ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Кондакова Марина Александровна

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА СОСТАВ И АКТИВНОСТЬ СУПЕРКОМПЛЕКСОВ СИСТЕМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА *PISUM SATIVUM* L.

03.01.05 – физиология и биохимия растений

диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Уколова Ирина Владимировна

Иркутск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ **6**

ВВЕДЕНИЕ **8**

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ **16**

1.1. СИСТЕМА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ РАСТЕНИЙ **16**

1.1.1. Комплекс I **17**

1.1.2. Комплекс II **18**

1.1.3. Комплекс III **20**

1.1.4. Комплекс IV **21**

1.1.5. Комплекс V **24**

1.1.6. Альтернативные ферменты **24**

1.1.7. Убихинон и цитохром *c* **26**

1.2. НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ OXPHOS МИТОХОНДРИЙ РАСТЕНИЙ **27**

1.2.1. Суперкомплекс I+III_2 ..... **29**

1.2.2. Суперкомплекс III_2+IV **31**

1.2.3. Суперкомплекс I+III_2+IV **32**

1.2.4. Димерная АТФ-синтаза **34**

1.3. СТАБИЛИЗАЦИЯ СУПЕРКОМПЛЕКСОВ СИСТЕМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ **36**

1.4. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ СУПЕРКОМПЛЕКСОВ СИСТЕМЫ OXPHOS МИТОХОНДРИЙ **40**

1.5. ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА ОРГАНИЗАЦИЮ И АКТИВНОСТЬ ЭТЦ РАСТЕНИЙ И ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ СУПЕРКОМПЛЕКСОВ ПРИ СТРЕССЕ **43**

1.6. ВЛИЯНИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ **46**

1.7. ВЫВОДЫ ИЗ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ **53**

2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 57
2.1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ **57**
2.2. УСЛОВИЯ ВЫРАЩИВАНИЯ **57**
2.3. ТЕМПЕРАТУРНАЯ ОБРАБОТКА **57**
2.4. ОЦЕНКА ОТНОСИТЕЛЬНОЙ МОРОЗОСТОЙКОСТИ ПРОРОСТКОВ **58**
2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ **59**
2.6. ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ **60**
2.7. ОЧИСТКА МИТОХОНДРИЙ **61**
2.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ И КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ **61**
2.8.1. Электронная микроскопия **62**
2.8.2. Тест на доступность цитохрома *c* **62**
2.8.3. Полярографический анализ активности митохондрий **63**
2.9. СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ НАТИВНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ **64**
2.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА **64**
2.11. ОДНОМЕРНЫЙ ГОЛУБОЙ НАТИВНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ (1D BNE) **65**
2.12. ДВУМЕРНЫЙ ГОЛУБОЙ НАТИВНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С НАТИВНОЙ ВТОРОЙ МЕРОЙ (2D BNE/BNE) **66**
2.13. ДВУМЕРНЫЙ ГОЛУБОЙ НАТИВНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С ДЕНАТУРИРУЮЩЕЙ ВТОРОЙ МЕРОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ (2D BNE/SDS) **67**
2.14. ОКРАСКА И ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ ГЕЛЕЙ **68**
2.15. ВЕСТЕРН-БЛОТТИНГ **69**
2.16. ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ АНТИТЕЛА **70**
2.17. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС БЕЛКОВ **70**

2.18. ДЕТЕКЦИЯ АКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ГЕЛЕ **71**
2.19. АНАЛИЗ ГЕЛЕЙ В ПРОГРАММЕ IMAGE J **72**
2.20. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ **72**
2.21. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ **73**
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ **74**
3.1. ЧИСТОТА И КАЧЕСТВО ИЗУЧАЕМЫХ ФРАКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ **74**
3.1.1. Интактность и функциональная активность митохондрий проростков гороха в условиях закаливания и низкотемпературного стресса **76**
3.2. ОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА **81**
3.2.1. Энзимография комплексов системы окислительного фосфорилирования митохондрий гороха в нативном голубом одномерном геле 1D BNE **82**
3.2.2. Детекция митохондриальных дыхательных комплексов и АТФ-синтазы на двумерных градиентных нативных гелях 2D BNE/BNE **88**
3.2.3. Анализ субъединичного состава суперкомплексов и комплексов системы окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха при помощи иммунохимии и масс-спектрометрии двумерных гелей 2D BNE/SDS **91**
3.3. ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СОСТАВ, СОДЕРЖАНИЕ И АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА **101**
3.3.1. Оценка физиологического состояния растений в изучаемых условиях гипотермии **103**
3.3.2. Влияние гипотермии различной интенсивности на состав суперкомплексов, комплексов системы окислительного фосфорилирования в митохондриях проростков гороха **106**

3.3.3. Активность дыхательных монокомплексов и комплексов в составе суперкомплексов системы окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха в условиях гипотермии **111**
ЗАКЛЮЧЕНИЕ **118**
ВЫВОДЫ **126**
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ **128**
ПРИЛОЖЕНИЕ А **155**
ПРИЛОЖЕНИЕ Б **159**
ПРИЛОЖЕНИЕ В **161**
ПРИЛОЖЕНИЕ Г **163**
ПРИЛОЖЕНИЕ Д **165**
ПРИЛОЖЕНИЕ Е **166**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота

АДФ – аденозин-5-дифосфат

АТФ – аденозин-5-трифосфат

АФК – активные формы кислорода

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДК – коэффициент дыхательного контроля

МДА – малоновый диальдегид

НАДН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида

НАДФН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата

НАД(Ф)Н-ДГ – митохондриальные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы

ПОЛ – прекисное окисление липидов

ПААГ – полиакриламидный гель

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тиобарбитуровая кислота

Трис – трисгидроксиметиламинометан

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

γCA – карбоангидраза гамма-типа

DAB – 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид

1D BNE – одномерный голубой нативный электрофорез в полиакриламидном геле

2D BNE/BNE – двумерный голубой нативный электрофорез в полиакриламидном геле

2D BNE/SDS – двумерный голубой нативный электрофорез в полиакриламидном геле с денатурирующей второй мерой с SDS

AOX – альтернативная антимицин А- и цианид-резистентная оксидаза

BCIP – 5-бромо-4-хлоро-3-индоилфосфат

COR (Cold-Regulated) – холодорегулируемые белки/гены

COX – цитохром *c* оксидаза

KCN – цианид калия

LEA (Late Embryogenesis Abundant) – белки позднего эмбриогенеза

MOPS – 3-морфолинопропансульфоновая кислота

MPP – митохондриальная процессинговая пептидаза

NBT – нитроголубой тетразолиум

NDA – “внутренние” ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы

NDB – “внешние” ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы

OXPHOS – система окислительного фосфорилирования

PMS – феназинметасульфат

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

PUMP (Plant Uncoupling Mitochondrial Protein) – разобщающий белок растений

PVP – поливинилпирролидон

SDH – сукцинатдегидрогеназа

SDS – додецилсульфат натрия

SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле с SDS

TEMED – тетраметилэтилендиамин

UCP (UnCoupling Protein) – разобщающий белок

UQ – убихинон

UQH_2 – убихинол

V_3 (скорость окисления субстрата в состоянии 3) – скорость поглощения кислорода митохондриями при фосфорилировании АДФ

V_4 (скорость окисления субстрата в состоянии 4) – скорость поглощения кислорода митохондриями после истощения АДФ

ВВЕДЕНИЕ

Система окислительного фосфорилирования (система OXPHOS) митохондрий играет важную роль в жизни клеток, прежде всего благодаря тому, что в результате окисления субстратов дыхания на внутренней мембране митохондрий образуется электрохимический потенциал, который используется АТФ-синтазой для синтеза молекулы АТФ – источника энергии в доступной для клетки форме. OXPHOS состоит из пяти основных комплексов (I–V) и двух мобильных переносчиков электронов (убихинон и цитохром *c*). Структура всех компонентов системы на сегодняшний день хорошо изучена. Митохондрии растений имеют отличительную особенность, которая заключается в наличии альтернативных ферментов. В связи с этим их дыхательная цепь является более разветвленной.

Представление о нативной организации системы окислительного фосфорилирования митохондрий находится в постоянном развитии. При помощи современных методов электронной микроскопии, одномерного и двумерного голубого нативного форезов в градиентном полиакриламидном геле, масс-спектрометрического анализа активно изучается структура системы OXPHOS митохондрий животных, грибов, бактерий и растений. Накопленная за последние годы информация позволяет предположить, что дыхательные комплексы и АТФ-синтаза организованы в более сложные динамичные структуры, так называемые суперкомплексы. Идея о том, что дыхательные ферменты ЭТЦ могут объединяться в более крупные структурные образования, была предложена еще Chance и Williams в 1956 г. (Chance, Williams, 1956). Однако дальнейшие исследования с использованием детергентов и хроматографических методов показали, что все дыхательные комплексы легко отделяются друг от друга при солюбилизации и при этом обладают биохимической активностью (Hatefi et al., 1962; Hackenbrock et al., 1986). В результате была сформирована и существовала долгое время так называемая “жидкостная модель” (fluid state model) ЭТЦ

митохондрий, согласно которой дыхательные комплексы располагаются во внутренней митохондриальной мембране отдельно друг от друга и перенос электронов между ними обеспечивается случайным столкновением и взаимодействием небольших связующих молекул, таких как цитохром *c* и убихинон (Welchen et al., 2011). По мере накопления данных представление об организации ЭТЦ эволюционировало от “жидкостной модели” до модели “твердого” состояния (solid state model), в которой комплексы стабильно взаимодействуют друг с другом, образуя супермолекулярные структуры, называемые суперкомплексами, и далее до современной интегральной объединенной модели. Согласно последней в дыхательной цепи митохондрий присутствуют как отдельные комплексы, так и их ассоциации – суперкомплексы (Welchen et al., 2011; Lenaz, Genova, 2012). По последним данным стехиометрия суперкомплексов может быть различной и представлена комбинацией либо 2-х комплексов, например I и III или III и IV ($I+III_2$, I_2+III_2, III_2+IV_{1-2}), либо различными соотношениями 3-х комплексов – I, III и IV ($I+III_2+IV_{1-4}$), так называемыми респирасомами. При этом суперкомплексы могут ассоциировать и образовывать целые дыхательные участки, называемые мегакомплексами. АТФ-синтаза образует димеры, которые объединяются в олигомерные структуры, располагающиеся на апексах крист (Chaban et al., 2014). Совершенно очевидно, что ассоциация дыхательных комплексов и АТФ-синтаз в суперкомплексы и мегакомплексы открывает новые свойства системы OXPHOS митохондрий. Предполагается, что эти структуры определяют более стабильное и эффективное функционирование дыхательной цепи, а также способствуют снижению образования опасных интермедиатов реакций. Олигомеризация АТФ-синтазы в митохондриях способствует формированию изгиба крист (Kuhlbrandt and Davies, 2016), а также усилению локального протонного градиента, необходимого для синтеза АТФ (Strauss et al., 2008).

Организация и состав суперкомплексов в различных видах и даже на разных фазах развития растений изучается достаточно активно. Так, имеются данные о

надмолекулярной организации системы окислительного фосфорилирования таких растений, как фасоль (*Phaseolus vulgaris*), ячмень (*Hordeum vulgare*) (Eubel et al., 2003), арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*) (Eube et al., 2003; Klodmann et al., 2011), шпинат (*Spinacia oleracea*) (Krause et al., 2004), табак (*Nicotiana sylvestris*) (Pineau et al., 2005), горох (*Pisum sativum*) (Taylor et al., 2005), спаржа (*Asparagus officinalis*) (Dudkina et al., 2006), кукуруза (*Zea mays*) (Peters et al., 2008), картофель (*Solanum tuberosum*) (Bultema et al., 2009), бамбук (*Bambusa oldhamii*, *Phyllostachys edulis*) (Chien et al., 2011). Однако информация о нативном состоянии и организации системы OXPHOS митохондрий носит противоречивый характер, т.к. получена с использованием различных неионогенных детергентов, как более щадящих, таких как дигитонин, максимально сохраняющих нативную конформацию белков, так и более сильных, таких как додецилмальтозид, разбивающих суперкомплексы на отдельные комплексы или более мелкие ассоциации дыхательных комплексов. Так, например, в единственной, по нашим сведениям, работе (Taylor et al., 2005), в которой был определен нативный состав комплексов окислительного фосфорилирования в органеллах зеленых растений гороха, авторы использовали “жесткий” детергент додецилмальтозид, что дало неполное представление о нативной организации системы OXPHOS этого вида.

Исследования надмолекулярной организации ЭТЦ митохондрий позволили обнаружить, что респирасомы в различных организмах стабильны, т.к. могут быть выделены как целые функциональные единицы без значительных повреждений. В связи с этим интерес многих исследователей в настоящее время направлен на поиск факторов, обеспечивающих прочную связь компонентов дыхательных суперкомплексов. На сегодняшний день удалось обнаружить пока единичные факторы белковой и липидной природы, стабилизирующие дыхательные суперкомплексы. К таким факторам можно отнести белки Rsf1 и Rsf2 (Chen et al., 2012), АДФ/АТФ транслокатор Aac2 (Claypool et al., 2008; Dienhart et al., 2008), стабилизирующие суперкомплекс III_2+IV_2 в митохондриях дрожжей; субъединицу VIIa цитохромоксидазы (Cox7-a2l), необходимую для сборки суперкомплекса

III_2+IV в органеллах фибробластов мыши (Lapuente-Brun et al., 2013); а также кардиолипин, который необходим для прочной и эффективной ассоциации дыхательных комплексов и других мембранных белков (Zhang et al., 2002).

Несмотря на то, что нативная организация системы OXPHOS митохондрий у различных видов растений и на разных фазах их развития активно изучается, исследования по влиянию факторов среды на состав и активность суперкомплексов пока единичны. В частности, есть данные, показывающие снижение содержания и распад ассоциаций дыхательных комплексов в условиях гипоксии, низкого pH и аноксии (Millar et al., 2004b; Ramirez-Aguilar et al., 2011). Эти и другие единичные сведения предполагают, что надмолекулярная организация системы OXPHOS в неблагоприятных условиях претерпевает изменения и восстанавливается после возвращения в оптимальные условия. Однако для подтверждения этого предположения и расширения представления о стрессовой реакции системы окислительного фосфорилирования необходимо больше информации о состоянии ЭТЦ митохондрий разных видов растений при более широком спектре стрессовых воздействий, различающихся по интенсивности и продолжительности.

