

УДК 577.112

Белки системы врожденного иммунитета растений, осуществляющие транспорт липидов: структура, функции и практическое применение

Е. И. Финкина, Д. Н. Мельникова, И. В. Богданов, Т. В. Овчинникова*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: ovch@ibch.ru

Поступила в редакцию 05.08.2015

Принята к печати 18.12.2015

РЕФЕРАТ Среди множества молекулярных факторов системы врожденного иммунитета растений особый интерес представляют небольшие белки, осуществляющие транспорт липидов и обладающие широким спектром биологической активности. Эти белки называют липид-переносчиками или липид-транспортирующими (ЛТБ). Можно выделить три основных аспекта, в контексте которых ЛТБ привлекают интерес исследователей. Первый из них – способность растительных ЛТБ связывать и переносить липиды, благодаря чему эти белки получили свое название и были объединены в один класс. Во-вторых, ЛТБ относятся к защитным белкам, являющихся факторами врожденного иммунитета растений. Кроме того, ЛТБ составляют один из наиболее клинически значимых классов растительных аллергенов. Цель настоящего обзора состоит в обобщении имеющихся данных о структуре, свойствах, функциях, механизмах действия и практическом применении ЛТБ для углубления понимания роли этих белков в физиологии растений и их значения в жизни человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аллергены, антимикробная активность, защита растений, липид-транспортирующие белки растений, перекрестная реактивность, связывание и перенос липидов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЛТБ – липид-транспортирующие белки; ЖК – жирные кислоты; ФХ – фосфатидилхолины; ФИ – фосфатидилинозиты; ФГ – фосфатидилглицерины; PRP (Pathogenesis-Related Proteins) – белки, связанные с патогенезом; AMP (Antimicrobial Peptides) – антимикробные пептиды; PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) – ассоциированные с патогенами молекулярные структуры; DAMP (Damage Associated Molecular Patterns) – молекулярные структуры, ассоциированные с повреждением; ГФИ-якорь – гликозилфосфатидилинозитный якорь; АФК – активные формы кислорода; SAR (Systemic Acquired Resistance) – системная приобретенная резистентность; HR (Hypersensitive Response) – гиперчувствительный ответ; АСИТ – аллерген-специфическая иммунотерапия.

ВВЕДЕНИЕ

Липиды и их производные принимают участие в самых разнообразных процессах, включая биогенез мембран, дифференцировку клеток, межклеточную и внутриклеточную передачу сигналов, образование водоотталкивающих и термоизоляционных покровов, защищающих растение от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды, а также выполняют запасающую и энергетическую функции. В клетках про- и эукариот важную роль в метаболизме липидов играют белки, осуществляющие их внутри- и внеклеточный транспорт. В растениях

обнаружено несколько классов белков, обладающих способностью связывать и транспортировать липиды и их производные: ацил-КоА-связывающие белки (Acyl-CoA-Binding Proteins), гликолипид-транспортирующие белки (Glycolipid Transfer Proteins), стерин-переносящие белки (Sterol Carrier Proteins), гомологи основного пыльцевого аллергена березы *Betula verrucosa*, зарегистрированного в базе данных аллергенов IUIS под аббревиатурой Bet v 1, белки, связывающие жирные кислоты (Fatty Acid Binding Proteins), пуриноидолины (Puroindolines) и липид-транспортирующие белки (Lipid Transfer Proteins).

Сравнительная характеристика двух подклассов растительных ЛТБ

Характеристика	ЛТБ1	ЛТБ2
M_r , кДа	9–10	6–7
Число аминокислотных остатков, а.о.	90–95	65–70
Консервативные а.о.	C, G, P, R, Y(F)	C, Q, P, Y(F)
Мотив $-C^VXC^{VI}-$	X – гидрофильный а.о. (как правило, N), экспонирован на поверхности молекулы белка	X – гидрофобный а.о. (чаще всего F), обращен внутрь молекулы белка
Организация дисульфидных связей	C^I-C^{VI} , $C^{II}-C^{III}$, $C^{IV}-C^{VII}$, C^V-C^{VIII}	C^I-C^V , $C^{II}-C^{III}$, $C^{IV}-C^{VII}$, $C^{VI}-C^{VIII}$
Пространственная структура	4 α -спирали, фрагмент 3_{10} -спирали и неструктурированный C-концевой фрагмент	3 α -спирали и область, содержащая одиночные повороты спирали
Форма гидрофобной впадины	Туннель с большим и малым входом, в его формировании принимают участие спирали H1, H2 и H3, расположенные параллельно друг другу	Трехгранный полый бокс, спирали H1 и H2 располагаются параллельно друг другу, а спираль H3 направлена под углом 90° относительно H2
Способность связывать стеринны	Нет	Есть
Взаимодействующие с лигандом а.о.	Arg44 и Tyr79 (нумерация для ЛТБ1 риса)	Phe36, Tyr45 и Tyr48 (нумерация для ЛТБ2 риса)
Сигнальный пептид, а.о.	21–27	27–35
Локализация	Органы, покрытые слоем кутина (листья, стебли, цветки)	Органы, покрытые слоем суберина (подземные органы)
Одна из предполагаемых функций	Биосинтез кутина	Биосинтез суберина
Активация иммунного ответа	Элиситоры в комплексе с жасмоновой кислотой	Элиситоры в комплексе со стеринном
Аллергены, зарегистрированные в IUIS	ЛТБ1 42 растений (не считая изоаллергенов и вариантов)	Sola l 6 томата, Api g 6 сельдерея, Ara h 16 арахиса

Сопоставление аминокислотных последовательностей белков перечисленных классов выявило отсутствие значительной структурной гомологии между ними. Эти белки имеют внутри- или внеклеточную локализацию, относительно небольшую молекулярную массу (7–30 кДа), высокое значение изоэлектрической точки (pI ~9–11) и компактную структуру, стабилизированную дисульфидными связями. Для пространственной структуры белков, осуществляющих транспорт липидов, характерно наличие гидрофобной впадины, внутри которой располагается сайт связывания лигандов. Эти белки обратимо связывают липиды и доставляют их к месту назначения. Белки некоторых из перечисленных классов имеют высокоспецифичные лиганды, другие белки связывают и переносят широкий спектр липидов.

К функционально наиболее значимым классам белков растений, связывающих и переносящих липиды, относятся ЛТБ. Эти белки были открыты в 1970 г. и первоначально названы фосфолипид-обменивающими белками [1], а позднее переименованы в фосфолипид-транспортирующие белки [2]. Дальнейшие исследования показали, что лигандами данных белков могут быть не только фосфолипиды, но и другие гидрофобные молекулы, в связи с чем ЛТБ получили

свое нынешнее название – неспецифические липид-транспортирующие белки [3].

СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛТБ РАСТЕНИЙ

На основании особенностей структурной организации растительные ЛТБ подразделяются на два подкласса: ЛТБ1 с молекулярной массой 9–10 кДа и ЛТБ2 с молекулярной массой около 7 кДа (таблица). Гомология аминокислотных последовательностей у представителей двух подклассов не превышает 30% (рис. 1). Все ЛТБ являются основными белками (pI ~9–10). Подавляющее большинство ЛТБ содержат восемь консервативных остатков цистеина ($..C^I...C^{II}...C^{III}C^{IV}...C^VXC^{VI}...C^{VII}...C^{VIII}..$), образующих четыре дисульфидные связи, которые стабилизируют структуру и тем самым обуславливают устойчивость ЛТБ к действию высоких температур и протеолитических ферментов. Некоторые представители белков этого класса сохраняют нативную конформацию и биологическую активность даже после прогревания при температуре около 100°C [4]. Пространственная структура ЛТБ представлена в основном α -спиральными участками. Гидрофобные аминокислотные остатки ЛТБ обращены внутрь молекулы и не вступают в близкий контакт, формируя внутри белка впадину, содержащую по-

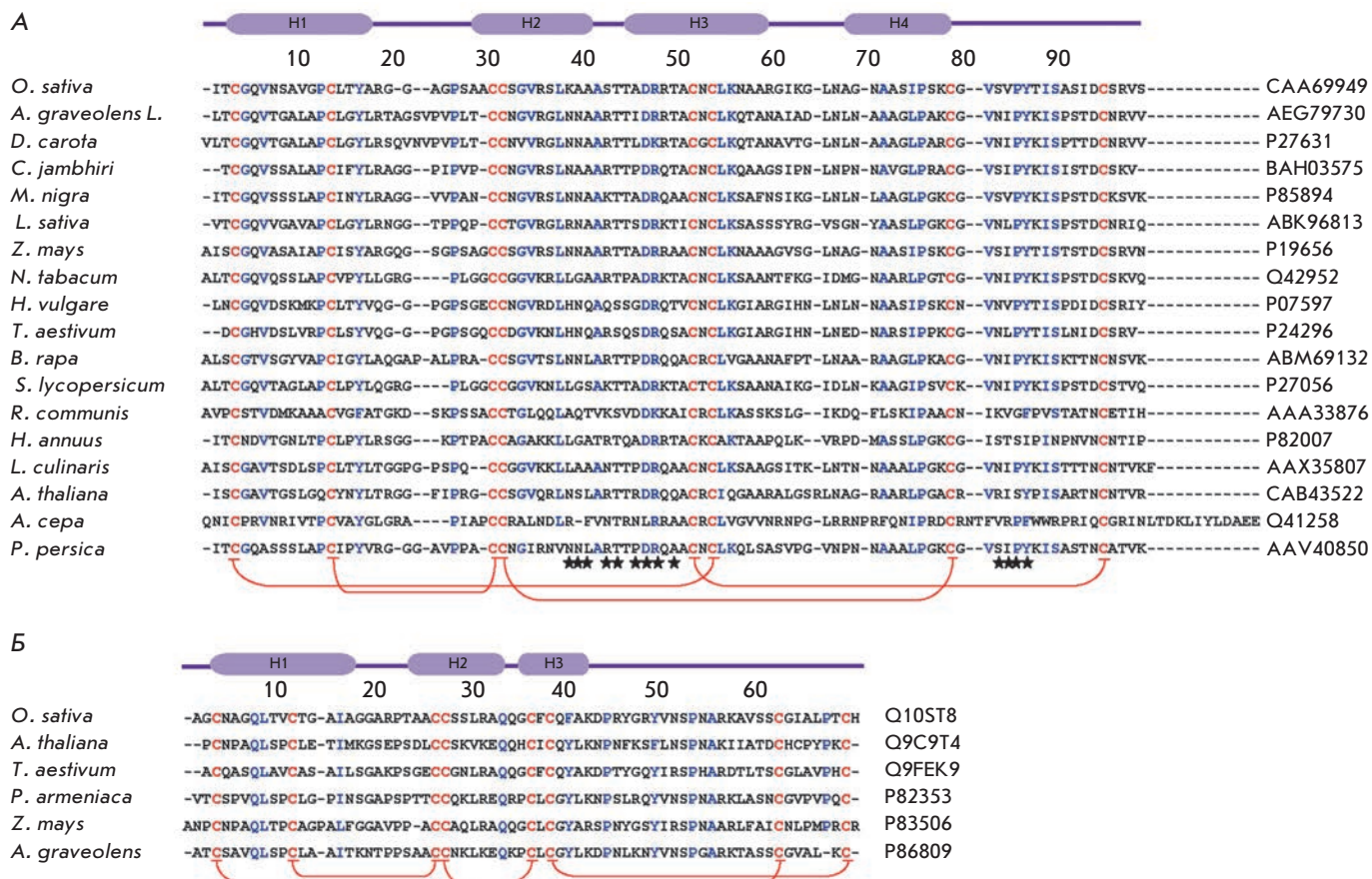


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей (А) ЛТБ1 и (Б) ЛТБ2. Красным цветом выделены консервативные остатки цистеина, синим – остатки, характерные для большинства представителей подкласса. Скобками показана организация дисульфидных связей. Сверху показано расположение α -спиралей в структурах ЛТБ1 (PDB ID: 1RZL) [5] и ЛТБ2 (PDB ID: 1L6H) [10] риса. Звездочками отмечены остатки, составляющие конформационные эпитопы Pru р 3 (GenBank: AAV40850) [98]

тенциальный сайт связывания гидрофобных и амфифильных молекул, таких, как липиды.

