. Jordt, D.D. McKemy, D. Julius, Lessons from peppers and pepper-mint: the molecular logic of thermosensation, *Curr. Opin. Neurobiol.* 13 (2003) 487-492.
- [79] A.M. Peier, A. Moqrich, A.C. Hergarden, A.J. Reeve, D.A. Andersson, G.M. Story, T.J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan, A. Patapoutian, A TRP channel that senses cold stimuli and menthol, *Cell* 108 (2002) 705-715.
- [80] G.M. Story, A.M. Peier, A.J. Reeve, S.R. Eid, J. Mosbacher, T.R. Hricik, T.J. Earley, A.C. Hergarden, D.A. Andersson, S.W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan, A. Patapoutian, ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures, *Cell* 112 (2003) 819-829.
- [81] A. Patapoutian, A.M. Peier, G.M. Story, V. Viswanath, ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation, *Nature Rev. Neurosci.* 4 (2003) 529-539.
- [82] A.J. Trewavas, R. Malho, Ca²⁺ signalling in plant cells: the big network! *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 (1998) 428-433.
- [83] M.J. Chrispeels, L. Holuigue, R. Latorre, S. Luan, A. Orellana, H. Pena-Cortes, N.V. Raikhel, P.C. Ronald, A. Trewavas, Signal transduction networks and the biology of plant cells, *Biol. Res.* 32 (1999) 35-60.
- [84] S. Gilroy, A. Trewavas, Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning?, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 307-314.
- [85] H. Knight, A.J. Trewavas, M.R. Knight, Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation, *Plant Cell* 8 (1996) 489-503.
- [86] A. Trewavas, N. Read, A.K. Campbell, M. Knight, Transduction of Ca²⁺ signals in plant cells and compartmentalization of the Ca²⁺ signal, *Biochem. Soc. Trans.* 24 (1996) 971-974.
- [87] A.F. Monroy, F. Sarhan, R.S. Dhindsa, Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression (evidence for a role of calcium), *Plant Physiol.* 102 (1993) 1227-1235.
- [88] Z. Torok, P. Goloubinoff, I. Horvath, N. M. Tsvetkova, A. Glatz, G. Balogh, V. Varvasovszki, D.A. Los, E. Vierling, J.H. Crowe, L. Vigh, *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 3098-3103.
- [89] P.N. Danese, W.B. Snyder, C.L. Cosma, L.J. Davis, T.J. Silhavy, The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates

- transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP, *Genes Dev.* 9 (1995) 387-398.
- [90] P.N. Danese, T.J. Silhavy, CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 831-839.
- [91] T.L. Raivio, T.J. Silhavy, Periplasmic stress and ECF sigma factors, *Annu. Rev. Microbiol.* 55 (2001) 591-624.
- [92] P.A. DiGiuseppe, T.J. Silhavy, Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 2432-2440.
- [93] P.N. Danese, T.J. Silhavy, The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*, *Genes Dev.* 11 (1997) 1183-1193.
- [94] L. Connolly, Penas A. De Las, B.M. Alba, C.A. Gross, The response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is controlled by partially overlapping pathways, *Genes Dev.* 11 (1997) 2012-2021.
- [95] J. Pogliano, A.S. Lynch, D. Belin, E.C. Lin, J. Beckwith, Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system, *Genes Dev.* 11 (1997) 1169-1182.
- [96] E. Mileykovskaya, W. Dowhan, The Cpx two-component signal transduction pathway is activated in *Escherichia coli* mutant strains lacking phosphatidylethanolamine, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 1029-1034.
- [97] P. De Wulf, B.J. Akerley, E.C. Lin, Presence of the Cpx system in bacteria, *Microbiology* 146 (2000) 247-248.
- [98] T. Ueki, S. Inouye, Transcriptional activation of a heat-shock gene, *lonD*, of *Myxococcus xanthus* by a two-component histidine-aspartate phosphorelay system, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6170-6177.
- [99] A.M. Peier, A.J. Reeve, D.A. Andersson, A. Moqrich, T. J. Earley, A.C. Hergarden, G.M. Story, S. Colley, J.B. Hogenesch, P. McIntyre, S. Bevan, A. Patapoutian, A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes, *Science* (2002) 2046-2049.
- [100] M. Hagemann, A. Schoor, R. Jeanjean, E. Zuther, F. Joset, The *stpA* gene from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encodes the glucosylglycerol-phosphate phosphatase involved in cyanobacterial osmotic response to salt shock, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 1727-1733.
- [101] F. Engelbrecht, K. Marin, M. Hagemann, Expression of the *ggpS* gene, involved in osmolyte synthesis in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002, revealed regulatory differences between this strain and the freshwater strain *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4822-4829.
- [102] A.P. Gasch, P.T. Spellman, C.M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, P.O. Brown, Genomic expression programs in the re-