Влияние гипотермии на состав и активность суперкомплексов в растительных митохондриях до сих пор остается малоизученым. В связи с этим изучение возможных изменений в организации системы окислительного фосфорилирования митохондрий растений в условиях низкотемпературного воздействия различной интенсивности является актуальным и представляет огромный интерес. Учитывая это, мы предприняли попытку изучить влияние различных низкотемпературных обработок на нативное состояние системы OXPHOS митохондрий, используя в качестве модельного объекта органеллы этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.) сорта “Аксайский усатый 55”. Предварительно необходимо было охарактеризовать нативный состав суперкомплексов и комплексов системы OXPHOS митохондрий проростков гороха, так как на сегодняшний день этот вопрос недостаточно изучен.

В связи с этим **целью** работы явилось изучение надмолекулярной организации системы окислительного фосфорилирования митохондрий этиолированных проростков гороха и ее изменений в условиях гипотермии различной интенсивности.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- изучить нативную организацию OXPHOS митохондрий этиолированных проростков гороха;
- исследовать влияние стрессовых низких температур и закаливания на состав, содержание и активность суперкомплексов и комплексов окислительного фосфорилирования этих органелл;
- оценить физиологическое состояние проростков гороха в изучаемых условиях (устойчивость к промораживанию и степень развития окислительного стресса), а также изучить влияние гипотермии на интактность и функциональную активность митохондрий.

Положения, выносимые на защиту

1) Система окислительного фосфорилирования митохондрий гороха имеет более сложную надмолекулярную организацию, чем считалось прежде.

2) Гипотермия вызывает снижение содержания и активности большинства суперкомплексов, при этом увеличивается содержание отдельных комплексов I и III_2. Активность несвязанной формы комплекса I резко возрастает при стрессе.

3) Частичная потеря суперкомплексной организации OXPHOS митохондрий проростков гороха является одной из причин снижения функциональной активности органелл в условиях низких температур.

Научная новизна

При помощи методов одномерного и двумерного голубого нативного форезов (1D BNE, 2D BNE/BNE) с последующим энзимографическим окрашиванием ферментативной активности отдельных комплексов в геле,

иммуноблоттинга и масс-спектрометрического анализа двумерных 2D BNE/SDS-гелей получены новые данные об организации системы OXPHOS митохондрий проростков гороха и ее изменении в условиях низких температур.

Впервые показано, что система окислительного фосфорилирования митохондрий этиолированных проростков гороха представлена мажорным суперкомплексом I+NDA+III_2+IV; несколькими респирасомами, включающими разное количество копий комплекса IV (I+III_2+IV_n); суперкомплексом NDA+NDB+III_2+IV; мегакомплексом, включающим комплекс II, с предполагаемой молекулярной массой около 10000 кДа (II+III_2+IV)$_n$; а также минорной и мажорными АТФ-синтасомами Va+NDA+NDB+AOX и Vb+NDA+NDB+AOX. Ассоциация NDA, NDB и AOX с АТФ-синтазой, и NDA с суперкомплексом I+III_2+IV, а NDA и NDB с суперкомплексом III_2+IV в растительных митохондриях обнаружены впервые, поскольку ранее считалось, что эти альтернативные ферменты не связаны с дыхательными надмолекулярными структурами (Eubel et al., 2003; Klodmann et al., 2011; Welchen et al., 2011). Установлено, что основная часть внутренних и внешних альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, детектируемых используемыми антителами, ассоциирует с суперкомплексами системы OXPHOS, а альтернативная оксидаза в основном находится в свободной несвязанной форме. Присутствие сукцинатдегидрогеназы в составе мегакомплекса также интересно, поскольку считалось, что этот фермент не входит в состав суперкомплексов и имеются лишь единичные сведения о его связи с другими компонентами ЭТЦ митохондрий (Eubel et al.,2003; Millar et al., 2004a). Кроме вышеупомянутых ассоциаций, все дыхательные ферменты присутствуют и в виде монокомплексов.

Впервые обнаружено, что в условиях гипотермии различной интенсивности уменьшаются содержание и активность большинства обнаруженных суперкомплексов, таких как I+III_2+IV_n, I+NDA+III_2+IV, Va+NDA+NDB+AOX и Vb+NDA+NDB+AOX. Содержание и активность мегакомплекса (II+III_2+$IV_{1–4}$)$_n$ снижаются только в условиях жесткого стресса. При закаливании, наоборот,

происходит накопление и увеличение активности этой ассоциации, а при мягком стрессовом воздействии наблюдается только рост ее активности без существенного увеличения содержания. На фоне общего снижения содержания большинства суперкомплексов происходит накопление отдельно функционирующих комплексов I и III_2, что, вероятно, является результатом распада респирасом $I+III_2+IV_n$ и $I+NDA+III_2+IV$ в низкотемпературных условиях. Показано, что в условиях закаливания активность комплекса I остается на уровне контроля, а при стрессах – значительно увеличивается.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе исследования данные расширяют современные представления об организации системы OXPHOS растительных митохондрий и механизмах регуляции и стабилизации дыхательной цепи этих органелл в условиях холодовой адаптации и низкотемпературного стресса. Материалы работы могут быть использованы в научно-исследовательских и образовательных учреждениях в лекционных курсах по профилю рассматриваемой диссертации.

Апробация работы. Результаты исследования по теме диссертации были представлены и обсуждались на Всероссийской научной конференции “Механизмы регуляции функций растительных органелл” (Иркутск, 2014), Европейской биоэнергетической конференции EBEC (Лиссабон, Португалия, 2014), VIII Съезде ОФР и Всероссийской конференции с международным участием “Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий” (Петрозаводск, 2015), Международной молодежной научно-практической конференции Россия – Монголия (Иркутск, 2016), Всероссийской научной конференции с международным участием “Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде” (Иркутск, 2016).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах из Перечня ВАК РФ.

Благодарности. Автор выражает глубокую сердечную благодарность научному руководителю к.б.н. И. В. Уколовой за всестороннюю помощь, ценные советы и рекомендации. Автор благодарен вед. технологу лаборатории физиологической генетики А. И. Антипиной, начальнику станции искусственного климата (фитотрон) СИФИБР СО РАН к.б.н. М. А. Раченко и всему коллективу фитотрона за помощь в проведении экспериментальной работы, а также г.н.с. лаборатории физиологической генетики д.б.н., профессору Г. Б. Боровскому, с.н.с. лаборатории физиологии растительной клетки к.б.н. Е. В. Прадедовой, г.н.с. лаборатории физиологической генетики д.б.н. Т. П. Побежимовой, с.н.с. лаборатории генетической инженерии растений к.б.н. М. В. Кулинченко, с.н.с. лаборатории физиолого-биохимической адаптации к.б.н. А. В. Пермякову, вед. инженеру лаборатории физиологической генетики А. В. Сидорову, заведующему лаборатории биоиндикации экосистем д.б.н. В. И. Воронину и с.н.с. лаборатории аналитической биоорганической химии ЛИН СО РАН к.б.н. И. Г. Кондратову за ценные советы, рекомендации и помощь в работе. Автор благодарит заведующего лаборатории физиологической генетики СИФИБР СО РАН д.б.н., профессора В.К. Войникова и весь коллектив лаборатории за доброжелательное отношение и моральную поддержку.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. СИСТЕМА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ РАСТЕНИЙ

Окислительное фосфорилирование является главным источником энергии в клетке. Оно представляет собой перенос электронов по цепи белковых комплексов на кислород с образованием протонного электрохимического потенциала, который используется для образования молекулы АТФ. У большинства живых организмов система окислительного фосфорилирования состоит из АТФ синтазы (комплекс V) и четырех оксидоредуктазных комплексов: НАДН-дегидрогеназа (комплекс I), сукцинатдегидрогеназа (комплекс II), цитохром *c* редуктаза (комплекс III) и цитохром *c* оксидаза (комплекс IV). Комплексы I и II переносят электроны на убихинон, который передает их комплексу III. Комплекс III транспортирует электроны от убихинола на цитохром *c*. И наконец, комплекс IV переносит электроны от цитохрома *c* на молекулу кислорода. Перенос электронов в трех из четырех оксидоредуктазных комплексов дыхательной цепи сопряжен с транслокацией протонов из матрикса митохондрий в межмембранное пространство. Такое сопряжение приводит к образованию электрохимического протонного градиента, который используется комплексом V для каталитического образования АТФ путем фосфорилирования АДФ (Нельсон, Кокс, 2014; Chaban et al., 2014).

В растениях, многих грибах и одноклеточных организмах есть и другой, альтернативный путь переноса электронов. Он выглядит следующим образом: электроны от субстрата поступают либо на НАД(Ф)Н-дегидрогеназы II типа (альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы), в обход комплекса I, затем последовательно на комплекс III и IV; либо от НАДН-дегидрогеназ через альтернативные оксидазы (AOX), минуя комплекс III и IV, прямо на кислород. Работа альтернативных оксидоредуктаз не сопряжена с транспортом протонов через внутреннюю мембрану. Вследствие этого не образуется трансмембранный

градиент, что является основным механизмом защиты от перенасыщения дыхательной цепи (Грабельных и др., 2014).

Благодаря современным методам, таким как электронная микроскопия с высоким разрешением, рентгено-кристаллографический анализ, голубой нативный электрофорез, масс-спектрометрический анализ структура и состав компонентов митохондриальной дыхательной цепи на сегодняшний день хорошо изучены.

1.1.1. Комплекс I

Комплекс I является самым большим комплексом дыхательной цепи. Он представлен ферментом НАДН-дегидрогеназой (НАДН-убихинон оксидоредуктаза). Этот фермент относится к флавопротеинам. Наряду с коферментом флавинмононуклеотидом (ФМН) в его состав входят семь FeS-кластеров. Апофермент НАДН-дегидрогеназы имеет сложную пространственную организацию в виде L-образной формы и состоит из гидрофильного периферического и гидрофобного мембранного доменов, называемых “руками” (Efremov et al., 2010). Гидрофильная периферическая “рука” содержит ФМН и FeS-кластеры и располагается со стороны матрикса, а длинная гидрофобная мембранная “рука” встроена во внутреннюю мембрану. Перенос электронов полностью протекает в периферическом домене (Sazanov et al., 2006) и сопровождается перекачкой протонов через мембрану (Baradaran et al., 2013).

Хотя этот фермент высококонсервативен для всех организмов, все же есть некоторые отличия. Так, бактериальный комплекс I состоит из 14 субъединиц (по 7 субъединиц на каждую “руку”) с общей молекулярной массой 500 кДа (Abdrakhmanova et al., 2004). Однако у эукариот комплекс I состоит из более чем 40 субъединиц и весит около 1000 кДа. Например, комплекс I митохондрий быка состоит из 44 субъединиц, 16 из них локализованы в периферической, а 28 в мембранной области (Carroll et al., 2006; Balsa et al., 2012). Примечательно, что состав комплекса I разных эукариот отличается наличием видоспецифичных

субъединиц (Cardol et al., 2011). Дополнительные субъединицы особенно характерны для растений. С помощью электронной микроскопии были показаны уникальные части растительного комплекса I (Dudkina et al., 2005a; Sunderhaus et al., 2006; Peters et al., 2008; Bultema et al., 2009). Они представляют собой наружные специфические домены, которые прилегают к мембранной “руке” в центральной части, и подобно периферической “руке” выступают в митохондриальный матрикс (Perales et al., 2005; Sunderhaus et al., 2006). Среди них группа субъединиц, гомологичных архебактериальной карбоангидразе гамма-типа (γCA). Карбоангидраза γ-типа – это цинксодержащий фермент, катализирующий взаимопревращения CO_2 и HCO_3^-. У арабидопсиса γCA прикреплена к гидрофобному домену митохондриального комплекса I на стороне, выступающей в матрикс, и формирует отдельный домен, характерный для этого комплекса в растениях (Dudkina et al., 2005a; Sunderhause et al., 2006; Peters et al., 2008). В арабидопсисе три карбоангидразные субъединицы (CA1, CA2 и CA3) и дополнительно два меньших по массе белка (CAL1 и CAL2) формируют часть комплекса I, а в рисе обнаружено три таких γCA. Другим специфическим белком первого комплекса растительных митохондрий является L-галактоно-1, 4-лактон дегидрогеназа (L-GalLDH) – фермент, участвующий в превращении L-галактоно-1, 4-лактона до аскорбиновой кислоты. Было показано, что он прикреплен к внутренней митохондриальной мембране (Bartoli et al., 2000) и связан с комплексом I (Heazlewood et al., 2003). Функции дополнительных субъединиц пока не ясны, но показано, что они необходимы при сборке комплекса I и, возможно, участвуют в его стабилизации (Welchen et al., 2011).

Комплекс I является основной, но не единственной точкой входа электронов. Электроны могут поступать в ЭТЦ также через комплекс II.

1.1.2. Комплекс II

Комплекс II (сукцинат-убихинон оксидоредуктаза) – самый маленький компонент системы окислительного фосфорилирования, который является

мембранносвязанным белком, состоящим из четырех субъединиц (SDH1 – SDH4). Он играет важную роль в митохондриальном метаболизме, так как вовлечен в цикл трикарбоновых кислот и в митохондриальную электрон-транспортную цепь. Комплекс II катализирует окисление сукцината до фумарата и восстанавливает убихинон (UQ) до убихинола (UQH_2). Активность этого комплекса не сопряжена с образованием электрохимического градиента протонов на мембране, направленного на синтез АТФ (Klodmann et al., 2011).

Впервые структура комплекса II была показана с помощью рентгено-кристаллографического анализа на *E. coli* (Yankovskaya et al., 2003). В бактериях и у гетеротрофных эукариот он содержит всего 4 субъединицы: флавопротеид (SDH1), железосерный белок (SDH2) и небольшие интегральные мембранные белки (SDH3 и SDH4). Два гидрофильных домена (SDH1 и SDH2) выступают в митохондриальный матрикс и заякорены в мембране гидрофобными субъединицами SDH3 и SDH4, которые меньше по размеру. Самый большой гидрофильный домен, называемый SDH1, ковалентно связан с молекулой флавинадениндинуклеотида (ФАД). Другой гидрофильный домен SDH2 – это железо-серный белок, содержащий три FeS-кластера, ответственные за перенос электронов от ФАД к мембранному домену комплекса II. Гидрофобные домены SDH3 и SDH4 связывают гем цитохрома *b*-типа и, соединяясь вместе, образуют сайт связывания UQ. У высших растений сукцинатдегидрогеназа содержит дополнительные 4 наружных домена (SDH5, SDH6, SDH7, SDH8) с неизвестными функциями (Eubel et al.,2003; Millar et al., 2004a).