ЛТБ1 состоят из 90–95 аминокислотных остатков и имеют следующий порядок образования дисульфидных связей: C^I–C^{VI}, C^{II}–C^{III}, C^{IV}–C^{VII}, C^V–C^{VIII} (рис. 1А, 2А). Фрагмент –C^VXC^{VI}– в структуре ЛТБ1 содержит гидрофильную аминокислоту (чаще всего аспарагин), боковая группа которой экспонирована на поверхности молекулы. Пространственная структура этих белков сформирована четырьмя α -спиралями, фрагментом 3_{10} -спирали и протяженным неструктурированным С-концевым участком (рис. 2А) [5, 6]. В структуре некоторых ЛТБ1, например, выделенных из кукурузы (*Zea mays*) и табака (*Nicotiana tabacum*), спирали Н1 и Н4 разделены остатками пролина на два фрагмента (Н1а и Н1б, Н4а и Н4б соответственно). Гидрофобная впадина ЛТБ1 имеет форму вытянутого туннеля, в формировании которого принимают

участие спирали Н1, Н2 и Н3, расположенные параллельно друг другу. Гидрофобный характер поверхности туннеля обусловлен боковыми радикалами таких аминокислотных остатков, как Ile, Val, Leu, Ala, но наряду с этим в формировании впадины участвуют гидрофильные остатки Arg, Lys, Ser [7]. Туннель в молекулах белков ЛТБ1 имеет два входа, различающихся по размеру. У большинства ЛТБ1 около большого входа располагается основной остаток Arg44 (нумерация относительно ЛТБ1 риса *Oryza sativa*), который взаимодействует с полярными головками липидов [8]. У ЛТБ1 риса в этом взаимодействии принимает участие еще один основной остаток – Lys35. Кроме остатков цистеина в молекуле большинства ЛТБ1 присутствуют консервативные остатки глицина и пролина, обеспечивающие повороты между спиралями; два остатка тирозина, один из которых находится в N-концевой области на внешней стороне α -спирали,

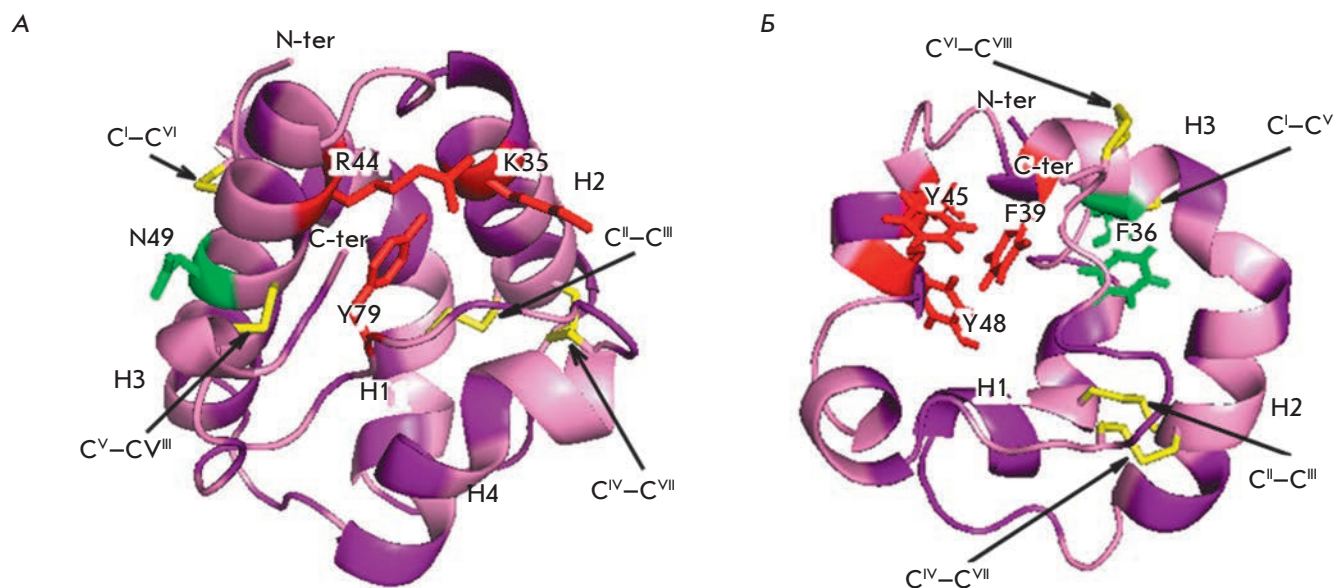


Рис. 2. Пространственные структуры (А) ЛТБ1 (PDB ID: 1RZL) и (Б) ЛТБ2 (PDB ID: 1L6H) из риса в ленточном представлении. Указаны номера α -спиралей (H1–H4). Фиолетовым цветом показаны гидрофобные остатки, красным – остатки, взаимодействующие с липидным лигандом [5, 10], желтым – дисульфидные связи, зеленым – остаток во фрагменте $-C^VXC^{VI}-$, обращенный наружу или внутрь молекулы белка

а второй расположен в С-концевой области у большого входа в гидрофобный туннель и участвует во взаимодействии с лигандами [7, 9].

ЛТБ2, состоящие из 65–70 аминокислотных остатков, изучены в меньшей степени, чем ЛТБ1. ЛТБ2 во фрагменте $-C^VXC^{VI}-$ в качестве центрального остатка чаще всего содержат фенилаланин, обращенный внутрь молекулы, и имеют иную организацию дисульфидных связей: C^I-C^V , $C^{II}-C^{III}$, $C^{IV}-C^{VII}$, $C^{VI}-C^{VIII}$ (рис. 1Б, 2Б) [10]. Пространственная структура белков этого подкласса включает три α -спирали и область, содержащую одиночные витки спирали (рис. 2Б). В структуре ЛТБ2 спирали H1 и H2 располагаются параллельно друг другу, а спираль H3 направлена под углом 90° относительно H2. Гидрофобная впадина ЛТБ2 по форме напоминает трехгранный полый бокс с расположенными внутри боковыми радикалами остатков Ala, Ile, Leu, Phe и Val. Трехгранный бокс ЛТБ2 по объему меньше гидрофобной полости ЛТБ1, однако его более выраженная пластичность позволяет белкам этого подкласса связывать крупные лиганды с жесткой структурой, например стеринны [10–12]. Боковые радикалы Phe39, Tyr45 и Tyr48 (нумерация относительно ЛТБ2 риса) повернуты внутрь полости и контактируют с липидным лигандом [13]. Помимо остатков цистеина в структуре ЛТБ2 присутствуют консервативные остатки Gln, Tyr и Pro.

Объем гидрофобной впадины у ЛТБ обоих подклассов может значительно изменяться. Например, размер гидрофобной впадины у ЛТБ1 риса равен 249 \AA^3 , однако при связывании белка с пальмитиновой кислотой ее объем увеличивается до 1354 \AA^3 . Такая пластичность молекул ЛТБ может быть причиной их низкой специфичности к липидному лиганду.

СВЯЗЫВАНИЕ И ТРАНСПОРТ ЛИПИДОВ

Наличие в структуре молекул ЛТБ гидрофобной впадины позволяет этим белкам связывать и переносить различные лиганды. Образование комплексов ЛТБ с лигандами *in vitro* зависит от размера гидрофобной полости и формирующих ее аминокислотных остатков, пространственной структуры лиганда, а также от условий эксперимента (рН, состав буфера, температура). Показано, что ЛТБ, выделенные из различных растительных источников, способны связывать липиды. Однако стоит отметить, что существуют и исключения из этого правила. Так, белок из семян лука (*Allium sepa*), названный Ace-AMP1, обладает выраженной гомологией с растительными ЛТБ, но не взаимодействует с липидами, возможно, из-за отсутствия единой полости внутри молекулы белка [14].

Различные ЛТБ связывают широкий спектр лигандов, включая жирные кислоты (ЖК) с длиной цепи $C_{10}-C_{18}$, ацильные производные коэнзима

А (КоА), фосфо- и галактолипиды, простагландин В₂, стерины, молекулы органических растворителей и некоторые лекарственные вещества [15, 16]. Хотя выраженной специфичности в отношении лигандов у ЛТБ нет, наиболее прочные комплексы эти белки образуют с ЖК, содержащими от 16 до 18 углеродных атомов. С молекулами, длина цепи которых превышает С₂₀, ЛТБ не образуют устойчивых комплексов из-за пространственных ограничений, налагаемых размерами гидрофобной впадины [17]. Кроме того, показано, что на прочность комплекса влияет количество двойных связей в молекулах ЖК и их конфигурация. Наиболее прочные комплексы ЛТБ образуют с различными непредельными ЖК с одной или двумя двойными связями в *cis*-конфигурации [18], две из которых – линолевая и олеиновая кислоты – являются предшественниками мономеров кутина и суберина.

ЛТБ₁, в отличие от ЛТБ₂, не связывают стерины. Установлено, что в зависимости от пространственной организации молекул ЛТБ₁ и лиганда ориентация последнего в гидрофобной впадине может быть различной. Например, в комплексах ЛТБ₁ кукурузы с 1-пальмитоиллизофосфатидилхолином [9] и ЛТБ₁ пшеницы (*Triticum aestivum*) с димиристоилфосфатидилглицерином [18] лиганды размещаются в полости белка в «прямой» ориентации, т.е. полярные головки липидов расположены вблизи большого входа в гидрофобную впадину. В то же время в комплексе ЛТБ₁ ячменя (*Hordeum vulgare*) с пальмитоил-КоА лиганд имеет «обратную» ориентацию, его алифатические цепи сильно изогнуты и полярная головка направлена в сторону меньшего входа впадины [19].

ЛТБ₁ растений могут связывать одну или две молекулы лизофосфолипида [20]. Предполагается, что ЛТБ этого подкласса взаимодействуют с лигандами согласно кооперативной модели связывания. Если в гидрофобной полости находятся две молекулы лиганда, то их ориентация и прочность связывания с белком не одинаковы. Так, в комплексе ЛТБ₁ пшеницы с лизомиристоилфосфатидилхолином две молекулы этого лиганда ориентированы в гидрофобной полости по принципу «голова к хвосту» [19, 21]. Высказывается предположение, что второй сайт связывания в ЛТБ активируется только тогда, когда первый уже занят лигандом.

Показано, что в регуляции связывания липидов растительными ЛТБ принимает участие кальций-кальмодулиновая система. Растительные ЛТБ связываются с кальмодулином вне зависимости от присутствия ионов кальция. Потенциальный сайт связывания кальмодулина с Zm-LTP кукурузы и Ase-AMP1 лука лежит в средней части полипептидной цепи ЛТБ (аминокислотные остатки

46–60) и имеет структуру, сходную с ВАА-доменом (Basic Amphiphilic α -helix) кальмодулин-связывающих белков [22]. Отличительной особенностью ВАА-подобного домена у растительных ЛТБ является отсутствие Trp, имеющего решающее значение для кальций-зависимого связывания кальмодулина. В присутствии кальмодулина у Zm-LTP кукурузы снижается способность связывать липиды, что объясняется локализацией в кальмодулин-связывающем центре этого белка остатка Arg46, участвующего в связывании липидов. В то же время сайт связывания кальмодулина у белка репы (*Brassica rapa*), названного BP-10, и ЛТБ₁ арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) находится в С-концевой области (аминокислотные остатки 69–81) и не имеет структурного сходства ни с одним из известных кальмодулин-связывающих центров [23]. Образование комплекса BP-10 с кальмодулином приводит к повышению эффективности связывания липидов. Причиной этого эффекта считается расположение в кальмодулин-связывающем центре данного ЛТБ остатка Tyr81, играющего важную роль во взаимодействии с липидным лигандом.