- sponse of yeast cells to environmental changes, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 4241-4257.
- [103] H.C. Causton, B. Ren, S.S. Koh, C.T. Harbison, E. Kanin, E.G. Jennings, T.I. Lee, H.L. True, E.S. Lander, R.A. Young, Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes, *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 323-337.
- [104] M. Rep, M. Krantz, J.M. Thevelein, S. Hohmann, The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high-osmolarity glycerol pathway-dependent genes, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 8290-8300.
- [105] J. Yale, H.J. Bohnert, Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 15996-16007.
- [106] Y. Hihara, A. Kamei, M. Kanehisa, A. Kaplan, M. Ikeuchi, DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light, *Plant Cell* 13 (2001) 793-806.
- [107] K. Mikami, Y. Kanasaki, I. Suzuki, N. Murata, The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Mol. Microbiol.* 46 (2003) 905-915.
- [108] Y. Hihara, K. Sonoike, M. Kanehisa, M. Ikeuchi, DNA microarray analysis of redox-responsive genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 1719-1725.
- [109] K. Marin, I. Suzuki, K. Yamaguchi, K. Ribbeck, H. Yamamoto, Y. Kanasaki, M. Hagemann, N. Murata, Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 9061-9066.
- [110] K. Nakashima, A. Sugiura, T. Mizuno, Functional reconstitution of the putative *Escherichia coli* osmosensor, KdpD, into liposomes, *J. Biochem.* 114 (1993) 615-621.
- [111] L. Qin, R. Dutta, H. Kurokawa, M. Ikura, M. Inouye, A monomeric histidine kinase derived from EnvZ, an *Escherichia coli* osmosensor, *Mol. Microbiol.* 36 (2000) 24-32.
- [112] S. Tokishita, A. Kojima, H. Aiba, T. Mizuno, Transmembrane signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*. Functional importance of the periplasmic domain of the membrane-located protein kinase, EnvZ, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 6780-6785.
- [113] K. Nakashima, A. Sugiura, K. Kanamaru, T. Mizuno, Signal transduction between the two regulatory components involved in the regulation of the *kdpABC* operon in *Escherichia coli*: phosphorylation-dependent functioning of the positive regulator, KdpE, *Mol. Microbiol.* 7 (1993) 109-116.
- [114] K. Nakashima, K. Kanamaru, H. Aiba, T. Mizuno, Osmoregulatory expression of the porin genes in *Escherichia coli*: evidence for signal titra-

- tion in the signal transduction through EnvZ-OmpR phosphotransfer, FEMS Microbiol. Lett. 66 (1991) 43-47.
- [115] T. van der Heide, B. Poolman, Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 7102-7106.
- [116] T. van der Heide, M.C. Stuart, B. Poolman, On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine, EMBO J. 20 (2001) 7022-7032.
- [117] D.C. Raitt, F. Posas, H. Saito, Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAP kinase pathway, EMBO J. 19 (2000) 4623-4631.
- [118] I.M. Ota, A. Varshavsky, A yeast protein similar to bacterial two-component regulators, Science 262 (1993) 566-569.
- [119] T. Maeda, S.M. Wurgler-Murphy, H. Saito, A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast, Nature 369 (1994) 242-245.
- [120] F. Posas, S.M. Wurgler-Murphy, T. Maeda, E.A. Witten, T.C. Thai, H. Saito, Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor, Cell 86 (1996) 865-875.
- [121] M. Rep, V. Reiser, U. Gartner, J.M. Thevelein, S. Hohmann, G. Ammerer, H. Ruis, Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p, Mol. Cell Biol. 19 (1999) 5474-5485.
- [122] S.I. Allakhverdiev, A. Sakamoto, Y. Nishiyama, M. Inaba, N. Murata, Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp, Plant Physiol. 123 (2000) 1047-1056.
- [123] T. Urao, B. Yakubov, R. Satoh, K. Yamaguchi-Shinozaki, M. Seki, T. Hirayama, K. Shinozaki, A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor, Plant Cell 11 (1999) 1743-1754.
- [124] S.I. Sukharev, P. Blount, B. Martinac, F. R. Blattner, C. Kung, A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone, Nature 368 (1994) 265-268.
- [125] S.I. Sukharev, P. Blount, B. Martinac, H. R. Guy, C. Kung, MscL: a mechanosensitive channel in *Escherichia coli*, Soc. Gen. Physiol. Ser. 51 (1996) 133-141.
- [126] S.I. Sukharev, M. Betanzos, C.S. Chiang, H.R. Guy, The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL, Nature 409 (2001) 720-724.
- [127] S. Sukharev, S.R. Durell, H.R. Guy, Structural models of the MscL gating mechanism, Biophys. J. 81 (2001) 917-936.