Комплекс II – наиболее простой компонент электрон-транспортной цепи и самый вариативный в разных организмах. Все части комплекса II у животных и грибов кодируются ядерным геномом, тогда как гены *sdh* зоофлагеллят *Reclinomonas americana* (*sdh*2, *sdh*3 и *sdh*4) и печеночника *Marchantia polymorpha* (*sdh*3 и *sdh*4) обнаружены в митохондриальном геноме. В арабидопсисе все гены, кодирующие комплекс II, находятся в ядерном геноме, а найденные в митохондриальном геноме последовательности генов во всех высших растениях

оказались псевдогенами. Сравнение структуры комплекса II *E.coli* и митохондрий млекопитающих показало существенные различия в трансмембранной области и в окружении простетических групп, что вызывает значительный сдвиг среднего значения окислительно-восстановительного потенциала ферментов (Sun et al., 2005). Комплексы II митохондрий растений и млекопитающих сильно отличаются по гидрофобным доменам. Кроме того, недавно Huang с соавторами (Huang et al., 2010), используя транскриптомный и протеомный подходы, на примере риса и арабидопсиса показали, что сукцинатдегидрогеназы однодольных и двудольных растений тоже отличаются. В рисе комплекс II нестабилен, в отличие от арабидопсиса. У риса обнаружено семь субъединиц, тогда как в арабидопсисе их восемь. Сукцинат-зависимое потребление кислорода и активность фермента в арабидопсисе в значительной степени регулировались АТФ. Однако в рисе эффект АТФ был гораздо слабее. Эти виды растений также отличались по направлению экспрессии генов ортологов (Huang et al., 2010).

1.1.3. Комплекс III

Комплекс III (убихинон-цитохром *c* оксидоредуктаза, комплекс bc_1) окисляет убохинол, восстановленный комплексом I или II, катализируя перенос электронов на цитохром *c*, что сопровождается транслокацией через внутреннюю мембрану четырех протонов на каждую пару электронов. У большинства высших эукариот комплекс III состоит из 11 субъединиц, у растений из 10 (Braun, Schmitz, 1995; Meyer et al., 2008). Все части комплекса кодируются ядерным геномом, кроме цитохрома *b*, который кодируется митохондриальным геномом. Гидрофобный интегральный мембранный белок, содержащий восемь трансмембранных спиралей и цитохром *b*, составляет основу для сборки и функционирования комплекса III, вместе с цитохромом c_1 и железо-серным белком он формирует каталитический центр фермента (Blakely et al., 2005). Остальные субъединицы комплекса III, обнаруженные у растений, не имеют гомологов в бактериях и их функции по большей части неизвестны. Две самые

большие из них называют коровыми белками, потому что первоначально предполагали, что они образуют центральную часть комплекса. Обнаруженные последовательности похожи на две субъединицы митохондриальной процессинговой пептидазы (MPP). У млекопитающих и дрожжей MPP локализована в митохондриальном матриксе, а у высших растений располагается во внутренней митохондриальной мембране, где она полностью интегрирована в комплекс bc_1 дыхательной цепи. Вследствие этого комплекс III бифункционален у данной группы организмов. Однако процессинговая активность не зависит от активности комплекса в транспорте электронов (Welchen et al., 2011).

Сопровождающие белки в комплексе III, которые не являются функциональными, требуются для сборки. Так, в дрожжах шаперон Bcs1 вовлечен в связывание Fe-S белка и комплекса bc_1. Fe-S белок, предположительно, играет роль в димеризации комплекса III. Кроме того, мутации в двух дрожжевых белках Cbp3 и Cbp4 вызывают некоторые структурные дефекты при сборке комплекса III, но в настоящее время нет данных, указывающих на их специфическую роль при сборке данного комплекса. Сборка комплекса III требует правильной вставки простетических групп, которые важны для его функционирования (Welchen et al., 2011).

1.1.4. Комплекс IV

Комплекс IV или цитохром *c* оксидаза (COX) – конечный фермент митохондриальной дыхательной цепи. Он катализирует реакцию окисления цитохрома *c* и восстановления кислорода до воды. Этот перенос электронов сопряжен с транспортом протонов через внутреннюю мембрану. Данный комплекс, встроенный в мембрану, обращен как в межмембранное пространство, так и в матрикс, однако все же немного больше выступает в межмембранное пространство. Этот комплекс чувствителен к цианиду (Gupta, Rolletschek, 2013). Цитохром *c* оксидаза обычно обнаруживается в двух формах: большой – IVa с массой около 300 кДа и малой – IVb с массой около 200 кДа (Eubel et al., 2003). У

растений в форме IVb отсутствует белок массой 32 кДа, гомологичный субъединице COXVIb гетеротрофных эукариот, возможно, нет и других субъединиц. Обе формы COX присутствуют в картофеле, ячмене, бобах, арабидопсисе, бамбуке, но их соотношение видоспецифично. Некоторые субъединицы комплекса IV имеют две и более изоформ (Millar et al., 2004a).

Биогенез COX затруднен по причине того, что части фермента кодируются разными геномами и содержат несколько простетических групп, важных для ее функционирования, включая два гема (*a* и a_3), три иона меди, цинк, магний и ионы натрия (Carr, Winge, 2003). О биогенезе COX растений мало информации, основные данные были получены на комплементарных мутантах дрожжей. Сборка функционального цитохром *c* оксидазного комплекса зависит от наличия всех его структурных компонентов и более двух десятков COX-специфических факторов сборки (Welchen et al., 2011). Ядро комплекса состоит из трех больших гидрофобных субъединиц (Cox1, Cox2 и Cox3), кодируемых митохондриальным геномом. Аминокислотная последовательность этих трех частей высоко консервативна у разных видов. У прокариот организация комплекса простая, потому что субъединицы Cox1, Cox2 и Cox3 составляют функциональный холофермент. У эукариот COX включает 8–11 дополнительных периферических маленьких субъединиц, которые кодируются в ядре (Millar et al., 2004a; Khalimonchuk, Rodel, 2005). Каталитический центр фермента эукариот состоит из субъединиц, кодируемых митохондриями, которые связывают редокс-активные центры металлов. Cox1 – самая большая субъединица COX включает 12 трансмембранных доменов, содержит гем *a*, биметаллический центр с гемом a_3 и Cu_B. Предполагается, что этот белок является ключевой субъединицей для сборки COX и участвует в транслокации протонов через две поры – D и K-каналы. Субъединица Cox2 связывает биядерный Cu_A центр, который расположен на внешней стороне внутренней мембраны и является входом для электронов, которые поступают от цитохрома *c*. Так же как Cox1, субъединица Cox3 представляет собой очень гидрофобный белок, пронизывающий внутреннюю

митохондриальную мембрану с семью трансмембранными спиралями. Он не несет никаких простетических групп и напрямую не вовлечен в транслокацию протонов. Его особая роль в СОХ до сих пор неизвестна, но было предположено, что Cox3 необходим для сборки и/или стабильности СОХ (Meunier, Taanman, 2002).

Все белки, кодируемые ядром, сравнительно маленькие по отношению к белкам, кодируемым митохондриями (Welchen et al., 2011). Их молекулярные массы от 5,4 до 14,9 кДа в дрожжах и от 5 до 17,1 кДа у млекопитающих. Несмотря на тот факт, что эти субъединицы играют, скорее всего, вспомогательную роль в каталитическом функционировании СОХ, исследование на дрожжевых нок-аутных мутантах показало, что они необходимы для конформации фермента и его активности. Например, ранняя стадия сборки СОХ млекопитающих зависит от Cox4 субъединицы (Nijtmans et al., 1998). В последние годы укрепилось предположение о том, что некоторые из закодированных ядром субъединиц СОХ важны для стабильности комплекса и для защиты каталитического центра фермента против токсичности АФК (Fontanesi et al., 2006).

В растениях также есть несколько субъединиц, кодируемых ядром, большинство из которых имеет молекулярную массу менее 10 кДа. Используя 2D BN/SDS PAGE, было показано, что комплекс IV картофеля состоит из 10 субъединиц, а у арабидопсиса их еще больше (Jansch et al., 1996; Eubel et al., 2003; Millar et al., 2004a). Некоторые из субъединиц, кодируемых ядром, такие как Cox5b, Cox5c и Cox6b, Cox6a были впервые обнаружены в рисе, картофеле и арабидопсисе посредством гомологии с белками дрожжей и млекопитающих (Nakagawa et al., 1990; Kadowaki et al., 1996; Ohtsu et al., 2001; Curi et al., 2003). Некоторые дополнительные растительные специфические кодируемые ядром субъединицы СОХ были обнаружены с помощью масс-спектрометрии, но их функции в настоящее время пока не известны.

1.1.5. Комплекс V

Комплекс V представляет собой F_1F_O АТФ-синтазу H^+-типа, которая катализирует последний этап окислительного фосфорилирования, преобразуя электрохимический протонный градиент на внутренней мембране в молекулу АТФ (Chaban et al., 2014). Данный фермент формируется из 15–18 субъединиц и имеет молекулярную массу около 500–600 кДа (Eubel et al., 2003; Dudkina et al., 2010). Гидрофильная часть F_1 состоит из трех α- и трех β-субъединиц. F_1 часть присоединяется к погруженной в мембрану кольцеобразной олигомерной субъединице *c* части F_O, с помощью центрального и периферического стержней. F_O состоит из субъединиц: a (Su6), A6L (Su8), e, f, g, центрального стержня, содержащего γ, δ, ε субъединицы и периферического стержня, сформированного субъединицами белка, чувствительного к олигомицину (OSPC), – Su5, b, d, F6 (h) (Dudkina et al., 2008). В дрожжах есть две специфические дополнительные субъединицы i и k, относящиеся к мембранной части. Протоны пересекают мембрану через вращающийся канал *c* кольца и центральный стержень. αβ-Тример части F_1 останавливает вращение с помощью периферического стержня и катализирует синтез АТФ (Gresser et al., 1982). Основные компоненты фермента высоко консервативны как для прокариотических, так и для эукариотических организмов.

Нативная АТФ-синтаза в живых организмах существует как димер, соединенный через F_O, и образует угловую структуру, которая приводит к изгибу внутренней митохондриальной мембраны и образованию крист (Dudkina et al., 2008).

1.1.6. Альтернативные ферменты

В растениях кроме классического пути переноса электронов по дыхательной цепи есть альтернативный путь, который осуществляется с помощью альтернативных ферментов – НАД(Ф)Н-дегидрогеназ (НАД(Ф)Н-ДГ) II типа и альтернативных оксидаз (AOX) (Finnegan et al., 2004). НАД(Ф)Н-ДГ II типа

расположены с матриксной и внешней сторон внутренней митохондриальной мембраны (Rasmusson et al., 2001, 2004; Smith et al., 2011). Внутренние ферменты локализованы во внутренней митохондриальной мембране со стороны матрикса и имеют мол. массы 46–49 кДа, а внешние – со стороны межмембранного пространства и в исследованных видах имеют массу 61 кДа (Rasmusson et al., 2001). Эти ферменты включают нековалентно-связанный ФАД и два нуклеотид-связывающих участка: N-терминальный участок, связывающий ФАД, и C-терминальный участок, связывающий НАД(Ф)Н (Kerscher et al., 2000).

В арабидопсисе альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы кодируются двумя семействами генов *NDA* (два гена) и *NDB* (четыре гена) (Michalecka et al., 2003). Klodman с коллегами (Klodmann et al., 2011), изучая протеом митохондрий суспензионной культуры клеток арабидопсиса, на BNE-геле обнаружили НАДН-дегидрогеназную активность в области 160 кДа. Последующие 2D BNE/SDS-PAGE и масс-спектрометрия показали, что все обнаруженные белки являются NDA2, NDB2 и NDB4 с молекулярными массами мономерных белков в диапазоне от 56 до 65 кДа. Опираясь на полученные данные, авторы заключают, что NDA и NDB могут формировать белковые комплексы, которые, возможно, имеют гетеротримерную структуру (Klodmann et al., 2011).

Альтернативная оксидаза – мембранный белок, расположенный со стороны матрикса, который катализирует перенос электрона от убихинола на кислород и четырехэлектронное восстановление последнего до воды (Vanlerberghe, 2013). AOX нечувствительна к цианиду, азиду, антимицину A, миксотиазолу, CO (Меденцев и др., 1999) и обнаружена у всех исследованных видов растений, многих эукариотических водорослей, грибов, дрожжей, а также в митохондриях простейших (Vanlerberghe, 2013). В зависимости от исследуемого вида этот фермент имеет мол. массу от 29 до 40 кДа (Umbach et al., 1993; Меденцев и др., 1999; Moore et al., 2008, 2013; Konert et al., 2015) и кодируется субсемейством двух ядерных генов *AOX1* и *AOX2* (Considine et al., 2002). AOX растений, в отличие от AOX грибов, функционирует в виде димера, активирующегося α-

кетокислотами, особенно пируватом, и НАД(Ф)Н, который восстанавливает дисульфидные связи фермента и резко повышает его активность (Vanlerberghe, 2013).

Внешние и внутренние НАД(Ф)Н-дегидрогеназы II типа могут окислять субстрат в присутствии ротенона – мощного ингибитора комплекса I, а альтернативные оксидазы катализируют окисление UQH_2 до UQ в присутствии ингибиторов комплексов III и IV (Millar et al., 2011). Перенос электронов альтернативными ферментами не сопряжен с транспортом протонов в межмембранное пространство, и, следовательно, не приводит к образованию протонного градиента и АТФ. Активация данного пути является важным защитным механизмом растений при различных стрессовых условиях (Грабельных и др., 2014).

1.1.7. Убихинон и цитохром *c*

Ферментативные комплексы митохондриальной дыхательной цепи взаимодействуют с помощью мобильных редокс-активных переносчиков, – убихинона и цитохрома *c*. Убихинон забирает электроны от комплекса I или комплекса II и передает их на комплекс III, а цитохром *c* акцептирует электроны от комплекса III и переносит их к комплексу IV.

Убихинон представляет собой липофильный хинон, встроенный в липидный бислой. На сегодняшний день при помощи метода, позволяющего проследить поток электронов в ЭТЦ митохондрий (flux control analysis), установлено существование свободного пула убихинона, располагающегося во внутренней митохондриальной мембране, и убихинона, заякоренного в суперкомплексе $I+III_2$ (Genova, Lenaz, 2014).