ЛТБ растений не только связывают липиды, но и осуществляют их перенос между мембранами в опытах *in vitro*. Они переносят фосфолипиды, например, фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидилинозиты (ФИ), фосфатидилглицерины (ФГ) и их производные, а также ацил-КоА [24–26]. На примере ЛТБ пшеницы показано, что липид-транспортующая активность ЛТБ₂ в несколько раз выше, чем у ЛТБ₁ [27].

Механизм транспортировки липидов с участием ЛТБ до сих пор неизвестен. Предполагается, что растительные ЛТБ, так же как и фосфатидилхолин-специфичные ЛТБ млекопитающих, переносят липиды по челночному механизму. Комплекс ЛТБ–фосфолипид взаимодействует с мембраной, в результате чего происходит обмен фосфолипидами между комплексом и мембраной [3].

Прямые доказательства участия ЛТБ растений в связывании и переносе липидов *in vivo* до сих пор отсутствуют. Единственным комплексом ЛТБ с лигандом, обнаруженным в растительных клетках, является ковалентный аддукт LTP1 ячменя с оксипином, образующийся при взаимодействии карбоксильной группы Asp7 с оксидом аллена в молекуле 9(*S*),10-эпокси-10,12(*Z*)-октадекадиеновой кислоты [28, 29]. В результате реакции образуется α -кетол – 9-гидрокси-10-оксо-12(*Z*)-октадеценная кислота. Необходимо отметить, что образование этого ковалентного комплекса, получившего название LTP1b, приводит к увеличению пластичности гидрофобной впадины белка и его способности переносить липиды.

Некоторые ЛТБ способны не только связывать и переносить липиды, но и разрушать модельные мембраны. В качестве примера можно привести белок подсолнечника (*Helianthus annuus*), названный Ha-AP10, который разрушает липосомы, состоящие из ФХ и ФГ [30]. Интересно отметить отсутствие корреляции между липид-связывающей и липид-переносающей активностью и способностью ЛТБ разрушать мембраны. Например, ЛТБ ячменя связывает широкий спектр липидов, однако слабо влияет на свойства модельных мембран [31]. Асе-AMP1 лука не связывает липиды, но нарушает целостность двухслойных везикул, состоящих из анионных липидов [14].

БИОСИНТЕЗ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ

Класс ЛТБ относится к большому семейству белков, связанных с патогенезом (Pathogenesis-Related Proteins, или PRP). Индукция синтеза данных белков происходит при воздействии на растение абиотических и биотических стрессорных факторов и лежит в основе одного из ключевых защитных механизмов, имеющихся в арсенале растений. PRP присутствуют во всех органах растений, накапливаются в вакуолях и апопласте, а также в первичной и вторичной клеточной стенке. Такая локализация согласуется с защитной функцией PRP, которые, наряду с антимикробными пептидами (AMP), создают своеобразный барьер на пути проникновения патогена [32].

Семейство белков, связанных с патогенезом, помимо ЛТБ (PRP-14), включает белки еще 16 классов: глюканазы (PRP-2), хитиназы (PRP-3,4,8), ингибиторы протеиназ (PRP-6), гомологи основного пыльцевого аллергена березы Bet v 1 (PRP-10), дефенсины (PRP-12), тионины (PRP-13) и др. [33]. Абиотическими индукторами синтеза PRP являются УФ-излучение, осмотический шок, дефицит влаги, низкие температуры, засоление почвы. Синтез PRP при инфицировании растения индуцируется как первичными, так и вторичными элиситорами – неспецифическими патоген-ассоциированными молекулярными структурами (Pathogen Associated Molecular Patterns, или PAMP), и структурами, ассоциированными с повреждением (Damage-Associated Molecular Patterns, или DAMP), а также специфическими эффекторными белками патогенов. Индукторами синтеза PRP являются такие фитогормоны, как этилен, ауксины, абсцизовая, жасмоновая и салициловая кислоты. На определенных стадиях онтогенеза активация синтеза и тканеспецифичная аккумуляция PRP происходят также в отсутствие факторов стресса [34].

ЛТБ обнаружены в различных органах растений – семенах, листьях, стеблях, корнях, цветках и плодах.

Чаще всего ЛТБ локализируются в покрытых кутикулой клетках эпидермиса, но обнаруживаются также в эмбриональных и сосудистых тканях. ЛТБ синтезируются в растительных клетках в виде пребелков, содержащих гидрофобную сигнальную последовательность (21–27 или 27–35 аминокислотных остатков у ЛТБ1 или ЛТБ2 соответственно), и являются секреторными белками с преимущественно внеклеточной локализацией [35, 36]. Некоторые ЛТБ имеют нехарактерную внутриклеточную локализацию. Так, ЛТБ из семян клещевины (*Ricinus communis*) обнаружен в глиоксисомах [37], ЛТБ из семян вигны (*Vigna unguiculata*) – в вакуолях [38], Ca-LTP(1) из семян перца (*Capsicum annuum*) – в везикулах [39]. Особый интерес представляет вопрос о том, каким образом ЛТБ, синтезируемые в виде пребелков и не имеющие соответствующих сигнальных последовательностей, попадают в эти клеточные органеллы. Установлено, что ЛТБ подсолнечника Ha-AP10 изменяет свою локализацию. В покоящихся семенах Ha-AP10 находится в апопласте, но при набухании и прорастании семени, возможно, с помощью эндоцитоза, поступает внутрь клеток и переходит в органеллы, участвующие в метаболизме липидов [40].

В некоторых растениях обнаружены ЛТБ, названные LTPG (GPI-anchored Lipid Transfer Proteins), которые синтезируются в виде предшественников, содержащих помимо N-концевого сигнального пептида C-концевую сигнальную последовательность. Эта последовательность обеспечивает посттрансляционное присоединение к белку гликозилфосфатидилинозитного якоря (ГФИ), благодаря которому LTPG могут локализоваться на внешней стороне плазматической мембраны или секретироваться в апопласт после отщепления ГФИ-якоря [41]. Еще одну группу необычных ЛТБ, имеющих внеклеточную локализацию, составляют ксилоген из циннии (*Zinnia elegans*) и ксилоген-подобные белки других растений [42]. В структуре генов ксилоген-подобных белков, которые относятся к большому семейству арабиногалактановых белков (АГБ), присутствует сигнальный пептид, домен ЛТБ, несколько доменов АГБ и ГФИ-якорь. В процессе созревания эти белки претерпевают ряд посттрансляционных превращений, включая удаление N-концевого сигнального пептида, присоединение ГФИ-якоря, гидроксилирование остатков пролина и O-гликозилирование [42].

ЛТБ растений кодируются мультигенными семействами и в геноме растений, как правило, представлены набором генов, кодирующих различные изоформы. Экспрессия генов различных изоформ ЛТБ отличается ярко выраженной тканевой специфичностью и происходит на определенных стадиях онтогенеза [36]. Предполагается, что это связано

с тем, что разные изоформы ЛТБ выполняют различные функции [43]. Дифференциальная экспрессия генов множественных изоформ ЛТБ происходит также при воздействии на растение различных абиотических и биотических факторов окружающей среды и может рассматриваться как один из элементов защитной стратегии в условиях стресса [44]. Дифференциальная экспрессия генов изоформ показана на примерах ЛТБ кунжута (*Sesamum indicum*) [45], арабидопсиса [43, 46], перца [47], клещевины [37], винограда (*Vitis vinifera*) [48], тамарикса жестковолосистого (*Tamarix hispida*) [49] и томата (*Lycopersicon pennellii*) [50].

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

ЛТБ, как уже упоминалось, составляют один из классов защитных PRP, многие из которых обладают антимикробной и ферментативной активностями или являются ингибиторами ферментов. Различные представители класса ЛТБ проявляют антибактериальную, противогрибковую, противовирусную, антипролиферативную активности, обладают способностью влиять на активность разнообразных ферментов [36].

Антимикробная активность

Многие ЛТБ обладают антимикробной активностью и ингибируют рост таких фитопатогенных бактерий и грибов, как *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas solanacearum*, *P. syringae*, *Alternaria brassicola*, *Ascochyta pisi*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae* и др. ЛТБ из перца и кофе (*Coffea canephora*) активны также в отношении патогенных для человека штаммов грибов рода *Candida* [39, 51]. Антимикробное действие большинства растительных ЛТБ характеризуется специфичностью и проявляется в отношении определенного спектра микроорганизмов. Выраженной антимикробной активностью в микромолярных концентрациях обладают ЛТБ из лука [52], редиса (*Raphanus sativus*) [52] и арабидопсиса [53]. Основная же масса ЛТБ умеренно или слабо влияет на рост микроорганизмов, в некоторых случаях это влияние вообще отсутствует [54]. Антимикробная активность ЛТБ растений снижается в растворах с высокой концентрацией соли и в присутствии ионов кальция, что сближает данные белки с другими классами растительных АМР и PRP [52]. Как и растительные дефенсины, ЛТБ обладают способностью действовать в синергизме с тионинами [55], не оказывают токсического действия на растительные клетки и клетки млекопитающих, включая фибробласты и эритроциты [30, 52].

Разрушение дисульфидных связей, стабилизирующих структуру растительных ЛТБ, приводит к тому, что эти белки теряют способность ингибировать рост микроорганизмов и связывать липиды [56]. В то же время другие аминокислотные остатки, необходимые для проявления антимикробной активности, остаются неизвестными. Для LTP110 из риса показано, что для проявления антимикробной активности этого белка важны консервативные остатки Tyr17, Arg46 и Pro72, которые у большинства ЛТБ1 играют существенную роль в стабилизации структуры белка [57]. При изучении изоформ ЛТБ пшеницы показано, что отличие всего в один аминокислотный остаток (Pro3Ser в изоформах TaLt10B6 и TaLt710H24, Asn24Ser в TaLt10F9 и TaBs116G9) существенно влияет на антимикробную активность белков. Предполагается, что замена даже одного аминокислотного остатка может приводить к изменению пространственной структуры ЛТБ и влиять на распределение положительного заряда на поверхности его молекулы [56].

На сегодняшний день установлено, что антимикробная активность растительных ЛТБ не связана с их способностью взаимодействовать с липидами. Так, на примере восьми изоформ ЛТБ пшеницы показано отсутствие корреляции между способностью этих белков ингибировать рост патогенных микроорганизмов и связывать липиды [56]. На примере Ас-АМР1 лука [52] и мутантной изоформы ЛТБ риса [57] также показано, что белки данного класса могут обладать антимикробной активностью, но не связывать при этом молекулы липидов и наоборот.

Растительные ЛТБ оказывают не только фунгистатическое, но и фунгицидное действие и подобно другим АМР вызывают нарушение проницаемости модельных мембран [30] и цитоплазматических мембран фитопатогенных грибов [30, 56]. Так, ЛТБ лука [14], подсолнечника [30] и в меньшей степени ячменя [31] обладают способностью нарушать проницаемость липосом, состоящих только из анионных фосфолипидов или из смеси анионных и нейтральных фосфолипидов, вызывая утечку из них флуоресцентного красителя. Однако стоит отметить, что этот эффект выражен гораздо слабее, чем у других АМР растений, и наблюдается только в растворах с низкой ионной силой.