- [129] G. Chang, R.H. Spencer, A.T. Lee, M.T. Barclay, D.C. Rees, Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel, *Science* 282 (1998) 2220-2226.
- [130] L.V. Nazarenko, I.M. Andreev, A.A. Lyukevich, T.V. Pisareva, D.A. Los, Calcium release from *Synechocystis* cells induced by depolarization of the plasma membrane: MscL as an outward Ca^{2+} channel, *Microbiology GSM* 149 (2003) 1147-1153.
- [131] P. Blount, P.C. Moe, Bacterial mechanosensitive channels: integrating physiology, structure and function, *Trends Microbiol.* 7 (1999) 420-424.
- [132] P.C. Moe, G. Levin, P. Blount, Correlating a protein structure with function of a bacterial mechanosensitive channel, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 31121-31127.
- [133] B. Poolman, P. Blount, J.H. Folgering, R.H. Friesen, P.C. Moe, T. van der Heide, How do membrane proteins sense water stress? *Mol. Microbiol.* 44 (2002) 889-902.
- [134] E.K. Hoffmann, P.B. Dunham, Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation, *Int. Rev. Cytol.* 161 (1995) 173-262.
- [135] S.I. Sukharev, P. Blount, B. Martinac, C. Kung, Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities, *Annu. Rev. Physiol.* 59 (1997) 633-657.
- [136] S.-E. Jordt, T.J. Jentsch, Molecular dissection of gating in the CIC-2 chloride channel, *EMBO J.* 16 (1997) 1582-1592.
- [137] P.C. Biggin, M.S. Sansom, Channel gating: Twist to open, *Curr. Biol.* 11 (2001) R364-R366.
- [138] R. Rubenhagen, S. Morbach, R. Kramer, The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K, *EMBO J.* 20 (2001) 5412-5420.
- [139] M. Ishitani, L. Xiong, B. Stevenson, J.K. Zhu, Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways, *Plant Cell* 9 (1997) 1935-1949.
- [140] L. Xiong, M. Ishitani, J.K. Zhu, Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 119 (1999) 205-221.
- [141] M. Kasuga, Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 287-291.
- [142] K. Ichimura, T. Mizoguchi, R. Yoshida, T. Yuasa, K. Shinozaki, Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6, *Plant J.* 24 (2000) 655-665.

- [143] K. Mikami, I. Suzuki, N. Murata, Sensors of abiotic stress in *Synechocystis*, in: H. Hirt, K. Shinozaki (Eds.), Topics in Current Genetics, vol. 4, Plant Responses to Abiotic Stress, Springer-Verlag, Berlin, 2003, pp. 103-119.
- [144] V.V. Bartsevich, S.V. Shestakov, The *dspA* gene product of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 influences sensitivity to chemically different growth inhibitors and has amino acid similarity to histidine protein kinases, Microbiology 141 (1995) 2915-2920.
- [145] H. Ruis, C. Schuller, Stress signaling in yeast, Bioessays 17 (1995) 959-965.
- [146] O. van Wuytswinkel, V. Reiser, M. Siderius, M. C. Kelders, G. Ammerer, H. Ruis, W. H. Mager, Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway, Mol. Microbiol. 37 (2000) 382-397.
- [147] C. Godon, G. Lagniel, J. Lee, J.M. Buhler, S. Kieffer, M. Perrot, H. Boucherie, M.B. Toledano, J. Labarre, The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem. 273 (1998) 22480-22489.
- [148] E. Kiegle, C.A. Moore, J. Haseloff, M.A. Tester, M.R. Knight, Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root, Plant J. 23 (2000) 267-278.
- [149] H. Knight, M.R. Knight, Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk, Trends Plant Sci. 6 (2001) 262-267.