Цитохром *c* – гидрофильный металлопротеин, существующий в межмембранном пространстве как мономер массой 12 кДа. На митохондриях дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Boumans et al., 1998; Heinemeyer et al., 2007) показано тесное взаимодействие комплексов III, IV и цитохрома *c* в

суперкомплексах III_2+IV и III_2+IV_2. Согласно структурной модели комплекса III_2+IV_{1-2}, полученной на основании данных кристаллографического анализа, цитохром *c*-связывающие карманы на поверхностях двух комплексов располагаются близко друг к другу, создавая условия для эффективного переноса электронов быстрым “пинг-понг” перемещением цитохрома *c* (Welchen et al., 2011). Анализ мутантов дрожжей и млекопитающих показал, что цитохром *c* необходим для сборки и стабилизации комплексов I, III и IV (Pears et al., 1995; Barrientos et al., 2003; Vempati et al., 2009). Предполагается, что он также формирует комплекс с ферментом L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназой массой 100 кДа (Klodmann, Braun, 2011).

Помимо роли электронного переносчика цитохром *c* участвует в других важных клеточных процессах, таких как программируемая клеточная гибель у млекопитающих (Ow et al., 2008), в синтезе аскорбата (Bartoli et al., 2000; Millar et al., 2003) и в превращении D-лактата до пирувата, катализируемого D-лактат дегидрогеназой (Engqvist et al., 2009).

1.2. НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ OXPHOS МИТОХОНДРИЙ РАСТЕНИЙ

Белковые комплексы дыхательной цепи впервые биохимически описаны еще в 1960-х годах на митохондриях быка при помощи метода субфракционирования с использованием солей желчных кислот, таких как холат или диоксихолат (Hatefi, 1985). Иногда получали определенные комбинации дыхательных комплексов, например I-го и III-го (Hatefi et al., 1961; Fowler, Richardson, 1963; Hatefi, Rieske, 1967). Позже методом хроматографического анализа с помощью детергентов были очищены все пять комплексов системы окислительного фосфорилирилирования. Так как все выделенные дыхательные ферменты представляли стабильные частицы белка, легко отделяемые друг от друга при солюбилизации мембран, было предположено, что они могут существовать отдельно *in vivo*. Это предположение было поддержано измерением

активности дыхательных белковых комплексов в везикулах внутренней мембраны (Hackenbrock et al., 1986).

В настоящее время при помощи современных методов электронной микроскопии, одномерного и двумерного голубого нативного электрофорезов в градиентном полиакриламидном геле, масс-спектрометрического анализа активно изучается организация и состав суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий животных, грибов, бактерий и растений. По мере накопления данных представление об организации ЭТЦ эволюционировало от “жидкостной” модели (fluid-state model), согласно которой дыхательные комплексы располагаются отдельно друг от друга (и перенос электронов возможен только в результате их случайных взаимодействий), до модели “твердого” состояния (solid-state model), при которой комплексы стабильно взаимодействуют друг с другом, образуя надмолекулярные структуры, называемые суперкомплексами, и далее до современной интегральной объединенной модели (рис. 1.) (Welchen et al., 2011).

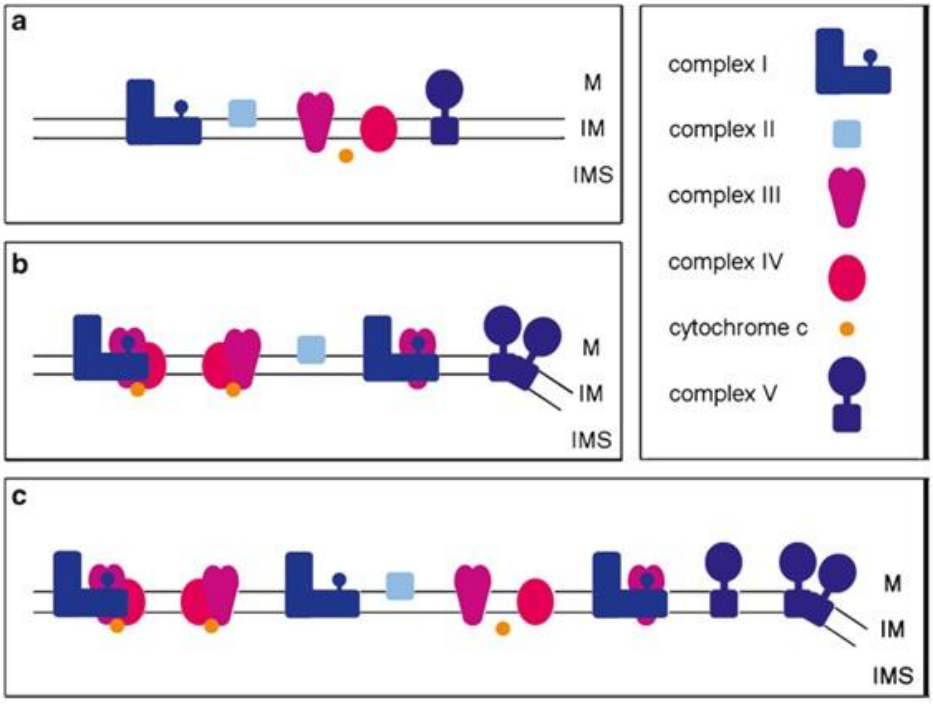


Рис. 1. Схематическая модель ЭТЦ митохондрий (Welchen et al., 2011)

(**a**) “Жидкостная” модель (fluid-state model), (**b**) модель “твердого” состояния (solid-state model), (**c**) интегральная модель ЭТЦ митохондрий (integrated model).

Обозначения: M – матрикс; IM – внутренняя мембрана; IMS – межмембранное пространство; complex I – комплекс I; complex II – комплекс II; complex III – комплекс III; complex IV – комплекс IV; complex V – комплекс V; cytochrome c – цитохром *c*.

Согласно последней модели в дыхательной цепи митохондрий присутствуют как отдельные комплексы, так и ассоциации этих комплексов (Welchen et al., 2011; Lenaz, Genova, 2012). По современным данным их стехиометрия может быть различной и представлена комбинацией либо 2-х комплексов, например I и III или III и IV ($I+III_2$, I_2+III_2, III_2+IV_{1-2}), либо различными соотношениями 3-х комплексов – I, III и IV ($I+III_2+IV_{1-4}$), так называемыми респирасомами, и даже целыми дыхательными участками – мегакомплексами, представляющими ассоциации суперкомплексов.

Основываясь на имеющихся данных, можно выделить следующие основные суперкомплексы митохондриальной дыхательной цепи: $I+III_2$, III_2+IV_{1-4}, $I+III_2+IV_{1-4}$ и V_2. Однако состав и содержание суперкомплексов в разных организмах отличается (приложение А). Так, например, большое количество суперкомплексов $I+III_2$ характерно для растений, суперкомплекс III_2+IV_{1-4} является мажорным у грибов, а в митохондриях млекопитающих ЭТЦ представлена в основном респирасомами $I+III_2+IV_{1-4}$ (Chaban et al., 2014).

1.2.1. Суперкомплекс $I+III_2$.

В разных организмах комплекс I формирует стабильные ассоциации с димером комплекса III массой 1500 кДа и состоит только из комплекса I и комплекса III, не включая дополнительных белков (Dudkina et al., 2005a; Welcen et al., 2011; Chaban et al., 2014) (рис. 2). У растений впервые он был изучен на арабидопсисе (Dudkina et al., 2005a). Суперкомплекс $I+III_2$ у растений является более стабильным и распространенным, чем у животных и грибов. Возможно, большая стабильность объясняется немного более длинной мембранной “рукой” растительного комплекса I (~230 Å) по сравнению с таковой у животных и грибов (~190Å) (Dudkina et al., 2006). Мембранный домен комплекса I слегка изгибается вокруг димера комплекса III в месте взаимодействия (Dudkina et al., 2005a). Периферическая “рука” комплекса I и коровая часть комплекса III выступают в митохондриальный матрикс, но физически не взаимодействуют.

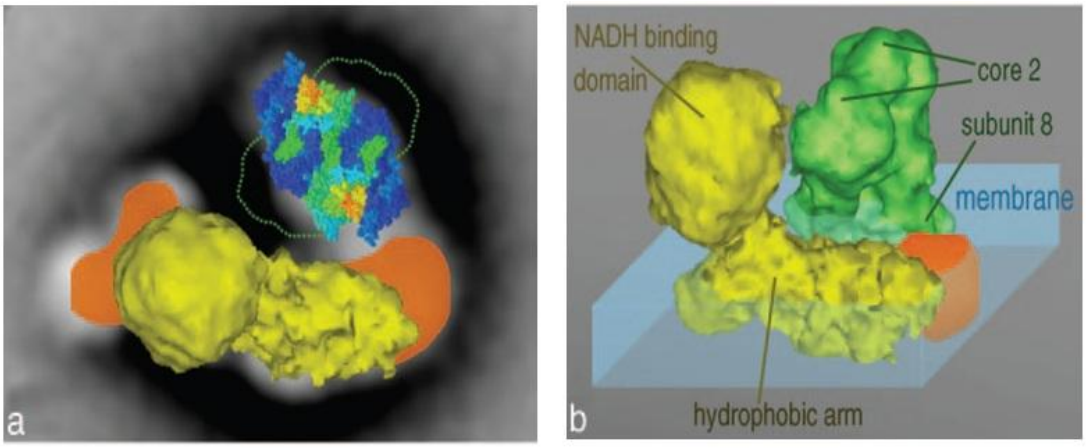


Рис. 2. Модель структуры суперкомплекса I+III_2, полученная на основании данных рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии (Dudkina et al., 2005a)

(**a)** Суперкомплекс I+III_2 арабидопсиса. Комплекс I показан желтым цветом, комплекс III_2 – зеленым, оранжевым показаны дополнительные субъединицы комплекса I, зеленым пунктиром обозначена гидрофильная часть комплекса III_2. (**b)** Общий вид сборки суперкомплекса I+III_2 во внутренней мембране митохондрий (голубой цвет).

Обозначения: NADH binding domain – НАДН-связывающий домен комплекса I; core 2 – субъединица core 2 комплекса III; subunit 8 – субъединица 8 комплекса III; membrane – внутренняя митохондриальная мембрана; hydrophobic arm – гидрофобное плечо комплекса I.

Убихинол-связывающий карман комплекса III и предполагаемое расположение убихинон-связывающего сайта комплекса I находятся в непосредственной близости друг от друга.

Предполагается, что объединение комплексов I и III приводит к более высокой НАДН: цитохром *c* оксидо-редуктазной активности, по сравнению с их свободными формами, а близкое расположение сайтов связывания UQ обоих ферментов может защищать митохондрии от опасных инермедиатов реакций (Lenaz, Genova, 2012).

Показано, что от 50 до 90% всего комплекса I у растений в зависимости от вида входит в состав суперкомплексов, у млекопитающих около 90 % (Eubel et al., 2003). Помимо описанного суперкомплекса в растительных митохондриях встречается также суперкомплекс I_2+III_2 (Chien et al., 2011).

1.2.2. Суперкомплекс III_2+$IV_{1–2}$

В митохондриях дрожжей, в которых, как известно, отсутствует комплекс I, при помощи анализа потока электронов (flux control analysis) и ингибиторного анализа было установлено, что дыхательная цепь работает как единая функциональная единица (Boumans et al., 1998). Schagger и Pfeiffer (Schagger, Pfeiffer, 2000) показали, что в дрожжах присутствуют две формы этого суперкомплекса – III_2+IV и III_2+IV_2. На основании данных крио-электронной микроскопии Mileykovskaya с соавторами (Mileykovskaya et al., 2012) создали псевдоатомную модель дрожжевого суперкомплекса III_2+IV_2 (рис. 3). Авторы показали, что этот суперкомплекс имеет очень симметричную форму благодаря тому, что комплекс III_2 находится посередине, а два мономера комплекса IV – строго по бокам.

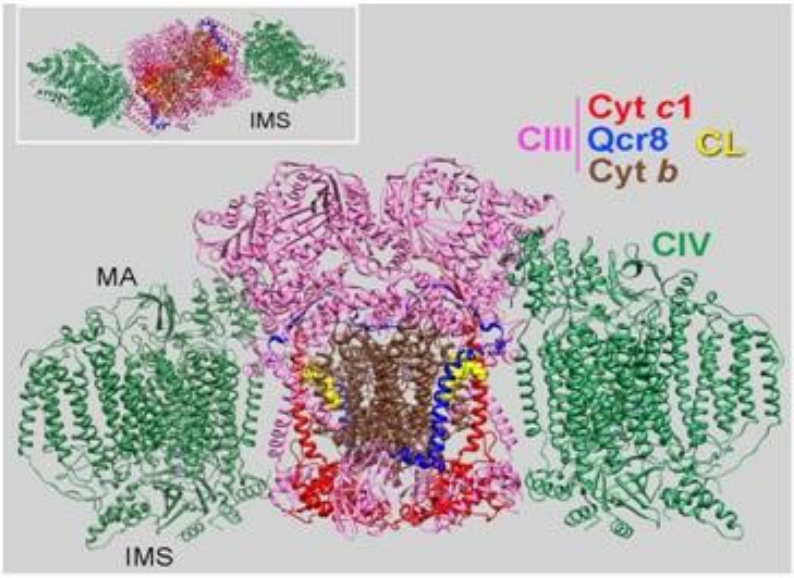


Рис. 3. Псевдоатомная модель суперкомплекса III_2+IV_2 дрожжей (Mileykovskaya, Dowhan, 2014)

Обозначения: MA – матрикс; IMS – межмембранное пространство; комплекс III (CIII) показан розовым цветом, комплекс IV (CIV) – зеленым, цитохром *c*1 (Cyt *c*1) – красным, кардиолипин (CL) – желтым, цитохром *b* (Cyt *b*) – коричневым и субъединица Qcr8 (Qcr8) обозначена синим цветом.

На растениях картофеля (Eubel et al., 2004), шпината (Krause et al., 2004) и спаржи (Dudkina et al., 2006a) было показано, что комплекс III_2 может ассоциировать с 1–4 цитохром *c* окидазами. Молекулярная масса этого

суперкомплекса около 700–850 кДа (Heinemeyer et al., 2007). Самое высокое содержание этого комплекса отмечено у дрожжей (Schagger, Pfeiffer, 2000), в меньшем количестве он содержится у млекопитающих (Schagger, Pfeiffer, 2000) и еще меньше у растений. Взаимодействие комплекса III и комплекса IV зависит от наличия кардиолипина во внутренней митохондриальной мембране (Zhang et al., 2002; Pfeiffer et al., 2003; Mileykovskaya, Dowhan., 2014). При изучении данного комплекса была найдена субъединица Cox7a2l, которая отсутствовала в индивидуальных комплексах. Lapuente-Brun с соавторами (2013) показали, что субъединица Cox7a2l необходима при сборке суперкомплекса. Они обнаружили, что в иммортализированных фибробластах мыши с укороченной аминокислотной последовательностью, кодирующей данный белок, отсутствуют суперкомплексы III_2+IV (Lapuente-Brun et al., 2013).