Механизм антимикробного действия представителей класса ЛТБ до сих пор неизвестен. Тем не менее возможной мишенью антимикробного действия ЛТБ считается цитоплазматическая мембрана. Предполагается, что растительные ЛТБ, как и другие катионные мембранотропные АМР, связываются посредством электростатических взаимодействий с цитоплазматической мембраной фитопатогена,

вызывая ее дестабилизацию и нарушение проницаемости. Ослаблением электростатического взаимодействия с клеточной мембраной фитопатогена объясняется менее выраженная антимикробная активность изоформ ЛТБ, содержащих меньше основных аминокислотных остатков [56]. Считается, что возможной причиной избирательной токсичности ЛТБ растений могут быть различия в липидном составе мембран клеток бактерий, грибов, растений и млекопитающих.

Противовирусная, антипролиферативная активность

Показано, что ЛТБ нарцисса (*Narcissus tazetta*) и капусты полевой (*Brassica campestris*), называемой также сурепицей, обладают противовирусной активностью и способностью ингибировать пролиферацию опухолевых клеток человека. ЛТБ нарцисса, обозначенный как NTP, в экспериментах *in vitro* значительно ингибировал образование бляшек респираторного синцитиального вируса (RSV) и цитопатический эффект вируса гриппа А (H1N1), а также пролиферацию линии клеток промиелоцитарного лейкоза человека (HL-60). ЛТБ капусты полевой подавлял активность обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека типа 1 (HIV-1), а также пролиферацию клеток злокачественной гепатомы HepG2 и рака молочной железы MCF7. Механизм противоопухолевой активности ЛТБ пока не установлен [58, 59].

Ингибирование активности ферментов

Отдельные представители класса ЛТБ, как и ингибиторы протеаз (PRP-6), и некоторые дефенсины (PRP-12) [60, 61], обладают способностью подавлять активность протеолитических ферментов и α -амилаз. Так, обнаружено, что ЛТБ обоих подклассов из семян ячменя ингибируют активность цистеиновых эндопротеаз [62]. Также показано, что ЛТБ1 из семян гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba*) подавляет активность цистеиновой (папаин), аспартагной (пепсин) и сериновой (трипсин) протеаз [63]. ЛТБ1 из семян кофе и перца ингибируют активность α -амилазы человека [39, 51]. Как полагают, ЛТБ, способные ингибировать активность собственных и чужеродных ферментов, могут принимать участие как в развитии и прорастании семян, так и в защите растения от насекомых и травоядных животных.

ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ ЛТБ

Известно, что ЛТБ играют важную роль в растениях. Выключение генов, кодирующих данные белки, приводит к нарушению вегетативного и репродуктивного развития растений, снижению их устойчивости

к инфекциям [43, 64, 65]. На основании результатов исследований по подавлению экспрессии генов ЛТБ высказан ряд предположений о возможном участии представителей данного класса белков в адаптации растений к стрессу, метаболизме липидов, эмбриогенезе, росте и размножении растений, симбиозе и других процессах. Считается, что многие из этих функций обусловлены способностью ЛТБ связывать и переносить молекулы липидов (рис. 3).

Участие в метаболизме липидов

В связи с тем, что растительные ЛТБ обладают способностью связывать и переносить молекулы липидов, считается, что эти белки принимают участие в целом ряде процессов, сопровождающихся изменениями липидного состава. Для ЛТБ, имеющих внеклеточную локализацию, предполагается участие в формировании защитного слоя кутикулы, мономерные компоненты которой образуются в эпидермальных клетках и доставляются к месту биосинтеза. Активация биосинтеза кутикулы, которая играет важную роль в поддержании водного баланса и защите растений от проникновения патогенов, происходит в условиях действия разнообразных стрессорных факторов и является одним из защитных механизмов растений. Прямых доказательств причастности ЛТБ к этому процессу пока не найдено, однако показано, что растительные ЛТБ присутствуют в высоких концентрациях в эпидермальных тканях и способны связывать жирные кислоты, необходимые для синтеза кутина и суберина. Кроме того, индукция синтеза ЛТБ сопровождается утолщением слоя кутикулы [66], а выключение генов ЛТБ приводит к изменению липидного состава и плотности кутикулярного слоя [67]. Предложено два возможных механизма доставки компонентов кутикулы с участием ЛТБ. В соответствии с первым из них ЛТБ поступают в клетку посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, осуществляемого при слиянии везикул, содержащих ЛТБ и мономеры кутина. Второй механизм предполагает функционирование ЛТБ между плазматической мембраной и клеточной стенкой растения и существование молекулы-переносчика, действующего с внутренней стороны плазматической мембраны [68]. Интересен тот факт, что ЛТБ1 присутствуют в органах, покрытых слоем кутина (листья, стебли, цветки), в то время как ЛТБ2 обнаруживаются в покрытых суберином подземных органах. Это свидетельствует в пользу дифференциального участия белков первого и второго подклассов в формировании кутинового и суберинового слоев [35]. Показано также, что LTRG, имеющие ГФИ-якорь, возможно, принимают участие в биосинтезе и накоплении суберина [41].

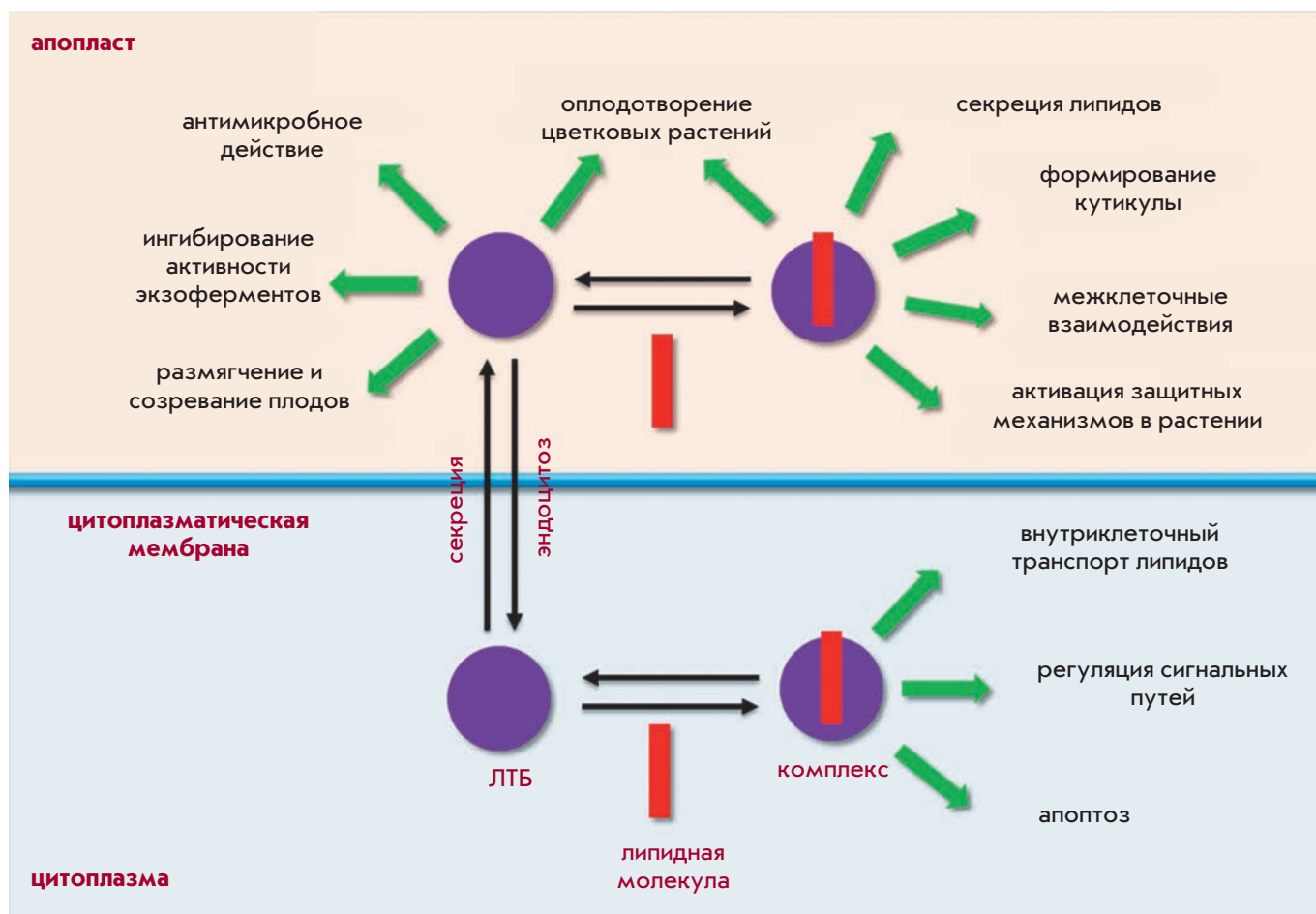


Рис. 3. Возможные функции ЛТБ в растениях

ЛТБ, обнаруженные в различных внутриклеточных органеллах, предположительно участвуют в мобилизации липидов, осуществляя их транспорт, например при прорастании семени. Так, ЛТБ клебсиды, обнаруженный в глиоксисомах, связывает ЖК как в свободной форме, так и в виде ацил-КоА. Этот белок увеличивает также активность ацил-КоА-оксидазы, которая участвует в реакции β-окисления ЖК [37]. Предполагается, что ЛТБ подсолнечника Na-AP10, поступающий в клетки при прорастании семян, переносит в глиоксисомы ЖК, высвободившиеся при расщеплении триацилглицеридов, для их дальнейшего β-окисления [40].

Показано, что индукция экспрессии генов, кодирующих ЛТБ моркови (*Daucus carota*), наблюдается на ранних стадиях эмбриогенеза, когда происходит разрушение одних и биосинтез других липидов, а также формирование защитного липидного слоя вокруг зародыша [69]. Роль этого белка в процессе эмбриогенеза предположительно заключается в уча-

стии в этих процессах посредством переноса соответствующих липидных молекул.

Участие в оплодотворении цветковых растений

Считается, что растительные ЛТБ играют важную роль в репродукции цветковых растений. Так, ЛТБ1 лилии (*Lilium longiflorum*) является компонентом, необходимым для адгезии пыльцы, формирования и роста пыльцевой трубки [70]. Предполагается, что ЛТБ1 может действовать непосредственно как адгезивный компонент либо как переносчик гидрофобного адгезивного компонента. Показано также, что одна из изоформ липид-транспортирующего белка арабидопсиса, ЛТБ5, участвует в росте пыльцевой трубки и формировании семян [64].

Выявлена роль ЛТБ риса OsC6 в постмейотическом развитии пыльцы. Установлено, что данный белок присутствует в тканях пыльника и обладает способностью связывать ЖК. Полагают, что OsC6 участвует в формировании липидных орбикул

и пыльцевой экины, осуществляя перенос необходимых липидов из клеток тапетума к микроспорам [65].

Участие в защите и адаптации растений в условиях стресса

Утверждение, что ЛТБ участвуют в защите и адаптации растений к воздействию стрессорных факторов, основано, в основном, на повышении уровня синтеза этих белков. Так, синтез ЛТБ, как и других PRP, индуцируется при механическом повреждении, дефиците влаги, низких температурах, засолении почвы, инфицировании, а также при обработке растения химическими агентами [43, 45, 47, 50, 71, 72]. Индукция экспрессии генов ЛТБ в условиях стресса, возможно, связана с наличием в их промоторной области регуляторных элементов, характерных также для генов других PRP. В регуляции экспрессии генов ЛТБ участвуют такие фитогормоны, как абсцизовая и салициловая кислоты, этилен и метилжасмонат [36].

Считается, что одной из возможных причин индукции экспрессии генов ЛТБ в условиях стресса является вовлеченность этих белков в биосинтез кутикулярного слоя [50]. Защитная функция ЛТБ в растениях обусловлена их антимикробной активностью, криопротекторным действием и свойствами ингибиторов экзогенных ферментов, а также возможным участием в секреции других компонентов иммунной системы растений.

Железистые волоски (трихомы) растений вырабатывают эфирные масла, которые принимают участие в обмене веществ, защищают растение от вредителей, оказывают ранозаживляющее действие, служат для привлечения насекомых и предохраняют от перегревания. Обнаружено, что NtLTP1 табака (*N. tabacum*) специфически экспрессируется в длинных железистых волосках и участвует в секреции из головок трихом компонентов эфирных масел (дитерпенов, алифатических углеводов и ароматических кислот), которые являются защитными факторами растений [73]. Транскрипты генов ЛТБ обнаружены в железистых волосках и других растений, например, мяты (*Mentha piperita*), люцерны (*Medicago sativa*), полыни (*Artemisia annua*), хмеля (*Humulus lupulus*), шалфея (*Salvia fruticosa*) и томата [73].

Известно, что устойчивость растений к холоду связана со стабилизацией клеточных мембран и предотвращением снижения растворимости белков при понижении температуры. В листьях акклиматизированной к холоду капусты (*Brassica oleracea*) обнаружены белки класса WAX9, имеющие высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей с ЛТБ. Данные белки не обладают способностью связывать липиды, но подобно β -1,3-

глюканазам, осмотинам и лектинам, способны в условиях холода стабилизировать мембраны тилакоидов [72]. Предполагается, что механизм криопротекторного действия этих белков связан с уменьшением подвижности мембранных липидов и проницаемости бислоя при взаимодействии ЛТБ с мембраной тилакоидов [74].

Участие в активации и регуляции сигнальных каскадов

Предполагается, что ЛТБ, образуя комплексы с различными молекулами липидов, могут принимать участие в активации и регуляции различных сигнальных каскадов в растениях. Одним из классов сигнальных медиаторов растений являются оксипирины, которые образуются из ненасыщенных ЖК под действием активных форм кислорода (АФК) или ферментов и участвуют в регуляции роста и развития растения, а также в запуске ответных защитных реакций в условиях стресса. Помимо этого, оксипирины регулируют процессы обезвреживания токсичных компонентов, образующихся во время стресса. Как уже упоминалось, ЛТБ1 ячменя в процессе прорастания семян формирует ковалентные комплексы с оксипирином – 9(S),10-эпокси-10,12(Z)-октадекадиеновой кислотой, содержащей нестабильный алленоксид, образующийся в результате последовательного действия липоксигеназы и алленоксидсинтазы [28, 29]. Такое взаимодействие может свидетельствовать о совместном участии ЛТБ и оксипиринов в регуляции сигнальных путей, запускающих механизм предотвращения повреждения клеток растения в условиях стресса [29].

ЛТБ в комплексе с молекулами липидов действуют как эндогенные элиситоры, взаимодействующие со специфическими рецепторами на цитоплазматической мембране растительных клеток и обеспечивающие развитие иммунного ответа в условиях инфицирования (рис. 4). Так, показано, что ЛТБ риса и табака обладают способностью взаимодействовать с элиситиновыми рецепторами [21, 75, 76]. Элиситины – хорошо изученные РАМР растений, которые имеют молекулярную массу около 10 кДа и продуцируются фитопатогенными оомицетами (*Phytophthora* и *Pythium*), паразитирующими на высших растениях. Данные белки, благодаря наличию в их структуре гидрофобной впадины, обладают способностью связывать стеринны и обеспечивают фитопатогенные микроорганизмы необходимыми для их жизнедеятельности липидами, источником которых служат растения. Все элиситины имеют α -спиральную структуру, стабилизированную тремя дисульфидными связями, и в комплексе со стеринном распознаются растением посредством

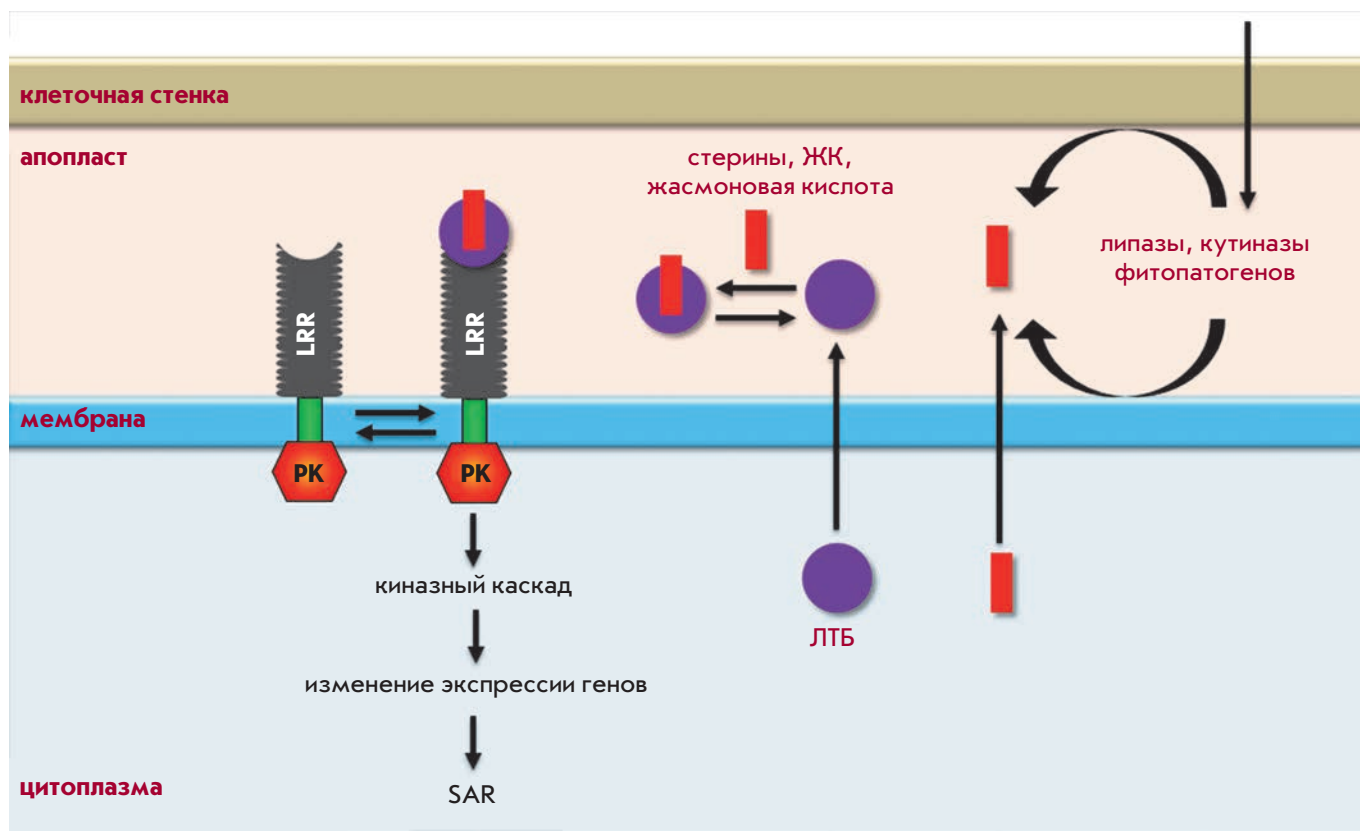


Рис. 4. Возможный механизм участия ЛТБ в активации иммунного ответа в растениях. ЛТБ секретируются в апопласт и связываются с молекулами липидов, которые так же секретируются растением, как, например, жасмоновая кислота, или образуются в результате действия ферментов, выделяемых фитопатогенными микроорганизмами. В комплексе с липидами ЛТБ взаимодействуют с расположенными на цитоплазматической мембране рецепторами, например, с рецептор-подобными серин-треониновыми протеинкиназами, которые содержат внеклеточный обогащенный лейциновыми повторами LRR-домен, а также трансмембранный и цитоплазматический протеинкиназный (ПК) домены. Результатом этого взаимодействия может быть передача сигнала, опосредованная универсальными вторичными мессенджерами и каскадом митоген-активируемых протеинкиназ, активация ряда транскрипционных факторов, индукция синтеза защитных факторов, в том числе AMP и PRP (возможно также и изоформ ЛТБ с выраженной антимикробной активностью), и, в конечном итоге, развитие SAR

рецептор-подобных киназ, расположенных на цитоплазматической мембране. В результате распознавания происходит активация в растениях защитных механизмов, таких, как образование фитоалексинов и АФК, развитие гиперчувствительного ответа (HR) и системной приобретенной резистентности (SAR) [77, 78]. Аминокислотные последовательности ЛТБ и элиситинов имеют низкую степень гомологии, тогда как пространственные структуры этих белков обладают выраженным сходством [79]. Растительные ЛТБ в комплексе с молекулой липида выступают в роли агонистов элиситинов и DAMP, связываются с рецепторами элиситинов и вызывают развитие иммунного ответа. Интересным фактом, говорящим о возможности существования различных путей ак-

тивации защитного ответа в растениях с участием представителей двух подклассов ЛТБ, является отличие в структуре гидрофобного лиганда, в роли которого для ЛТБ2 выступают молекулы стероидов [75], а для обладающих менее гибкой гидрофобной впадиной ЛТБ1 – жасмоновая кислота [21, 76].

Показано также, что необычный представитель ЛТБ2 из арабидопсиса, имеющий изоэлектрическую точку в кислой области pH и названный DIR1, играет ключевую роль в развитии SAR [80]. Предполагается, что данный белок в процессе инфицирования растения связывается с молекулами липидов (оксипинами, жирными кислотами или моноацильными фосфолипидами), которые образуются в результате работы секретируемых патогеном липаз, после чего

образованный комплекс взаимодействует с гипотетическим рецептором, запуская сигнальный каскад, приводящий к развитию SAR [81].

Установлено, что ксилоген из циннии, содержащий ГФИ-якорь и связывающий растительные стеринны, стимулирует превращение недифференцированных клеток в элементы трахеи и, возможно, участвует в межклеточных взаимодействиях и передаче сигнала. Предполагается, что ксилогено-подобные белки других растений, ЛТБ-домены которых имеют большее сходство с ЛТБ2, также могут участвовать в межклеточных взаимодействиях и передаче сигнала, функционируя в комплексе с липидной молекулой [42].

Участие в апоптозе

Предположение о возможном участии ЛТБ в апоптозе выдвинуто на основании сходства между ЛТБ кукурузы и проапоптотическим белком Bid млекопитающих, который тоже имеет в своей структуре внутреннюю впадину, связывает и переносит липиды [82]. Bid находится в цитозоле и в присутствии лизофосфолипидов, образующихся в процессе программируемой клеточной смерти, действует на митохондрии, вызывая высвобождение факторов индукции апоптоза, в том числе цитохрома с. ЛТБ кукурузы в присутствии лизофосфолипидов также вызывает высвобождение цитохрома с из митохондрий. В качестве возможного механизма дестабилизирующего действия обоих белков рассматривают перенос лизофосфолипидов на наружную мембрану митохондрий, которые изменяют ее свойства, облегчая тем самым действие других проапоптотических белков [83].

Участие в симбиозе

Известно, что симбиотические ризобактерии стимулируют рост растений и защищают их от почвенных фитопатогенов, вызывая развитие так называемой индуцированной системной резистентности, которая фенотипически и функционально сходна с SAR [84]. Показано, что ЛТБ MtN5 люцерны играет важную роль в развитии симбиотических отношений между растением и клубеньковыми бактериями, а именно, вовлечен в процессы проникновения бактерий в ткани корня и формирования клубеньков [85]. Предполагается, что функция MtN5 заключается в поддержании баланса между бактериальной инвазией и предотвращением развития инфекции [86].