Данный суперкомплекс может объединяться с комплексом I, образуя так называемую респирасому, которая может автономно выполнять перенос электронов в присутствии убихинона и цитохрома *c*.

1.2.3. Суперкомплекс I+III_2+IV_{1-4}

Суперкомплекс I+III_2+IV_{1-4} – это самая крупная форма объединения компонентов OXPHOS с массой 1500–2700 кДа. Зачастую этот суперкомплекс называют респирасомой, так как он способен автономно выполнять перенос электронов в присутствии убихинона и цитохрома *c*. При помощи метода криоэлектронной томографии и криоэлектронной микроскопии были получены проекционные карты расположения суперкомплекса I+III_2+IV в плоскости мембраны (Dudkina et al., 2011) (рис. 4). Они показывают, что расположение комплексов I и III_2 в респирасоме аналогичны их позициям в суперкомплексе I+III_2, т.е. димерный комплекс III латерально связан с мембранной “рукой” комплекса I, который огибает комплекс III в месте контакта. Комплекс IV прикреплен к краю мембранной “руки” комплекса I, но в то же время латерально взаимодействует с димером комплекса III (Dudkina et al., 2008).

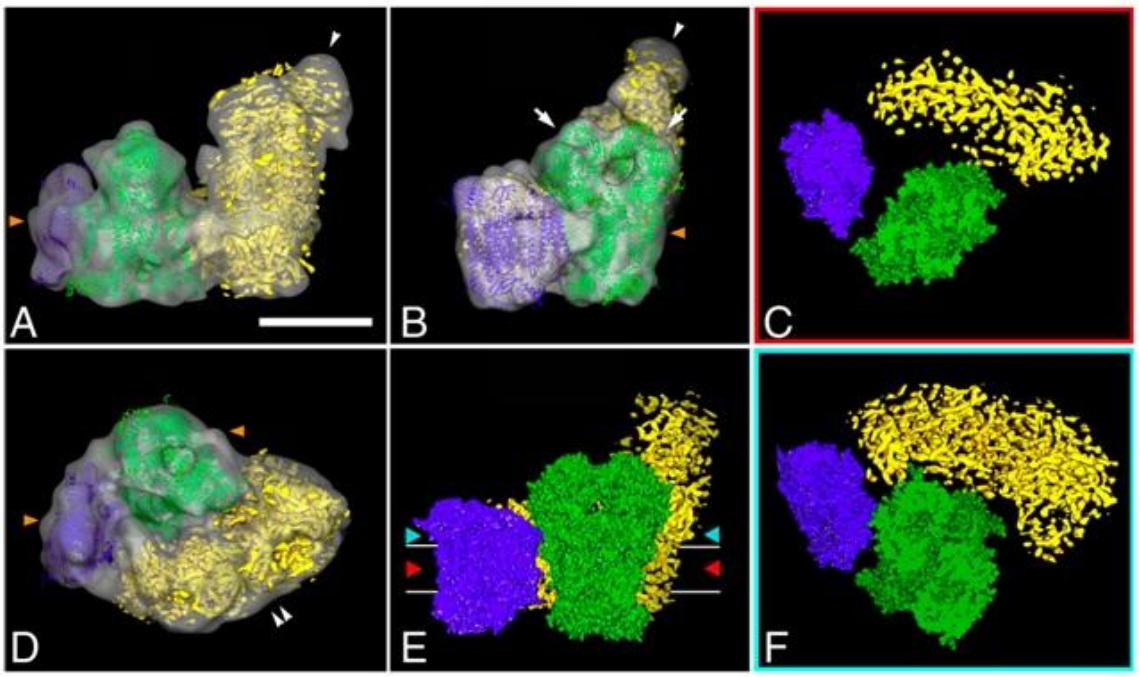


Рис. 4. 3D реконструкция респирасомы I+III_2+IV митохондрий сердца быка, полученная с помощью криоэлектронной микроскопии (Dudkina et al., 2011)

A – вид сбоку, белый треугольник указывает на флавопротеин; **B** – вид сбоку от мембраны, стрелки указывают на коровые I-ую и II-ую субъединицы комплекса III_2, белый треугольник указывает на флавопротеин; **C** – пространственная модель (space-filling model) респирасомы на уровне мембраны, демонстрирующая промежутки между комплексами в составе суперкомплекса; **D** – вид сверху со стороны межмембранного пространства, двойные белые стрелки указывают на изгиб комплекса I в мембране; **E** – пространственная модель респирасомы в мембране, красные и голубые треугольники указывают на расположение комплексов в мембране (C) и матриксе (F) соответственно; **F** – пространственная модель респирасомы со стороны матрикса.

Обозначения: желтым цветом обозначен комплекс I; зеленым – комплекс III_2; синим – комплекс IV; горизонтальные линии на E указывают на границы мембраны; оранжевые стрелки на A, B и D указывают на расположение мицелл детергента. (Шкала бара: 10 нм.)

Модель показывает свободное взаимодействие между тремя комплексами, при этом липиды заполняют пространство между ферментами, склеивая их между собой. Однако из-за ограниченного разрешения другие интерпретации в настоящее время не могут быть полностью исключены. Кроме того, пока неизвестны субъединицы, локализованные на границах между комплексами I, III_2 и IV (Boekema, Braun, 2007).

Данный суперкомплекс считается наиболее характерным для митохондрий млекопитающих. Он также обнаружен в растениях, но отсутствует в дрожжах.

1.2.4. Димерная АТФ-синтаза

Помимо представленных комбинаций дыхательных комплексов в митохондриях присутствуют и другие надмолекулярные структуры, состоящие из целых цепочек димерных АТФ-синтаз, которые располагаются в местах изгиба крист (Bultema et al., 2009). Первые биохимические данные о димерной АТФ-синтазе были получены Arnold с коллегами (Arnold et al., 1998) на дрожжах при помощи BN PAGE. Позже димеры были обнаружены в митохондриях быка (Minauro-Sanmiguel et al., 2005), водорослей *Polytomella sp. и Chlamydomonas* (Dudkina et al., 2005b), *Arabidopsis taliana*, протистов *Tetrahymena thermophila* (Balabaskaran Nina et al., 2010) и некоторых других организмов (Eubel et al., 2003). Примечательно, что эти организмы филогенетически далеки друг от друга, но тем не менее имеют аналогичную форму димерной АТФ-синтазы в митохондриях. Интересно, что димеризация АТФ-синтазы, похоже, является отличительной чертой митохондрий, поскольку пока нет доказательств, подтверждающих наличие димеров в бактериальных мембранах (Schagger et al., 2002; Garcia Montes de Oca et al., 2012). Информация о структуре димерной АТФ-синтазы была получена с помощью методов электронной микроскопии высокого разрешения (single particle EM) и криоэлектронной томографии. Показано, что почти во всех организмах два мономера, т.е. два АТФ-синтазных комплекса, взаимодействуют через мембранную F_O часть (Chaban et al., 2014) (рис 5, А).

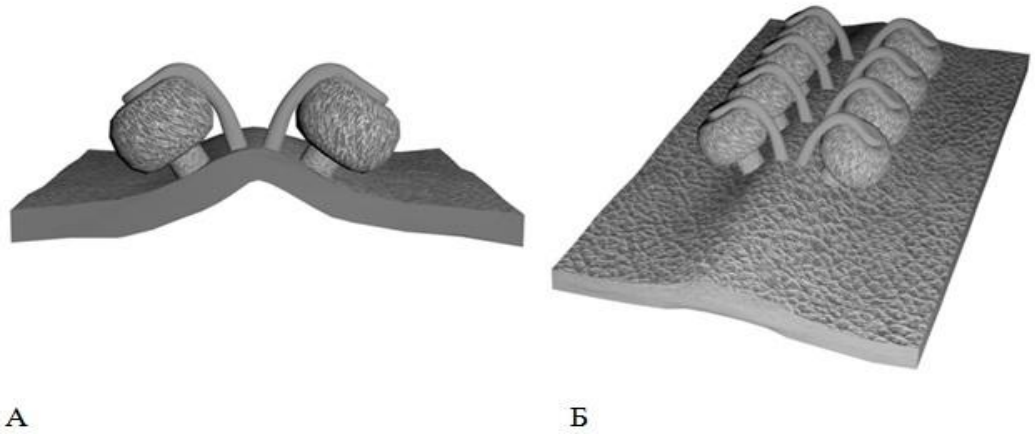


Рис. 5. Модель структуры АТФ-синтазы (Рахманкулова, 2014)
А – димерная структура, **Б** – олигомерная структура.

Специфическим признаком димеров является то, что угол между мономерами составляет 40–90°, как показано в 3D проекциях, на которых представлен вид димеров сбоку. Однако у протистов *Tetrahymena thermophila* нет никакого изгиба, как показывают данные, полученные с помощью электронной микроскопии (Chaban et al., 2014). Субъединичный состав димерной АТФ-синтазы активно изучался, и был проведен поиск белков, вовлеченных во взаимодействие мономеров димерной АТФ-синтазы у разных организмов. Хотя коровая часть АТФ-синтазы у изученных организмов консервативна, их димерные АТФ-синтазы имеют разные дополнительные димерспецифичные субъединицы, которые отличаются между видами, но тем не менее сохраняют соединение мономеров под углом в димерах и олигомерах. Dudkina с коллегами (Dudkina et al., 2005b, 2010) на водоросли *Polytomella sp.* показали, что димерная АТФ-синтаза является строительным блоком для олигомерных рядов этого фермента в трубчатых кристах митохондрий. Предполагается, что олигомеризация АТФ-синтазы в митохондриях способствует формированию сгиба крист, что создает большую поверхность для размещения комплексов и суперкомплексов дыхательной цепи.

Кроме того, расположение олигомерных цепей АТФ-синтаз на изгибах крист может способствовать усилению локального протонного градиента, необходимого для синтеза АТФ (Strauss et al., 2008). В подтверждение участия в формировании крист Giroud с коллегами (Giroud et al., 2002) и Paumard с соавт. (Paumard et al., 2002) показали, что в мутантах дрожжей, лишенных димер-специфичных субъединиц e и g, отсутствовали димеры АТФ-синтаз, и внутренняя мембрана митохондрий имела ненормальную ультраструктуру. Органеллы мутантов приобретали необычную форму луковицы (Giroud et al., 2002; Paumard et al., 2002) или баллона (Davies et al., 2012). Эти данные подтверждают, что димеризация и олигомеризация АТФ-синтазы важна для формирования крист митохондрий, а также необходима для оптимизации работы органелл.

1.3. СТАБИЛИЗАЦИЯ СУПЕРКОМПЛЕКСОВ СИСТЕМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Респирасомы в различных организмах стабильны. Об этом можно судить по тому, что они могут быть выделены как целая функционирующая единица без значительных повреждений. В связи с этим интерес исследователей был направлен на поиск факторов, обеспечивающих прочную связь компонентов дыхательных суперкомплексов и ответственных за взаимодействие элементов респирасом. Карты суперкомплексов митохондрий дрожжей и быка, полученные методом криоэлектронной микроскопии, четко показали, что комплексы I, III_2 и IV располагаются на некотором расстоянии друг от друга и видно, что плотность материи в пространстве между комплексами более низкая, чем снаружи (Althoff et al., 2011; Dudkina et al., 2011; Mileykovskaya et al., 2012). На основе этих данных было предположено, что пространство вероятнее всего заполнено липидами. Одним из таких липидов является кардиолипин, обнаруженный исключительно во внутренней митохондриальной мембране (Mileykovskaya, Dowhan, 2014). Он представляет собой анионный глицерофосфолипид, в котором две молекулы фосфатидной кислоты связаны с одной молекулой глицерина.

Рядом исследователей (Pfefer et al., 2003; Suga et al., 2004; Pineau et al., 2013) показано, что кардиолипин вовлечен в специфичные белок-белковые и белок-липидные взаимодействия, которые необходимы для поддержания функциональной активности митохондрий. В ходе исследований было обнаружено, что его дефицит сопровождался падением мембранного потенциала, снижением синтеза АТФ и в целом митохондриальной функции (Gohil et al., 2004). Еще в 1974 г. Скулачев (Микельсаар, 1974) предположил возможность участия кардиолипина в соединении компонентов дыхательной цепи. Данное предположение позже получило экспериментальное подтверждение. Так, в ряде работ на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* было показано, что у мутантов, в которых отсутствовал кардиолипин, в отличие от дрожжей дикого типа не

наблюдалось формирования тетрамерного суперкомплекса III_2+IV_2 (Pfeiffer et al., 2003; Zhang et al., 2002, 2005)

В естественных условиях была определенна прямая корреляция между уровнем кардиолипина и содержанием суперкомплексов в дрожжевых митохондриях (Pfeiffer et al., 2003; Zhang et al., 2005). Авторы показали, что кардиолипин требуется для стабилизации как отдельных комплексов III и IV, так и для формирования стабильного суперкомплекса III_2+IV_2. Методом масс-спектрометрического анализа было обнаружено, что дрожжевой суперкомплекс содержит около 50 молекул кардиолипина (Mileykovskaya et al., 2012), а респирасомы митохондрий быка вследствие большого расстояния между комплексами могут вмещать еще большее количество молекул кардиолипина (Althoff et al., 2011).

Sharpley с коллегами (Sharpley et al., 2006) на митохондриях дрожжей и млекопитающих показали, что кардиолипин связывается со многими белками внутренней митохондриальной мембраны, среди которых дыхательные комплексы I, III, IV и V, семейство белков переносчиков (АДФ-АТФ антипортер, фосфатный переносчик, разобщающий белок) и два периферических мембранных белка – цитохром *c* и креатинкиназа. Было также обнаружено, что восемь и две молекулы кардиолипина взаимодействуют с комплексом III и IV соответственно (Strogolova et al., 2012). Suga с коллегами (Suga et al., 2011) на митохондриях быка показали, что кардиолипин ассоциирует с COX3 в комплексе IV и цитохромом *b* в комплексе III дыхательной цепи. Предполагается, что комплексы ассоциируют в суперкомплексы путем взаимодействия через кардиолипин-связывающие сайты. Вероятно, изменения в пространственном расположении белков могут происходить в результате выхода кардиолипина из сайтов связывания.

В исследованиях на митохондриях человека (McKenzie et al., 2006; Schlame, Ren, 2006) была обнаружена корреляция между снижением уровня кардиолипина и разрушением суперкомплексов при таких болезнях, как синдром Барта и лимфоцитоз, что подтверждает важную стабилизирующую роль кардиолипина.