Участие в созревании плодов

Показано, что ЛТБ томата способен образовывать комплексы с полигалактуроназой – ферментом, катализирующим расщепление пектина. Предполагается, что ЛТБ томата при образовании

комплекса повышает гидролитическую активность этого фермента и может участвовать в регуляции скорости размягчения и созревания плодов [87].

ЛТБ КАК АЛЛЕРГЕНЫ

ЛТБ являются антигенами, участвующими в развитии аллергических реакций различной степени тяжести на пыльцу, растительные продукты и латекс. Стабилизированная дисульфидными связями структура этих белков придает им повышенную устойчивость к расщеплению пищеварительными ферментами, позволяет достигать кишечника человека в нативной иммуногенной форме и вызывать сенсibilизацию организма [88]. Аллергизирующая способность ЛТБ в различных прошедших обработку пищевых продуктах (соках, джемах, пиве, вине и др.) объясняется их высокостабильной структурой, практически не подверженной тепловой денатурации, химической деградации и ферментативному расщеплению [89]. Необходимо отметить, что охарактеризованными аллергенами являются в основном представители первого подкласса растительных ЛТБ. Так, в настоящий момент в базе данных аллергенов IUIS зарегистрированы всего три ЛТБ2 (из томата, арахиса и сельдерея) и 42 ЛТБ1 из различных растений, не считая их изоформ. Высокая структурная гомология ЛТБ1 обуславливает развитие перекрестных аллергических реакций.

ЛТБ1, широко распространенные в царстве растений, являются основными аллергенами, выделенными из фруктов и ягод, – Pru p 3 персика (*Prunus persica*), Pru av 3 вишни (*P. avium*), Mal d 3 яблока (*Malus domestica*), Pru d 3 сливы (*P. domestica*), Cit s 3 апельсина (*Citrus sinensis*), Vit v 1 винограда, Fra a 3 клубники (*Fragaria ananassa*), орехов – Cor a 8 фундука (*Corylus avellana*), Jug r 3 грецкого ореха (*Juglans regia*), Ara h 9 арахиса (*Arachis hypogaea*), Cas s 8 каштана (*Castanea sativa*), овощей – Aspa o 1 салата-латука (*Asparagus officinalis*), Lec s 1 спаржи (*Lactuca sativa*), Bra o 3 капусты, Lyc e 3 томата (*Lycopersicon esculentum*), Api g 2 сельдерея (*Apium graveolens*), злаковых – Zea m 14 кукурузы, Ory s 14 риса, Tri a 14 пшеницы, Hor v 14 ячменя и бобовых культур Len c 3 чечевицы, Pha v 3 фасоли [90–92]. Важно отметить, что ЛТБ накапливаются в основном в коже плодов, а не в их мякоти [93], что может быть причиной развития анафилактических реакций при кожном контакте человека с плодами [94]. Существенный вклад в первичную сенсibilизацию вносят и пыльцевые аллергены класса ЛТБ (Par j 2 постенницы иудейской (*Parietaria judaica*), Ole e 7 оливкового дерева (*Olea europaea*), Pla a 3 платана (*Platanus acerifolia*), Art v 3 полыни (*Artemisia vulgaris*) и др.) [95]. Интересно, что ЛТБ из плодов растений

семейства *Rosaceae* обнаружены также и в пыльце этих деревьев [96]. Главный аллерген класса ЛТБ, который играет основную роль в сенсibilизации и распознается иммуноглобулином E (IgE) большинства индивидов с аллергией, считается Pru p 3 персика [97, 98].

В последние годы проведены многочисленные исследования, направленные на выяснение причин высокой аллергенности растительных ЛТБ1 и развития вызываемых ими перекрестных аллергических реакций. Так, определены В-клеточные эпитопы Pru p 3, которые представляют собой расположенные на поверхности молекулы белка положительно заряженные участки, соответствующие аминокислотным остаткам 11–25, 31–45 и 71–80 (рис. 1А) [99]. Выявленные антигенные детерминанты имеют высокую степень гомологии у различных аллергенных ЛТБ1. Установлено, что решающую роль во взаимодействии Pru p 3 с IgE играют характерные для большинства аллергенных ЛТБ1 остатки Arg39, Thr40 и Arg44 [100]. В роли Т-клеточного эпитопа Pru p 3 выступает участок полипептидной цепи, соответствующий аминокислотным остаткам 61–80 [101]. Также показано, что развитие Т-клеточного ответа на Pru p 3 сопровождается увеличением экспрессии интегрина $\alpha 4\beta 7$, обеспечивающего миграцию лимфоцитов в стенку кишечника, где происходит их первичная активация [102].

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОВ

Гены ЛТБ повсеместно присутствуют в геномах высших растений – от наиболее примитивных мохообразных до сосудистых, включая папоротникообразные, плауновидные, покрытосеменные и голосеменные, но не обнаружены в таких низших растениях, как водоросли. В связи с этим высказывается предположение о том, что ЛТБ, принимающие участие в защите растений от воздействия разнообразных стрессорных факторов окружающей среды, могли появиться в период выхода растений на сушу, т.е. около 400 млн лет тому назад [103].

Как упоминалось выше, ЛТБ одного растения кодируются обычно десятками родственных генов, образующих мультигенное семейство. Считается, что появление в процессе эволюции множественных изоформ ЛТБ, выполняющих различные функции в растениях, связано с рядом последовательных дубликаций гена-предшественника и последующих мутаций [104]. Известно, что большинство покрытосеменных подверглись в процессе эволюции одному или нескольким удвоениям целого генома. Филогенетический анализ множественных изоформ ЛТБ риса, арабидопсиса и пшеницы свидетельствует о том, что процесс дубликации генов и фрагментов

хромосом продолжается и в настоящее время [105]. Мутации в дублированных генах ЛТБ в процессе эволюции могли приводить к псевдогенизации гена, субфункционализации с сохранением части функций гена-предшественника или неофункционализации, т.е. приобретению геном совершенно новых функций [106]. Последние два варианта могли привести к появлению новых изоформ ЛТБ, обладающих иным спектром и степенью выраженности биологической активности, а также ЛТБ-подобных белков, значительно отличающихся от представителей класса ЛТБ по структуре и выполняющих другие функции.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

ЛТБ как переносчики лекарственных средств

Способность ЛТБ связывать и переносить липиды создает предпосылки для их возможного применения в качестве лиганд-связывающих белков для создания систем доставки лекарственных и косметических средств с целью защиты от преждевременной биодegradации или снижения побочных эффектов при системном применении. Возможность создания систем доставки на основе ЛТБ определяется рядом их свойств: а) устойчивостью к тепловой денатурации и действию протеаз; б) гидрофильной поверхностью, обеспечивающей биосовместимость комплекса с лигандом и снижение риска развития побочных реакций; в) защитой лекарственного вещества, расположенного внутри гидрофобной полости ЛТБ, от преждевременной биодegradации; г) небольшим размером комплекса с лигандом, обеспечивающим его эффективное проникновение в ткани; д) увеличением аффинности и специфичности при образовании комплексов ЛТБ с лигандами, которое может быть достигнуто посредством модификации аминокислотной последовательности белка.

В ряде работ показано, что растительные ЛТБ образуют комплексы не только с ЖК и фосфолипидами, но и с другими гидрофобными и амфифильными лигандами, включая некоторые лекарственные вещества. Так, ЛТБ1 пшеницы образует комплексы с простагландином В2 (PGB2). Установлено, что при взаимодействии с ЛТБ1 PGB2 полностью погружается в гидрофобную полость белка, оказываясь при этом изолированным от окружающей среды [17]. Показано, что ЛТБ1 пшеницы связывает некоторые компоненты липидного слоя кожи (сфингозины, сфингомиелины и цереброзиды), которые входят в состав косметических средств. Таким образом, ЛТБ1 пшеницы может быть использован в косметологии как средство доставки эпидермальных липидов. С другой стороны, ЛТБ1 пшеницы способен связывать лекарственные средства, которые актив-

ны в отношении возбудителей лейшманиоза и HIV-1, а также обладают антинеопластическими свойствами, но имеют серьезные побочные эффекты при системном применении (например, эделфозин, илмофозин и их аналоги). Использование ЛТБ1 пшеницы в качестве средства доставки может значительно снизить токсичность этих препаратов. Кроме того, ЛТБ1 пшеницы способен осуществлять доставку таких противогрибковых средств, как коназол BD56 и амфотерицин В [16]. Следует отметить, что белок связывает все перечисленные соединения с низкой аффинностью, что является обязательным условием транспорта и контролируемого высвобождения лиганда.

В результате скрининга с использованием библиотеки СМС (Comprehensive Medicinal Chemistry), содержащей информацию о ~7300 биологически активных соединениях, показано, что ЛТБ1 кукурузы и ЛТБ2 риса содержат не один, а два потенциальных центра связывания лекарственных веществ – один в гидрофобной полости, второй – на гидрофильной поверхности молекулы белка. У ЛТБ2 риса вблизи гидрофобной полости располагается центр связывания стероидов, например β -ситостерина или холестерина, а на поверхности белка вблизи С-концевого участка находится область связывания трифенилметановых производных, например дифенил(пиридил-4)-метана [15].

ЛТБ в пищевой промышленности

Поверхностно-активные свойства ЛТБ растений делают возможным их применение в пищевой промышленности в качестве стабилизаторов пен и эмульсий. Пивоварение – одна из отраслей пищевой промышленности, где широко используются эти свойства ЛТБ. Известно, что образование и стабильность пены являются важными показателями качества пива. В многочисленных работах показано, что ЛТБ являются основными белковыми компонентами ячменного пива и играют ключевую роль в формировании и стабилизации пивной пены [35, 75]. В число основных белковых компонентов пива входит ЛТР1 ячменя, который связывает липиды и тем самым снижает их негативное влияние на формирование и стабильность пены. В процессе пивоварения происходит гликозилирование и ацилирование ЛТР1, что увеличивает амфифильность и поверхностно-активные свойства этого белка [75]. При ферментации происходит образование ЛТР1b – ковалентного комплекса этого белка с 9(S),10-эпокси-10,12(Z)-октадекадиеновой кислотой, о котором упоминалось выше [107]. ЛТР1 и ЛТР1b устойчивы к действию высоких температур, и в процессе нагревания при пастеризации

пива сохраняют свою структуру и способность взаимодействовать с липидами. Необходимо отметить, что ЛТР1, в отличие от ЛТР1b, обладает противогрибковой активностью, ингибирует рост дрожжей и тем самым может негативно влиять на процесс ферментации, поэтому образование ЛТР1b и установление равновесия между содержанием в пиве свободной и связанной с липидом форм ЛТР1 важны для получения ячменного пива высокого качества.

Создание жизнестойких трансгенных растений

Большой интерес представляет возможность использования ЛТБ для создания трансгенных растений, устойчивых к действию разнообразных абиотических и биотических стрессорных факторов. Трансгенные растения, несущие гены ЛТБ, обладают повышенной устойчивостью к фитопатогенным микроорганизмам [108], поражению вредителями [73], действию высоких температур [109], засолению почвы [108], засухе [110] и др.

ЛТБ в аллергологии

Еще одно перспективное направление применения природных и рекомбинантных ЛТБ растений – создание на их основе современных тест-систем для компонентной аллергодиагностики и вакцин, предназначенных для превентивной аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ).

К основным способам диагностики аллергии относятся кожные аллергопробы, провокационные и элиминационные тесты, а также иммуноферментный или иммунофлуоресцентный анализ, направленный на оценку общего уровня и выявление специфических антител классов IgE и IgG. При проведении аллергодиагностики традиционно используются неочищенные экстракты аллергенов, дающие плохо воспроизводимые, а иногда ложные результаты из-за отсутствия реальной возможности их стандартизации, а также колебаний содержания в них аллергенных белков и небелковых компонентов. Современное направление развития аллергодиагностики основано на замене суммарных экстрактов на индивидуальные белковые аллергокомпоненты, которые могут быть использованы для составления молекулярного профиля чувствительности пациента и изучения перекрестной реактивности аллергенов [111]. В современных тест-системах в формате микрочипов, предназначенных для компонент-решающей диагностики, на сегодняшний день уже используются несколько природных и рекомбинантных пыльцевых (Art v 3 полыни, Pla a 3 платана, Par j 2 постенницы и Ole e 7 маслины) и пищевых (Pru p 3 персика, Cor a 8 фундука, Jug r 3 грецкого ореха, Ara h 9 арахиса и Tri a 14 пшеницы) аллергенных ЛТБ.

Современный метод снижения реактивности организма – аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), при которой пациенту вводятся постепенно повышающиеся дозы аллергена [112]. Однако традиционно при АСИТ используют неочищенные экстракты или аллергоиды, которые характеризуются низкой эффективностью и высоким риском развития системных аллергических реакций. Наиболее безопасное и перспективное направление АСИТ предполагает разработку и создание вакцин на основе индивидуальных природных и рекомбинантных аллергенов, а также их гипоаллергенных аналогов. Эти аналоги должны обладать низкой аллергенностью, но достаточно высокой иммуногенностью, чтобы не вызывать побочных аллергических реакций и надолго снижать гиперчувствительность организма [113]. Гипоаллергенные формы создаются в основном с помощью методов рационального дизайна и сайт-направленного мутагенеза путем замены аминокислотных остатков, входящих в состав В-клеточных эпитопов. На сегодняшний день несколько гипоаллергенных аналогов основных пыльцевых и пищевых аллергенов различных классов проходят клинические испытания в качестве лекарственных препаратов для проведения АСИТ [114]. К настоящему времени получены гипоаллергенные формы ряда растительных ЛТБ, например, Par j 2 постенницы [115] и Pru p 3 персика [116], но среди препаратов, проходящих клинические испытания, пока отсутствуют вакцины на основе гипоаллергенных форм растительных ЛТБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЛТБ широко распространены в царстве растений, присутствуют практически во всех растительных органах и тканях, имеют внутри- или внеклеточную локализацию и играют важную физиологическую роль. ЛТБ, кодируемые мультигенным семейством, в растениях представлены набором множественных изоформ, дифференциально экспрессирующихся в различных органах и тканях в условиях воздействия различных стрессогенных факторов окружающей среды. Помимо этого, в растениях обнаружены разнообразные ЛТБ-подобные белки, которые имеют сильно отличающуюся структуру и функциональную

активность. Предполагается, что появление в ходе эволюции множественных изоформ ЛТБ и ЛТБ-подобных белков обусловлено необходимостью расширения спектра функций, выполняемых этими белками.

Биологическая роль ЛТБ в растениях изучена не до конца. Показано, что ЛТБ принимают участие во многих процессах, что, вероятно, во многом обусловлено их способностью связывать и переносить разнообразные молекулы липидов.

Достоверно установлено, что ЛТБ относятся к молекулярным факторам системы врожденного иммунитета растений. Являясь компонентами семейства PRP – белков, связанных с патогенезом, ЛТБ принадлежат к защитной системе растений, позволяющей им быстро адаптироваться и выживать в условиях стресса. Защитная функция ЛТБ обусловлена их антимикробной активностью и способностью ингибировать чужеродные ферменты, участием в переносе сигнальных медиаторов, защитных и строительных липидов, а также свойствами эндогенных элиситоров, которые в комплексе с молекулой липида распознаются специфическими рецепторами и запускают иммунный ответ.

ЛТБ играют важную роль в жизни человека. Широкое распространение и сходная пространственная организация делают эти белки одним из важнейших классов перекрестных растительных аллергенов, являющихся частой причиной развития аллергических реакций различной степени тяжести. Поверхностно-активные и аллергенные свойства, а также способность ЛТБ связывать и переносить гидрофобные лиганды делают возможным применение этих белков в фармации для конструирования систем доставки лекарственных и косметических средств, в аллергологии для создания современных диагностических тест-систем и препаратов для аллерговакцинации, в пищевой промышленности для производства высококачественных сортов пива и в сельском хозяйстве для получения растений, устойчивых к стрессу. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда
(проект № 14-50-00131).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdelkader A.B., Mazliak P. // Eur. J. Biochem. 1970. V. 15. P. 250–262.
2. Vergnolle C., Arondel V., Jolliot A., Kader J. // Methods Enzymol. 1992. V. 209. P. 522–530.
3. Kader J.-C. // Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 1996. V. 47. P. 627–654.
4. Perrocheau L., Bakan B., Boivin P., Marion D. // J. Agricult. Food Chem. 2006. V. 54. № 8. P. 3108–3113.
5. Lee J.Y., Min K., Cha H., Hwang D.H.S.K.Y., Suh S.W. // J. Mol. Biol. 1998. V. 276. P. 437–448.
6. Gizatullina A.K., Finkina E.I., Mineev K.S., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Telezhinskaya I.N., Balandin S.V., Shenkarev Z.O., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2013. V. 439. № 4. P. 427–432.
7. Simorre J., Caille A., Dominique M., Didier M., Ptak M. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 11600–11608.
8. Yeasts T.H., Rose J.K.C. // Protein Sci. 2007. V. 17. P. 191–198.

9. Gomar J., Petit M.-C., Sodano P., Sy D., Marion D., Kader J.-C., Vovelle F., Ptak M. // *Protein Sci.* 1996. V. 5. № 4. P. 565–577.
10. Samuel D., Liu Y.J., Cheng C.S., Lyu P.C. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 35267–35273.
11. Hoh F., Pons J.L., Gautier M.F., de Lamotte F., Dumas C. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2005. V. 61. P. 397–406.
12. Pons J.L., de Lamotte F., Gautier M.F., Delsuc M.A. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 14249–14256.
13. Cheng C.S., Chen M.N., Lai Y.T., Chen T., Lin K.F., Liu Y.J., Lyu P.C. // *Proteins.* 2008. V. 70. № 3. P. 695–706.
14. Tassin S., Broekaert W.F., Marion D., Acland D.P., Ptak M., Vovelle F., Sodano P. // *Biochem.* 1998. V. 37. P. 3623–3637.
15. Cheng C.S., Chen M.N., Liu Y.J., Huang L.Y., Lin K.F., Lyu P.C. // *Enzyme Microb. Technol.* 2004. V. 35. P. 532–539.
16. Pato C., Borgne M., Baut G., Papec P., Marion D., Douliez J.-P. // *Biochem. Pharmacol.* 2001. V. 62. P. 555–560.
17. Tassin-Moindrot S., Caille A., Douliez J.P., Marion D., Vovelle F. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 1117–1124.
18. Douliez J.-P., Michon T., Marion D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1467. P. 65–72.
19. Charvolin D., Douliez J.-P., Marion D., Cohen-Addad C., Pebay-Peyroula E. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 264. P. 562–568.
20. Cheng H., Cheng P., Peng P., Lyu P., Sun Y. // *Protein Sci.* 2004. V. 13. P. 2304–2315.
21. Buhot N., Gomès E., Milat M.L., Ponchet M., Marion D., Lequeu J., Delrot S., Coutos-Thévenot P., Blein J.P. // *Mol. Biol. Cell.* 2004. V. 15. № 11. P. 5047–5052.
22. Li C., Xie W., Bai W., Li Z., Zhao Y., Liu H. // *FEBS J.* 2008. V. 275. № 21. P. 5298–5308.
23. Wang Z., Xie W., Chi F., Li C. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. № 7. P. 1683–1687.
24. Guerbette F., Grosbois M., Jolliot-Croquin A. // *Mol. Cell. Biochem.* 1999. V. 192. P. 157–161.
25. Guerbette F., Grosbois M., Jolliot-Croquin A., Kader J.-C., Zachowski A. // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 14131–14137.
26. Ostergaard J., Vergnolle C., Schoentgen F., Kader J.-C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1170. P. 109–117.
27. Douliez J.-P., Pato C., Rabesona H., Molle D., Marion D. // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. P. 1400–1403.
28. Bakan B., Hamberg M., Larue V., Prangé T., Marion D., Lascombe M.B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 390. P. 780–785.
29. Bakan B., Hamberg M., Perrocheau L., Maume D., Rogniaux H., Tranquet O., Rondeau C., Blein J.P., Ponchet M., Marion D. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 51. P. 38981–38988.
30. Regente M.C., Giudici A.M., Villalain J., de la Canal L. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2005. V. 40. P. 183–189.
31. Caaveiro J.M.M., Molina A., González-Mañas J.M., Rodríguez-Palenzuela P., García-Olmedo F., Goñi F.M. // *FEBS Lett.* 1997. V. 410. P. 338–342.
32. Hoffmann-Sommergruber K. // *Biochem. Society Transactions.* 2002. V. 30. P. 930–935.
33. van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. V. 44. P. 135–162.
34. Edreva A. // *Gen. Appl. Plant Physiol.* 2005. V. 31. P. 105–124.
35. Douliez J., Michon T., Elmorjani K., Marion D. // *J. Cereal Sci.* 2000. V. 32. P. 1–20.
36. Carvalho A.O., Gomes V.M. // *Peptides.* 2007. V. 28. P. 1144–1153.
37. Tsuboi S., Osafune T., Tsugeki R., Nishimura M., Yamada M. // *Biochem.* 1992. V. 3. P. 500–508.
38. Carvalho A.O., Teodoro C.E.S., Da Cunha M., Okorokova-Facanha A.L., Okorokov L.A., Fernandes K.V.S., Gomes V.M. // *Physiol. Plant.* 2004. V. 122. P. 328–336.
39. Diz M.S., Carvalho A.O., Ribeiro S.F., Da Cunha M., Beltrami L., Rodrigues R., Nascimento V.V., Machado O.L., Gomes V.M. // *Physiol. Plant.* 2011. V. 142. № 3. P. 233–246.
40. Pagnussat L., Burbach C., Baluska F., de la Canal L. // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. № 18. P. 6555–6563.
41. Edstam M.M., Edqvist J. // *Physiol. Plant.* 2014. V. 152. № 1. P. 32–42.
42. Kobayashi Y., Motose H., Iwamoto K., Fukuda H. // *Plant Cell Physiol.* 2011. V. 52. № 6. P. 1095–1106.
43. Chae K., Gonong B.J., Kim S.C., Kieslich C.A., Morikis D., Balasubramanian S., Lord E.M. // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. № 15. P. 4277–4290.
44. Garcia-Olmedo F., Molina A., Segura A., Moreno M. // *Trends in Microbiology.* 1995. V. 3. № 2. P. 72–74.
45. Choi A.M., Lee S.B., Cho S.H., Hwang I., Hur C.-G., Suh M.C. // *Plant Physiol. Biochem.* 2008. V. 46. P. 127–139.
46. Thoma S., Hecht U., Kippers A., Botella J., De Vries S., Somerville C. // *Plant Physiol.* 1994. V. 105. P. 35–45.
47. Jung H.W., Kim W., Hwang B.K. // *Plant Cell Environ.* 2003. V. 26. № 6. P. 915–928.
48. Gomès E., Sagot E., Gaillard C., Laquitaine L., Poinssot B., Sanejouand Y.H., Delrot S., Coutos-Thévenot P. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2003. V. 16. № 5. P. 456–464.
49. Wang C., Yang C., Gao C., Wang Y. // *Tree Physiol.* 2009. V. 29. № 12. P. 1607–1619.
50. Trevino M.B., O'Connell M.A. // *Plant Physiol.* 1998. V. 116. P. 1461–1468.
51. Zottich U., Da Cunha M., Carvalho A.O., Dias G.B., Silva N.C., Santos I.S., do Nascimento V.V., Miguel E.C., Machado O.L., Gomes V.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1810. № 4. P. 375–383.
52. Cammue B.P.A., Thevissen K., Hendriks M., Eggermont K., Goderis L.J., Proost P., Damme J.V., Osborn R.W., Guerbette F., Kader J., Broekaert W.F. // *Plant Physiol.* 1995. V. 109. P. 445–455.
53. Segura A., Moreno M., García-Olmedo F. // *FEBS Lett.* 1993. V. 332. № 3. P. 243–246.
54. Dubreil L., Gaborit T., Bouchet B., Gallant D.J., Broekaert W.F., Quillien L., Quillien L., Marion D. // *Plant Sci.* 1998. V. 138. P. 121–135.
55. Molina A., Segura A., Garcia-Olmedo F. // *FEBS.* 1993. V. 316. P. 119–122.
56. Sun J.Y., Gaudet D.A., Lu Z.X., Frick M., Puchalski B., Laroche A. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008. V. 21. № 3. P. 346–360.
57. Ge X., Chen J., Sun C., Cao K. // *Prot. Eng.* 2003. V. 16. P. 387–390.
58. Ooi L.S., Tian L., Su M., Ho W.S., Sun S.S., Chung H.Y., Wong H.N., Ooi V.E. // *Peptides.* 2008. V. 29. № 12. P. 2101–2109.
59. Lin P., Xia L., Wong J.H., Ng T.B., Ye X., Wang S., Shi X. // *J. Pept. Sci.* 2007. V. 13. № 10. P. 642–648.
60. Zhang N., Jonnes B.L., Tao H.P. // *Cereal Chem.* 1997. V. 74. № 2. P. 119–122.
61. Melo F.R., Rigden D.J., Franco O.L., Mello L.V., Ary M.B., Grossi de Sa M.F., Bloch C. // *Proteins.* 2002. V. 48. № 2. P. 311–319.
62. Jones B.L., Marinac L.A. // *J. Agric. Food Chem.* 2000. V. 48. P. 257–264.
63. Sawano Y., Hatano K., Miyakawa T., Komagata H., Miyauchi Y., Yamazaki H., Tanokura M. // *Plant Physiol.* 2008. V. 146. № 4. P. 1909–1919.
64. Chae K., Kieslich C., Morikis D., Kim S., Lord E.M. // *Plant Cell.* 2009. V. 21. P. 3902–3914.
65. Zhang D., Liang W., Yin C., Zong J., Gu F., Zhang D. // *Plant Physiol.* 2010. V. 154. № 1. P. 149–162.
66. Cameron K.D., Teece M.A., Smart L.B. // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. P. 176–183.