Недавнее исследование показало, что еще один липид оказывает влияние на организацию дыхательной цепи, этот липид – фосфатидилэтаноламин. Bottinger с коллегами (Bottinger et al., 2012) установили, что дефицит фосфатидилэтаноламина не дестабилизирует работу дыхательной цепи, как кардиолипин, а, наоборот, способствует формированию суперкомплексов между цитохромом *bc*1 и цитохром *c* оксидазой, т.е. образованию суперкомплекса $III_2+IV_{1–2}$.

Однако не только липиды оказывают стабилизирующие действие на суперкомплексы. Было показано, что субъединица VIIa COX и белки, не относящиеся к дыхательной цепи, важны для сохранения структуры респирасом (Strogolova et al., 2012; Vukotic et al., 2012; Lapuente-Brun et al., 2013). Субъединица VIIa цитохромоксидазы (Cox7-a2l) была идентифицирована в респирасоме и суперкомплексе III_2+IV в мышиных фибробластах, но не обнаружена в свободных комплексах III или IV (Lapuente-Brun et al., 2013). В отсутствие этой субъединицы комплекс IV не собирается в суперкомплекс, но это не влияет на способность отдельного IV-го комплекса окислять субстрат. Электроны в этом случае передаются через пул свободного цитохрома *c* к пулу отдельно расположенного комплекса IV (Lapuente-Brun et al., 2013). Белок COX7RP, родственный субъединице VIIa цитохром *c* оксидазы, также был идентифицирован как фактор, который способствует сборке супрекомплекса в мышиных митохондриях (Ikeda et al., 2013).

Также в прочном взаимодействии суперкомплексов участвуют и два низкомолекулярных белка Rcf1 (respiratory supercomplex factor 1) и Rcf2 (respiratory supercomplex factor 2) с массами 18 и 25 кДа соответственно, которые ассоциируют с респирасомами дрожжей и необходимы для их стабилизации (Strogolova et al., 2012; Vukotic et al., 2012). Так, было показано, что в дрожжевых мутантах *rcf1*Δ, не синтезирующих Rcf1, снижались содержание суперкомплекса III_2+IV_2 и энзиматическая активность монокомплекса IV без существенного уменьшения его количества (Chen et al., 2012). Несмотря на то, что в мутантах

*rcf2*Δ не было отмечено существенного изменения в содержании суперкомплексов, в двойных мутантах *rcf1*Δ*rcf2*Δ наблюдалось очень сильное уменьшение содержания суперкомплексов и активности цитохромоксидазы. Показано, что субъединицы Cox12 и Cox13 дестабилизируются в мутантах *rcf1*Δ , и эта дестабилизация усиливается в двойных мутантах *rcf1*Δ*rcf2*Δ (Strogolova et al., 2012; Vukotic et al., 2012). Предполагается, что связь этих субъединиц с комплексом IV зависит от Rcf1, и их диссоциация, вероятно, объясняет сниженную активность комплекса IV в мутантах. Поскольку Cox12 локализуется в районе сайта связывания цитохрома *c* (LaMarch et al., 1992), то ухудшение активности фермента в мутантных митохондриях может быть связано с ухудшением переноса электронов цитохромом *c*.

Кроме того, обнаружено, что Rcf1 взаимодействует с субъединицей Cox3 дрожжевого комплекса IV и требуется для правильной сборки и функционирования суперкомплекса (Chen et al., 2012; Strogolova et al., 2012). Имеются также данные, указывающие на тесную связь Rcf1 с Aac2 (АДФ/АТФ переносчик) (Strogolova et al., 2012). Выявленный в дрожжах Rcf2, похоже, специфичен для них, тогда как Rcf1 имеет гомологию с белками человека RCF1a и RCF1b (Vukotic et al., 2012). Rcf1 и Rcf2 ассоциируют с комплексом IV, однако есть основания полагать, что в дрожжевых митохондриях существуют две популяции суперкомплексов: одни содержат Rcf1, а другие – Rcf2 (Strogolova et al., 2012).

Современные исследования связи между суперкомплексами и ультраструктурой митохондрий мышей предполагают, что морфология крист также может стабилизировать суперкомплексы (Cogliati et al., 2013).

Таким образом, на сегодняшний день установлено, что в поддержании суперкомплексной структуры дыхательной цепи участвуют: фосфолипид кардиолипин, “склеивающий” комплексы между собой; белковые факторы Rcf1 и Rcf2, а также сами субъединицы дыхательных ферментов, такие как Cox7-a2l, присутствие которых необходимо для правильной сборки суперкомплексов.

1.4. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ СУПЕРКОМПЛЕКСОВ СИТЕМЫ OXPHOS

Совершенно очевидно, что ассоциация дыхательных комплексов в суперкомплексы и мегакомплексы открывает новые свойства дыхательной цепи митохондрий по сравнению с отдельно функционирующими монокомплексами. Однако причина существования этих ассоциаций до конца не выяснена.

Логичным предположением, вытекающим из представления о надмолекулярной организации дыхательной цепи, было то, что такая структура обеспечивает более эффективный перенос электронов. Это предположение в дальнейшем было подтверждено экспериментальными данными (Chaban et al., 2014). Показано, что комплекс III, объединяясь с комплексом I, располагаются таким образом, что их сайты связывания убихинона находятся на расстоянии, равном 13 нм (Althoff et al., 2011; Dudkina et al., 2011). На другом отрезке пути переноса электронов, между комплексами III и IV, важную роль играет челночное перемещение цитохрома *c*. По последним данным, расстояние, которое цитохром *c* проходит между сайтами комплексов III_2 и IV в респирасоме митохондрий быка, составляет примерно 10 нм (Althoff et al., 2011; Dudkina et al., 2011) и менее 6 нм в суперкомплексе III_2+IV у дрожжей (Mileykovskaya et al., 2012). Близкое расположение этих сайтов может способствовать увеличению скорости переноса электронов и уменьшению возможности потери электронов при переносе с образованием повреждающих кислородных радикалов (Genova, Lenaz, 2014).

Недавно было обнаружено, что ассоциация суперкомплексов может обеспечить и другие дополнительные кинетические преимущества. Исследование Schafer с коллегами (Schafer et al., 2007) продемонстрировало, что в суперкомплексах, включающих COX ($I+III_2+IV_{1-4}$), активность комплексов I и III_2 была выше, чем в суперкомплексах, лишенных терминальной оксидазы ($I+III_2$). Они предположили, что наличие комплекса IV изменяет конформацию взаимодействующих с ним комплексов, повышая их каталитическую активность.

Однако значение слияния компонентов дыхательной цепи в функциональные единицы не сводится только к кинетическим преимуществам (Chaban et al., 2014). Объединяясь в суперкомплекс, отдельные его составляющие становятся более стабильными. Так, Hildebrandt (Hildebrandt et al., 2011) обнаружил, что токсический и ингибирующий эффект сероводорода на дыхание митохондрий крыс значительно снижался, если анализировалась активность суперкомплексов, а не отдельно изолированной цитохромоксидазы. Более того, он показал, что дегидроаскорбиновая кислота снижает токсичность сероводорода только в случае надмолекулярной сборки дыхательной цепи, при диссоциации суперкомплексов протекторный эффект полностью отменялся. Эти данные подтверждают важную роль супрамолекулярной ассоциации в защите и сохранении ее отдельных компонентов.

Было также показано, что в митохондриях клеток человека комплекс I необходим для полной сборки комплекса III (Ugalde et al., 2004; Moreno-Lastres et al., 2012), а в органеллах клеток человека и мышей мутации в субъединицах комплексов III или IV дестабилизируют комплекс I (Acin-Perez et al., 2004; Diaz et al., 2006). Сборка дыхательных комплексов I, III и IV в респирасому $I+III_4+IV_4$ в цитоплазматической мембране *Paracoccus denitrificans*, который считается возможным предшественником митохондрий эукариот, стабилизирует комплекс I (Stroh et al., 2004). Сам по себе комплекс I достаточно стабилен, но предполагается, что его дестабилизация может быть вызвана его чувствительностью к увеличению АФК, которое происходит при распаде суперкомплексов (Genova, Lenaz, 2014).

Недавно Maranzana с соавторами (Maranzana et al., 2013) детектировали повышение образования АФК комплексом I в двух экспериментальных системах – митохондриях сердца быка и воссозданной липосоме, содержащей суперкомплекс $I+III_2$. В этих системах надмолекулярная организация дыхательных комплексов была разрушена либо додецилмальтозидом, либо повышением содержания фосфолипидов (по отношению к белку) в липосоме.

Этот эксперимент показал, что сборка комплексов в суперкомплексы приводит к снижению продукции АФК.

Образование суперкомплексов влияет также и на ультраструктуру митохондрий (Рахманкулова, 2014). Особую роль в формировании структуры внутренней митохондриальной мембраны играют димерные АТФ-синтазы. Объединяясь, мономеры данного фермента вызывают локальный изгиб и образование мембранных крист. Олигомеры АТФ-синтаз (длинные “цепи” димеров) не только формируют складчатую структуру внутренней митохондриальной мембраны, увеличивая поверхность для размещения суперкомплексов, но и могут выступать в качестве протонных ловушек и тем самым генерировать увеличение локального протонного градиента, который требуется для синтеза АТФ.

В целом надмолекулярная организация ЭТЦ имеет динамичную природу и позволяет регулировать метаболические пути, такие, как цикл Кребса, синтез аскорбата и аминокислот. Современное изучение потока электронов в ЭТЦ показало, что комплекс IV может принимать электроны от НАДН через суперкомплексы I+III_2/I+III_2+IV; от комплекса II как через отдельный комплекс III_2, так и через суперкомплекс III_2+IV (Lapuente-Brun et al., 2013). Возможно, подобная организация дыхательной цепи способствует оптимизации одновременного окисления нескольких субстратов (Lapuente-Brun et al., 2013). Известно, что если в качестве главного дыхательного субстрата используется глюкоза, то электроны поступают от НАДН, а если же главным источником субстрата является окисление жирных кислот, то электроны поступают от $ФАДН_2$. Динамичная надмолекулярная организация ЭТЦ может влиять на эффективность окисления доступных субстратов и позволяет суперкомплексам претерпевать некоторые изменения в ответ на нужды клетки в АТФ на данный момент (Ramirez-Aguilar et al., 2011). Наконец, в растениях организация дыхательных комплексов в суперкомплексы может влиять на направление потока электронов по различным альтернативным путям митохондриальной цепи

переноса электронов, таким как НАД(Ф)Н-дегидрогеназы II типа или альтернативная оксидаза (Eubel et al., 2004). Подобное перераспределение потоков может играть важную роль в тонкой настройке энергетического метаболизма и в образовании АТФ, что особенно важно при изменении условий окружающей среды (Gupta et al., 2009; Ramirez-Aguilar et al., 2011).

1.5. ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА ОРГАНИЗАЦИЮ И АКТИВНОСТЬ ЭТЦ РАСТЕНИЙ И ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ СУПЕРКОМПЛЕКСОВ ПРИ СТРЕССЕ

В настоящее время есть работы, посвященные изучению влияния стрессов на протеом митохондрий растений (Taylor et al., 2005; Rurek et al., 2015), где авторы отмечают небольшие изменения в количестве комплексов дыхательной цепи. Кроме того, предположив, что разные по оптимальным темпратурам прорастания виды могут отличаться по составу суперкомплексов, Chien с коллегами (Chien et al., 2011) провели сравнение двух видов бамбука, прорастающего зимой (*Phyllostachys edulis*) и прорастающего летом (*Bambusa oldhamii*). Результаты исследования выявили ряд особенностей организации дыхательной цепи исследуемых растений. У обоих видов бамбука более 90% комплекса I входят в состав суперкомплексов, причем зимний вид содержит большее количество суперкомплексов с комплексом I в составе. Также отмечено, что около 50% комплекса III и V находятся в составе суперкомплексов. В зимнем виде суперкомплексов, имеющих в составе комплекс V, больше чем в летнем. Установлено, что *Phyllostachys edulis* содержит большее количество альтернативных оксидаз и PUMP (англ. “Plant Uncoupling Mitochondrial Protein”), а также наблюдается, что у данного вида выше активность калиевого канала ($PmitoK_{ATP}$). Однако активность внутренних/внешних НАДН-дегидрогеназ и супероксиддисмутазы (СОД) ниже. Авторы предполагают, что зимний вид адаптируется к холоду за счет большего количества функциональных

митохондриальных суперкомплексов и большей энергорассеивающей активности AOX, PUMP, $PmitoK_{ATP}$ по сравнению с летним видом.

Более подробное изучение преобразований суперкомплексов под действием неблагоприятных факторов пока только начинается и есть лишь единичные работы по данной теме.

Ramirez-Aguilar с соавторами (Ramirez-Aguilar et al., 2011) показали, что в условиях гипоксии и низкого значения pH в митохондриях клубней картофеля наблюдается снижение активности комплекса I в составе суперкомплекса, но увеличивается активность отдельного мономера комплекса I. Вместе с этим увеличивается активность комплекса IV в суперкомплексе III_2+IV. Эти изменения дыхательных комплексов возвращались к исходным показателям после восстановления нормальных условий. Авторы предполагают, что увеличение активности суперкомплекса III_2+IV может говорить о диссоциации комплекса I от большого суперкомплекса I+III_2+IV. Такая перестройка может являться частью регуляторного механизма вовлечения альтернативных НАДН-дегидрогеназ, которые, как известно, активируются низкими значениями pH, тогда как комплекс I ингибируется в таких условиях.

В работе по влиянию аноксии (Millar et al., 2004b) авторы сравнивали функции и протеом митохондрий риса, выращенного в условиях аноксии с последующей адаптацией к нормальным условиям, и митохондрий, выделенных из проростков риса, выращенных в условиях постоянной аноксии. С помощью BNE/SDS- PAGE обнаружено очень низкое количество комплекса III и комплекса IV в образцах, выращенных при аноксии, и значительное увеличение в количестве этих комплексов после адаптации к кислородным условиям. Суперкомплекс III_2+IV в бескислородных условиях не образуется, однако адаптация к аэрации приводит к формированию этого суперкомплекса. Поскольку в условиях аноксии гемсодержащие комплексы III_2 и IV формируются в малом количестве и не ассоциируют друг с другом, перенос электронов может идти по альтернативному

пути. Тогда электроны от комплекса I могут поступать на альтернативные оксидазы и затем на кислород.

Исследование влияния внешних неблагоприятных факторов на количество функционально активных суперкомплексов показывает, что при стрессе количество суперкомплексов и респирасом существенно снижалось, например, в митохондриях клубней картофеля в условиях гипоксии и низком значении pH (Ramirez-Aguilar et al., 2011). Но в то же время при адаптации проростков риса к нормальным условиям после 6-дневной аноксии (Millar et al., 2004b) количество суперкомплексов возрастало. Таким образом, респирасомы – это функциональные единицы (Acin-Perez et al., 2008) эффективного, экономного дыхания, присущие растениям в нормальных условиях обитания, количество которых при неблагоприятных условиях сильно снижается, а после адаптации возвращается на прежний уровень.