67. Lee S.B., Go Y.S., Bae H.J., Park J.H., Cho S.H., Cho H.J., Lee D.S., Park O.K., Hwang I., Suh M.C. // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. № 1. P. 42–54.
68. Kader J.-C. // *Trends Plant Science.* 1997. V. 2. № 2. P. 66–70.
69. Sterk P., Booij H., Schellekens G.A., van Kammen A., De Vries S.C. // *Plant Cell.* 1991. V. 3. P. 907–921.
70. Park S.Y., Jauh G.Y., Mollet J.C., Eckard K.J., Nothnagel E.A., Walling L.L., Lord E.M. // *Plant Cell.* 2000. V. 12. P. 151–163.
71. Ouard O., Cellier F., Ferrare K., Tusch D., Lamaze T., Dupuis J.M., Casse-Delbart F. // *Plant Mol. Biol.* 1996. V. 31. P. 819–829.
72. Hinch D.K. // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2002. V. 357. P. 909–916.
73. Choi Y.E., Lim S., Kim H.J., Han J.Y., Lee M.H., Yang Y., Kim J.A., Kim Y.S. // *Plant J.* 2012. V. 70. № 3. P. 480–491.
74. Srór H.A., Tischendorf G., Siegf F., Schmitt J.M., Hinch D.K. // *Cryobiology.* 2003. V. 47. № 3. P. 191–203.
75. Cheng C.S., Samuel D., Liu Y.J., Shyu J.C., Lai S.M., Lin K.F., Lyu P.C. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 13628–13636.
76. Wang X., Wang H., Cao K., Ge X. // *Mol. Biol. Rep.* 2009. V. 36. P. 745–750.
77. Osman H., Vauthrin S., Mikes V., Milat M.L., Panabières F., Marais A., Brunie S., Maume B., Ponchet M., Blein J.P. // *Mol. Biol. Cell.* 2001. V. 12. P. 2825–2834.
78. Kim Y.T., Oh J., Kim K.H., Uhm J.Y., Lee B.M. // *Mol. Biol. Rep.* 2010. V. 37. № 2. P. 717–727.
79. Douliez N., Jacquemard A., Marion D., Tran V., Maume B., Milat M., Ponchet M., Mikes V., Kader J.-C., Blein J. // *FEBS Lett.* 2001. V. 509. № 1. P. 27–30.
80. Maldonado A.M., Doerner P., Dixon R.A., Lamb C.J., Cameron R.K. // *Nature.* 2002. V. 419. № 6905. P. 399–403.
81. Lascombe M.B., Bakan B., Buhot N., Marion D., Blein J.P., Larue V., Lamb C., Prangé T. // *Protein Sci.* 2008. V. 17. № 9. P. 1522–1530.
82. Degli Esposti M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1553. № 3. P. 331–340.
83. Crimi M., Astegno A., Zoccatelli G., Esposti M.D. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2006. V. 445. № 1. P. 65–71.
84. Rudrappa T., Biedrzycki M.L., Kunjeti S.G., Donofrio N.M., Czymmek K.J., Paré P.W., Bais H.P. // *Commun. Integr. Biol.* 2010. V. 3. № 2. P. 130–138.
85. Pii Y., Astegno A., Peroni E., Zaccardelli M., Pandolfini T., Crimi M. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2009. V. 22. № 12. P. 1577–1587.
86. Pii Y., Molesini B., Pandolfini T. // *Plant Signal Behav.* 2013. V. 8. № 7. e24836.
87. Tomassen M.M., Barrett D.M., van der Valk H.C., Woltering E.J. // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. № 5. P. 1151–1160.
88. Palacin A., Varelaw J., Quirce S., del Pozo V. // *Clin. Exp. Allergy.* 2009. V. 39. P. 1267–1276.
89. Salcedo G., Sanchez-Monge R., Diaz-Perales A., Garcia-Casado G., Barber D. // *Clin. Exp. Allergy.* 2004. V. 34. № 9. P. 1336–1341.
90. Hauser M., Roulias A., Ferreira F., Egger M. // *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2010. V. 6. № 1. P. 1–14.
91. Borges J.P., Barre A., Culerrier R., Granier C., Didier A., Rougé P. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 365. № 4. P. 685–690.
92. Akkerdaas J., Finkina E.I., Balandin S.V., Santos Magadán S., Knulst A., Fernandez-Rivas M., Asero R., van Ree R., Ovchinnikova T.V. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012. V. 157. P. 51–57.
93. Borges J.P., Jauneau A., Brule C., Culerrier R., Barre A., Didier A., Rougé P. // *Plant Physiol. Biochem.* 2006. V. 44. P. 535–542.
94. Fernandez-Rivas M., Gonzalez-Mancebo E., Rodriguez-Perez R., Benito C., Sanchez-Monge R., Salcedo G., Alonso M.D., Rosado A., Tejedor M.A., Vila C., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. V. 112. P. 789–795.
95. Egger M., Hauser M., Mari A., Ferreira F., Gadermaier G. // *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2010. V. 10. № 5. P. 326–335.
96. Marzban G., Mansfeld A., Herndl A., Jäger S., Stoyanova M. E., Hemmer W., Katinger H., Laimer M. // *Aerobiologia.* 2006. V. 22. P. 237–245.
97. Fernández-Rivas M., Bolhaar S., González-Mancebo E., Asero R., van Leeuwen A., Bohle B., Ma Y., Ebner C., Rigby N., Sancho A.I., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006. V. 118. P. 481–488.
98. Pacios L.F., Tordesillas L., Cuesta-Herranz J., Compes E., Sánchez-Monge R., Palacín A., Salcedo G., Díaz-Perales A. // *Mol. Immunol.* 2008. V. 45. № 8. P. 2269–2276.
99. García-Casado G., Pacios L.F., Díaz-Perales A., Sánchez-Monge R., Lombardero M., García-Selles F.J., Polo F., Barber D., Salcedo G. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. V. 112. P. 599–605.
100. Salcedo G., Sanchez-Monge R., Barber D., Diaz-Perales A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1771. P. 781–791.
101. Tordesillas L., Cuesta-Herranz J., Gonzalez-Muñoz M., Pacios L.F., Compés E., Garcia-Carrasco B., Sanchez-Monge R., Salcedo G., Diaz-Perales A. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 46. P. 722–728.
102. Schulten V., Radakovics A., Hartz C., Mari A., Vazquez-Cortes S., Fernandez-Rivas M., Lauer I., Jahn-Schmid B., Eiwegger T., Scheurer S., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009. V. 124. № 1. P. 100–107.
103. Edstam M.M., Viitanen L., Salminen T.A., Edqvist J. // *Mol. Plant.* 2011. V. 4. № 6. P. 947–964.
104. Boutrot F., Chantret N., Gautier M.-F. // *BMC Genomics.* 2008. V. 9. № 86. P. 1–19.
105. Jang C.S., Jung J.H., Yim W.C., Lee B.M., Seo Y.W., Kim W. // *Mol. Cell.* 2007. V. 24. № 2. P. 215–223.
106. Moore R.C., Purugganan M.D. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. V. 8. P. 122–128.
107. Nieuwoudt M., Lombard N., Rautenbach M. // *Food Chem.* 2014. V. 157. P. 559–567.
108. Safi H., Saibi W., Alaoui M.M., Hmyene A., Masmoudi K., Hanin M., Brini F. // *Plant Physiol Biochem.* 2015. V. 89. P. 64–75.
109. Wang F., Zang X.S., Kabir M.R., Liu K.L., Liu Z.S., Ni Z.F., Yao Y.Y., Hu Z.R., Sun Q.X., Peng H.R. // *Gene.* 2014. V. 550. № 1. P. 18–26.
110. Guo C., Ge X., Ma H. // *Plant Mol. Biol.* 2013. V. 82. № 3. P. 239–253.
111. Van Winkle R.C., Chang C. // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2014. V. 46. № 3. P. 211–224.
112. Bidak K., Nicknam M.H., Farid R. // *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* 2011. V. 10. № 1. P. 1–9.
113. Mutschlechner S., Deifl S., Bohle B. // *Clin. Exp. Allergy.* 2009. V. 39. № 11. P. 1635–1642.
114. Cromwell O., Häfner D., Nandy A. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011. V. 127. № 4. P. 865–872.
115. Bonura A., Passantino R., Costa M.A., Montana G., Melis M., Bondi M.L., Butteroni C., Barletta B., Corinti S., Di Felice G., et al. // *Clin. Exp. Allergy.* 2012. V. 42. № 3. P. 471–480.
116. Gómez-Casado C., Garrido-Arandia M., Gamboa P., Blanca-López N., Canto G., Varela J., Cuesta-Herranz J., Pacios L.F., Díaz-Perales A., Tordesillas L. // *Clin. Dev. Immunol.* 2013. V. 2013. P. 1–12.