Известно, что в митохондриях предотвратить образование АФК, основными источниками которых являются дыхательные комплексы I и III, позволяет многоуровневая система антиоксидантной защиты (Moller et al., 2001). Рахманкулова в обзоре, посвященном дыхательным суперкомплексам митохондрий растений (Рахманкулова, 2014) высказывает предположение о том, что именно суперкомплексы являются самым первым уровнем антиоксидантной защиты при стрессе, после чего включаются альтернативные дыхательные пути, разобщающие механизмы и другие антиоксидантные системы.

Показано, что одной из важнейших функций, которые выполняют респирасомы, является ограничение образования АФК (Winge, 2012) за счет стабилизации структуры суперкомплексов с помощью белка Rcf1 и кардиолипина, что обеспечивает более эффективный перенос электронов в суперкомплексах $I+III_2$ (Maranzana et al., 2013) и III_2+IV_2 (Chen et al., 2012). Кроме того, установлено, что суперкомплексы могут влиять на направление потока электронов по различным альтернативным путям. Вместе с тем продолжительное действие неблагоприятных факторов индуцирует диссоциацию респирасом, что

возможно способствует запуску механизма активации альтернативных дегидрогеназ (Ramirez-Aguilar et al., 2011), которые крайне важны в условиях стресса.

Таким образом, можно сделать предположение о том, что динамичные по своей структуре суперкомплексы помогают растению адаптироваться к неблагоприятным условиям среды. Суперкомплексная организация ЭТЦ стабилизирует отдельные ее компоненты, предовращая образование опасных интермедиатов в митохондриях при незначительных нарушениях метаболизма, а при более длительных стрессовых воздействиях ассоциации комплексов распадаются, предположительно активируя некоторые альтернативные ферменты дыхания, такие как НАД(Ф)Н-дегидрогеназы II-го типа.

1.6. ВЛИЯНИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ

Низкая температура индуцирует в клеточных структурах ряд изменений, включающих степень ненасыщенности жирных кислот, состав глицеролипидов (Lynch, Thompson, 1982), накопление сахаров (Туманов, 1979; Savitch et al., 1997; Strand et al., 1997; Vagujfalvi et al., 1999), синтез и увеличение содержания COR-белков (дегидринов, антифризных белков, аквапоринов, ферментов биосинтеза осмопротекторов и липидов, регуляторных белков и др.), накопление других защитных соединений, таких как свободные стерины, аминокислоты (аланин, глутаминовая кислота, глицин, пролин и серин), полиамины и бетаины (Majlath et al., 2012). Цель таких метаболических перестроек заключается либо в адаптации растений к новым условиям окружающей среды и повышении устойчивости к низкотемпературному воздействию, либо в пережидании неблагоприятного момента.

Все изменения многочисленных биохимических, физиологических и метаболических функций обеспечиваются соответствующим энергетическим обменом, который регулируется такими жизненно важными органеллами клетки,

как митохондрии. Известно, что из всех клеточных компартментов митохондрии одними из первых реагируют на неблагоприятные воздействия, опережая и определяя таким образом ответы остальных клеточных структур (Войников, 2011). Гипотермия приводит к существенным изменениям структуры и функциональной активности этих органелл.

Так, по данным электронно-микроскопических исследований отмечаются быстрые изменения в ультраструктуре митохондрий проростков морозоустойчивых озимых злаков после охлаждения растений при температурах от 0 до минус 4 °С, причем степень и обратимость этих изменений зависит от устойчивости вида (Khristolyubova et al., 1974). При однодневной выдержке растений высокоморозоустойчивого пырея сизого *Agropyron glaucum* при минус 4 °С не происходило изменений в ультраструктуре митохондрий, в то время как митохондрии менее морозоустойчивой (по сравнению с пыреем) озимой пшеницы, были разрушены, а в оставшихся органеллах не наблюдалось крист. Морфометрический анализ показал двукратное увеличение объема этих митохондрий и снижение поверхности внутренней мембраны и крист в 1,5 раза. Другими исследователями (Kwiatkowska, 1970) после охлаждения проростков озимой пшеницы было отмечено появление органелл в форме удлиненных палочек. Кратковременная обработка при минус 4 °С приводила к обратимому набуханию митохондрий. Экстенсивное набухание митохондрий, сопровождающееся некоторым набуханием крист в течение повторного холодового воздействия, было отмечено в суспензии клеток маша *Vigna radiata* и клетках корневых кончиков огурца *Cucumis sativus* (Ishikawa, 1996; Lee et al., 2002). В клетках мезофилла арабидопсиса после длительного охлаждения в течение 72 часов были обнаружены аберрантные митохондрии шарообразной формы (Rurek, 2014).

Изменения ультраструктуры митохондрий тесно связаны с изменением состава мембран и, прежде всего, с увеличением числа двойных связей в жирнокислотных остатках липидов, что увеличивает пластичность мембран,

снижает температуру фазового перехода и позволяет им нормально функционировать в области пониженных температур (Хочачка, Сомеро, 1988; Верещагин, 2007; Трунова, 2007). Ультраструктурные перестройки в период гипотермии сопровождаются значительными изменениями в дыхании митохондрий. Как показано в работе Хохловой (Хохлова и др., 1993), при холодовом закаливании растений озимой пшеницы происходило снижение температуры фазовых переходов мембранных липидов, сокращение митохондрий, снижение окислительной активности этих органелл и повышение сопряженности окисления и фосфорилирования.

Исследования Войникова с коллегами (Побежимова, 1997; Грабельных, 2005; Войников, 2011) показали, что кратковременное охлаждение растений вызывает сильные изменения энергетической активности митохондрий. У органелл, выделенных из контрастных по морозоустойчивости растений, наблюдаются разнонаправленные изменения метаболических состояний. В частности, в ответ на одночасовое охлаждение растительного материала в митохондриях неустойчивых к морозу форм возрастают сопряженность процессов окисления и фосфорилирования и энергетическая эффективность дыхания, в то время как у митохондрий морозоустойчивых растений наблюдается ослабление степени сопряженности. Существенно то, что ослабление энергетического контроля дыхания после кратковременного охлаждения тканей морозоустойчивых растений приводит не к снижению, а к заметному увеличению скорости фосфорилирования за счет увеличения дыхания в митохондриях (Войников, 1978). По-видимому, переход в низкоэнергетическое состояние представляет собой “аварийный” механизм, который вступает в работу на первых этапах действия повреждающего фактора. Этот механизм позволяет в большей степени обеспечить энергией многие реакции, необходимые для перестройки метаболизма и протекания репарационных процессов, вызванных неблагоприятным воздействием (Александров, 1975; Христолюбова, 1977).

Повышение продолжительности охлаждения до 3–4 часов приводит к снижению окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий морозоустойчивых злаков (Войников, 2011). При этом митохондрии переходят в другой тип регуляции, основанный на торможении дыхания, а главным фактором, выступающим в роли ограничителя интенсивности работы дыхательной цепи, оказывается оксалоацетатное блокирование сукцинатдегидрогеназы. После его включения работа митохондрий переходит в менее интенсивный, но устойчивый режим.

У митохондрий неустойчивых к морозу злаков переход к низкоэнергетическому состоянию происходит после более длительного действия низкой температуры, либо вовсе не наблюдается. У органелл этих растений не отмечено оксалоацетатного ингибирования дыхания (Войников, 1987).

Изменения в функциональном состоянии митохондрий растений в период гипотермии тесно связаны с работой альтернативных ферментов – АОХ и ротенон-резистентных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, а также разобщающих белков. Альтернативные ферменты являются важной особенностью растительных митохондрий, повышая шансы растения на адаптацию и выживание в стрессовых условиях. Как отмечалось ранее, ротенон-резистентные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы II типа шунтируют первый пункт сопряжения в ЭТЦ митохондрий, а АОХ обходит конечные пункты сопряжения у растений. В условиях гипотермии активность и содержание этих ферментов регулируются отдельно, но также предполагается и их согласованная работа. В поддержку последнего предположения Боровик (Боровик, 2014) обнаружила высокую потенциальную активность АОХ и высокую скорость окисления экзогенных НАДН и НАДФН в митохондриях из этиолированных побегов и листьев озимой пшеницы, что сопровождалось снижением антимицин-А-индуцируемой генерации АФК. Эти данные позволяют предположить, что работа ферментов альтернативного пути, неограниченная доступностью АДФ, направлена на снижение продукции АФК, а также может регулировать углеводный и энергетический балансы клетки.

Большое количество исследований свидетельствует о повышении уровня транскриптов, содержания белка и активности АОХ под действием низких положительных температур и при закаливании у различных растительных объектов (Stewart et al., 1990; Ribas-Carbo et al., 2000; Takumi et al., 2002; Kurimoto et al., 2004; Fiorani et al., 2005; Sugie et al., 2006; Matos et al., 2007; Armstrong et al., 2008; Mizuno et al., 2008; Wang et al., 2011; Li et al., 2013; Shi et al., 2013). Так, например, показано, что активность АОХ в митохондриях, изолированных из клубней картофеля, которые хранились при температуре 5 °С в течение 10 дней, увеличивалась в 10 раз по сравнению с контрольными растениями, выращенными при 25 °С (Borecky, Vercesi, 2005). Также обнаружено накопление транскриптов *AOX1a*, увеличение содержания и активности АОХ в листьях арабидопсиса при холодовой обработке (Fiorani et al., 2005; Elhafez et al., 2006; Armstrong et al., 2008;). В то же время существуют данные об отсутствии положительной корреляции между содержанием АОХ, ее активностью и холодоустойчивостью растений (Stewart et al., 1990; Ribas-Carbo et al., 2000).

В отличие от АОХ данных о функционировании ротенон-резистентных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ в условиях гипотермии гораздо меньше, и порой они носят противоречивый характер. Так, Svensson с коллегами (Svensson et al., 2002) показали, что в листьях картофеля после 6-и дней выдержки растений при 5 °С содержание транскриптов внутренней ротенон-резистентной НАД(Ф)Н-ДГ (NDA1) снижалось до уровня 10%. Это снижение сопровождалось уменьшением содержания и активности этого фермента. В то же время при этой холодовой обработке уровень содержания транскриптов гена, кодирующего внешнюю ротенон-резистентную НАД(Ф)Н-ДГ (NDB1), а также содержание и активность этого фермента не изменялись. Напротив, Armstrong с коллегами (Armstrong et al., 2008) в листьях растений арабидопсиса, выращенных на холоде, наблюдали увеличение уровня транскриптов гена *NDB2*. Роль внешних NDB1 была изучена в прорастающих семенах и в проростках гороха (Stupnikova et al., 2006). Обнаружено, что при температуре среды инкубации 3,5 °С эти ферменты были

способны окислять экзогенный НАДН, в то время как основной цитохромный путь был полностью инактивирован в этих условиях. На основании этих данных предположена важная роль внешних НАД(Ф)Н-ДГ в поддержании энергетического гомеостаза в условиях низкотемпературного стресса.

Переход митохондрий морозоустойчивых растений в низкоэнергетическое состояние при гипотермии обусловлен также действием свободных жирных кислот, которые работают как циклические протонофоры, перенося протоны с внешней стороны внутренней мембраны в матрикс (Войников, 2011). Их содержание при охлаждении возрастает в 2–3 раза, причем рост ненасыщенных жирных кислот более значителен, чем насыщенных (Войников и др., 1985). В качестве разобщителей окислительного фосфорилирования они могут действовать самостоятельно либо совместно со специфическими белками, относящимися к семейству митохондриальных анионных переносчиков, локализованных во внутренней мембране органелл. Эти белки были названы разобщающими белками PUMP (Plant Uncoupling Mitochondrial Protein) и имеют высокую гомологию с белками млекопитающих UCP-1 и UCP-2 (Vercesi et al., 1995; Vercesi, 2001). В активированном состоянии разобщающие белки служат промежуточным звеном возврата протонов в матрикс. В результате протонный потенциал, образуемый дыхательной цепью, рассеивается в виде тепла, и происходит разобщение дыхания и фосфорилирования (Войников, 2011).

Почти все обнаруженные в растениях UCP-подобные белки, в частности StUCP (Laloi et al., 1997) и PUMP в клубнях картофеля (Nantes et al., 1999), AtPUMP у арабидопсиса (Maia et al., 1998), а также SfUCPa и SfUCPb в початках симплокарпуса *Symplocarpus foetidus* (Ito, 1999), индуцируются холодом. В связи с этим предполагается участие этих белков в защите растений от низкотемпературного стресса при помощи термогенеза (Laloi et al., 1997; Maia et al., 1998; Ito, 1999).

У злаков обнаружен также белок холодового шока с молекулярной массой 310 кДа (БХШ 310), который вызывает разобщение окисления и

фосфорилирования в митохондриях при низкотемпературном стрессе, но в отличие от UCP-подобных белков его функционирование не требует наличия свободных жирных кислот (Колесниченко и др., 1996; Войников и др., 2001 а, б). Молекулярная масса этого нативного белка составляет 310 кДа. Показано, что этот белок состоит из двух типов субъединиц с молекулярными массами 56 и 66 кДа (Колесниченко и др., 1996). Содержание данного белка увеличивается в клетках холодоустойчивых озимых злаков под действием низкотемпературного стресса и при водном дефиците (Колесниченко и др., 1996, 1997, 1999).

Помимо описанных выше белков в митохондриях растений было обнаружено также индуцируемое холодом накопление таких стрессовых белков, как дегидрины (LEA D11 или группа 2) (Hughes, Galau, 1989; Dure, 1993). Дегидрины характеризуются наличием высококонсервативных Y, S и K-сегментов. Lys-обогащенная аминокислотная последовательность, состоящая из 15 аминокислот EKKGIMDKIKEKLPG, обозначается как K-сегмент, который присутствует практически во всех дегидринах (Close, 1996). Было предположено, что K-сегмент образует амфипатическую α-спираль, которая, по-видимому, участвует в гидрофобном взаимодействии с частично денатурированными белками и мембранами (Dure, 1993). Благодаря высокому содержанию гидрофильных и заряженных полярных аминокислот дегидрины стабильны при кипячении. Предполагаемая функция этих белков заключается в изменении термодинамического взаимодействия воды и макромолекул в период обезвоживания, в результате которого предотвращается локальная дегидратация и денатурация белков. Для некоторых дегидринов предполагается шаперон-подобная, детергентная активность, которая может инициироваться гидрофобным взаимодействием с частично денатурированными белками или мембранами (Close et al., 1989, 1993; Welin et al., 1994).

В результате исследований Боровский с коллегами (Borovskii et al., 2002) обнаружили, что в процессе холодовой адаптации в митохондриях озимой ржи, пшеницы и кукурузы происходит увеличение содержания термостабильных

дегидринов с массами 52 и 63 кДа. В митохондриях этих злаков обнаружены также нетермостабильные дегидриноподобные белки, содержание которых в ходе закаливания менялось в митохондриях морозоустойчивых ржи и пшеницы и оставалось прежним в митохондриях кукурузы. Показано, что накопление белка 63 кДа индуцируется разными видами воздействия – отрицательными температурами, холодовой адаптацией, дегидратацией, АБК-обработками, в то время как белок 52 кДа накапливается только в период закаливания и АБК-обработок (Borovskii et al., 2002; Боровский и др., 2005). Авторы предполагают, что обнаруженные дегидрины могут стабилизировать белки в мембранах и матриксе митохондрий в стрессовых условиях и в период закаливания. Hara с соавторами (Hara et al., 2003) удалось выделить и интродуцировать в растения табака ген цитрусового дегидрина *CuCOR19* (из *Citrus unshiu* Marcov), что увеличило устойчивость растений к низким отрицательным температурам и снизило содержание продуктов ПОЛ. Как показали результаты субклеточного фракционирования, CuCOR19 локализован примущественно в митохондриях и растворимой клеточной фракции, но не обнаружен в ядрах и хлоропластах.

Романенко с коллегами (Романенко и др., 2010) при помощи метода электронной иммуноцитохимии показали, что в митохондриях этиолированных проростков озимой пшеницы, выращенных при 22 °С, дегидрины отсутствовали в матриксе и детектировались вблизи наружной и внутренней мембран, но основная часть этих белков была обнаружена в районе крист. Закаливание растений при 4 °С в течение 10 суток приводило к существенному накоплению дегидринов, которые обнаруживались уже не только в мембранах, но и в межмембранном пространстве и в матриксе. Наибольшее накопление этих белков по-прежнему наблюдалось в районе крист.

В митохондриях растений был отмечен синтез низкомолекулярных БТШ (Guy, 1990) и БТШ60 (Sanyal et al., 1995), а также показана их важная роль в период гипотермии. Предполагается, что эти белки необходимы для поддержания

клеточного гомеостаза и надлежащего биогенеза белка в период низкотемпературной адаптации.

1.7. ВЫВОДЫ ИЗ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ

На сегодняшний день при помощи современных методов электронной микроскопии, одномерного и двумерного голубого нативного электрофорезов в градиентном полиакриламидном геле, масс-спектрометрического анализа установлено, что дыхательная цепь митохондрий животных, грибов, бактерий и растений имеет надмолекулярную организацию.

Согласно современной интегральной объединенной модели в дыхательной цепи митохондрий присутствуют как отдельные комплексы, так и их ассоциации – суперкомплексы. По последним данным, их стехиометрия может быть различной и представлена комбинацией либо 2-х комплексов, например I и III или III и IV ($I+III_2$, I_2+III_2, III_2+IV_{1-2}), либо различными соотношениями 3-х комплексов – I, III и IV ($I+III_2+IV_{1-4}$), так называемыми респирасомами, и даже целыми дыхательными участками – мегакомплексами, состоящими из ассоциаций суперкомплексов. Выделены следующие основные суперкомплексы митохондриальной дыхательной цепи: $I+III_2$, III_2+IV_{1-4}, $I+III_2+IV_{1-4}$ и V_2. Показано, что состав и содержание суперкомплексов в разных организмах отличаются. Так, например, в растениях преобладает суперкомплекс $I+III_2$, ассоциация III_2+IV_{1-4} является мажорной у дрожжей, а в митохондриях млекопитающих ЭТЦ представлена в основном респирасомами $I+III_2+IV_{1-4}$.

Совершенно очевидно, что ассоциация дыхательных комплексов в суперкомплексы и мегакомплексы открывает новые свойства дыхательной цепи митохондрий по сравнению с отдельно функционирующими монокомплексами. Несмотря на то, что причина существования этих ассоциаций до конца не выяснена, на сегодняшний день имеются данные, позволяющие предположить, что:

1) объединение комплексов в единую структуру увеличивает их стабильность внутри суперкомплексов;

2) такая организация способствует более эффективному распределению электронов между реактивными сайтами ферментов в пределах суперкомплексов и препятствует образованию опасных интермедиатов реакций;

3) подобная ассоциация создает условия для эффективной регуляции метаболических путей, таких, например, как цикл Кребса, гликолиз, синтез аскорбата и аминокислот;

4) более высокая организация суперкомплексов в мегакомплексы, по-видимому, важна для морфологии внутренней митохондриальной мембраны и способствует увеличению количества встраивающихся в эту мембрану белков;

5) ассоциация дыхательных комплексов в суперкомплексы определяет направленность потока электронов по основному и альтернативному путям дыхания.

Исследования надмолекулярной организации ЭТЦ митохондрий показали, высокую степень стабильности респирасом в различных организмах, что обеспечивается стабилизирующими факторами белковой и липидной природы. На сегодняшний день удалось обнаружить пока несколько таких факторов. К ним можно отнести белки Rsf1 и Rsf2, АДФ/АТФ транслокатор Aac2, субъединицу VIIa цитохромоксидазы (Cox7-a2l), а также кардиолипин, которые необходимы для прочной и эффективной ассоциации дыхательных комплексов и других мембранных белков.

Несмотря на то, что организация дыхательной цепи митохондрий в различных видах и даже на разных фазах развития растений активно изучается, информация о ее нативном состоянии носит противоречивый характер, т.к. структура суперкомплексов и мегакомплексов исследовалась с помощью различных методов с использованием неионогенных детергентов, как более щадящих, так и более сильных. В связи с этим полная информация о нативной

организации дыхательной цепи многих видов растений, в частности гороха, на данный момент отсутствует.

Кроме того, исследования влияний факторов среды на структуру ЭТЦ пока единичны. Полученные данные указывают на снижение содержания и распад суперкомплексов в условиях гипоксии, низкого pH и аноксии. Показано, что в условиях гипоксии и низкого pH происходит диссоциация комплекса I из состава суперкомплексов с последующим увеличением содержания более мелкого суперкомплекса III_2+IV, но эти изменения носят обратимый характер. Есть также единичные данные, показывающие, что зимостойкие виды характеризуются большим содержанием суперкомплексов по сравнению с незимостойкими.

Проведенный анализ источников литературы позволяет говорить о том, что до настоящего момента исследования по влиянию гипотермии на состав и активность суперкомплексов в растительных митохондриях практически не проводились. Учитывая это, а также слабую изученность организации дыхательной цепи митохондрий гороха, **целью** работы явилось исследование надмолекулярной организации дыхательной цепи митохондрий этиолированных проростков гороха и ее изменений в условиях гипотермии различной интенсивности.

2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлись этиолированные проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта “Аксайский Усатый 55”.

2.2. УСЛОВИЯ ВЫРАЩИВАНИЯ

В экспериментах использовали 5–6-суточные этиолированные проростки гороха. Для получения материала семена гороха промывали мыльным раствором, хорошо отмывали, раскладывали в рядки на влажной фильтровальной бумаге, собранной гармошкой, и проращивали в термостатируемом шкафу при 20 °С без света.

2.3. ТЕМПЕРАТУРНАЯ ОБРАБОТКА

Температурные обработки этиолированных проростков изучаемого вида растений условно обозначали как:

1. Контроль – проростки выращивали при оптимальной температуре роста (в пределах интервала оптимальных значений температур роста) 20 °С в течение шести суток.

2. Закаливание – обработка, в результате которой устойчивость проростков к промораживанию увеличивалась. Для этого пятисуточные этиолированные побеги, выращеные при оптимальной температуре роста 20 °С, подвергали действию закаливающей температуры 7 °С в течение семи суток.

3. Жесткий стресс – обработка низкими повреждающими отрицательными температурами, при которой наблюдалась гибель не менее 20–30 % растений. Контрольные проростки помещались в камеру на 1,5 часа при температуре минус 7 °С.

4. Мягкий стресс – обработка низкими положительными температурами, при которой растения не погибали, но испытывали стресс, что в результате

приводило к снижению устойчивости растений. С этой целью шестисуточные проростки гороха дополнительно выдерживали семь суток при температуре 2 °С.

Продолжительность обработок оптимальной и затем закаливающей или стрессовой температурами подбиралась таким образом, чтобы растения по своему развитию соответствовали контрольным.

Интенсивность и продолжительность температурных обработок определялась биологическими особенностями вида на основании имеющихся литературных данных (Стрижова и др., 2008), а также при помощи тестов на устойчивость к низким отрицательным температурам путем промораживания образцов (Туманов, 1979; Барашкова, Виноградова, 1988).

Все длительные обработки проводили в кюветах с закрытыми крышками во избежание подсушивания растений. Полуторачасовую обработку повреждающей отрицательной температурой осуществляли в открытых кюветах для более быстрого охлаждения проростков.

Температурные обработки проводили в климатических камерах “Binder” (Германия) и в инкубаторах “MIR-153” и “MIR-154” (“Sanyo”, Япония) в темноте.

2.4. ОЦЕНКА ОТНОСИТЕЛЬНОЙ МОРОЗОСТОЙКОСТИ ПРОРОСТКОВ

Определение относительной морозостойкости проростков после всех низкотемпературных обработок проводили путем подсчета выживших растений после промораживания. Промораживание проводили при минус 7 °С в течение 1,5 ч, после чего растения переносили в 10 °С на 1 час, а затем оставляли их отрастать при комнатной температуре 20 °С на свету. Выживаемость растений рассчитывали как процент живых растений от их общего числа (по 100 растений в каждой повторности).

2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), основную массу которых составляет малоновый диальдегид (МДА). Определение содержания продуктов ПОЛ проводили по методике Hodges с соавторами (Hodges et al., 1999). В основе метода лежит реакция между МДА и двумя молекулами ТБК, которая при высокой температуре и низком значении pH протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего 1 молекулу МДА и 2 молекулы ТБК. Максимум поглощения этого комплекса определяется при длине волны 532 нм.

Для анализа ТБК-реактивных продуктов 1 г проростков замораживали жидким азотом, растирали до порошкообразного состояния и гомогенизировали в 25 мл 80%-го этанола. К 6 мл гомогената добавляли ТХУ до конечной концентрации 10% для осаждения белка, после чего центрифугировали 10 мин при 8000 g на центрифуге Allegra 64 R (“Beckman Coulter”, США). Далее полученный супернатант переносили по 1 мл в чистые пробирки. В одни пробирки приливали 1 мл 0,8% раствора ТБК в 50%-ном этаноле, в другие – 1 мл 50%-го этанола. Реакционную смесь в пробирках помещали на водяную баню и кипятили 25 минут, после чего охлаждали 40 минут. Далее содержимое пробирок доводили до постоянного объема 4 мл 80%-ым этанолом. Содержание ТБК-реактивных продуктов определяли по показателям оптической плотности, измеренным при 440, 532 и 600 нм при помощи спектрофотометра SmartSpec Plus (“Bio-Rad”, США). Для расчетов использовали показатели для одних и тех же образцов, реакционные смеси которых либо содержали ТБК (+ТБК), либо не содержали (–ТБК). Расчеты проводили по формулам:

1. $[(\text{Абс. } 532_{+\text{ТБК}}) - (\text{Абс. } 600_{+\text{ТБК}}) - (\text{Абс. } 532_{-\text{ТБК}} - \text{Абс. } 600_{-\text{ТБК}})] = A$
2. $[(\text{Абс. } 440_{+\text{ТБК}} - \text{Абс. } 600_{+\text{ТБК}}) * 0{,}0571] = B$
3. $\text{МДА-эквиваленты (нМ/мл)} = ((A-B)/157000) * 10^6$

Где: Абс. $532_{+ТБК}$ – это максимум абсорбции ТБК-МДА комплекса при длине волны 532 нм в образцах с ТБК; Абс. $600_{+ТБК}$ – абсорбция при длине волны 600 нм в образцах с ТБК для коррекции расчетов с учетом неспецифического помутнения раствора; Абс. $532_{-ТБК}$ – это абсорбция при длине волны 532 нм в образцах без ТБК; Абс. $600_{-ТБК}$ – абсорбция при длине волны 600 нм в образцах без ТБК; Абс. $440_{+ТБК}$ – абсорбция сахарозы при длине волны 440 нм в образцах с ТБК; 0,0571 – соотношение молярной абсорбции сахарозы при длинах волн 532 и 440 нм; 157000 – коэффициент молярной экстинции для МДА.

Концентрацию продуктов ПОЛ выражали как количество МДА-эквивалентов в наномолях на грамм сырого веса. Для этого значения концентрации МДА-эквивалентов в 1 мл разбавленной реакционной смеси умножали на 100.

2.6. ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ

Все операции по выделению митохондрий проводили по ранее описанным методикам (Войников, 1980; Stupnikova et al., 2006) с модификациями в специально оборудованном криостате при 0–2 °С. Разрушали растительную ткань с помощью пресса. Соотношение навески растительного материала (г) и объема среды выделения (мл) составляло 1:3. Для выделения митохондрий использовали среду, содержащую 0,3 М сахарозу, 40 мМ MOPS (3-морфолинопропансульфоновая кислота), 2 мМ ЭДТА, 1 мМ $MgCl_2$, 10 мМ KCl, 0,5% PVP (поливинилпирролидон), 0,05% цистеин, 0,4% БСА (бычий сывороточный альбумин), pH 7,5. Митохондрии выделяли из 80–160 граммов проростков. Гомогенат, полученный после разрушения растительного материала, фильтровали через капроновую ткань и для осаждения ядер и крупных клеточных фрагментов центрифугировали 10 мин при 2000 g. Осадок отбрасывали, а митохондрии из супернатанта осаждали при 20000 g в течение 10 мин. Полученный осадок ресуспендировали средой промывания, состоящей из 0,3 М сахарозы, 20 мМ MOPS, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ $MgCl_2$, 10 мМ KCl, 0,2% БСА, pH 7,5.

Повторное осаждение митохондрий после промывания проводили при 20000 g в течение 10 мин. Полученную грубую фракцию митохондрий ресуспендировали в среде промывания и использовали для дальнейшей очистки.

Центрифугирование осуществляли с помощью центрифуги Allegra 64 R (“Beckman Coulter”, США) на роторе F-0685.

2.7. ОЧИСТКА МИТОХОНДРИЙ

Митохондрии очищали в градиенте перколла (Douce, 1985; Guillot-Salomon et al., 1997). В работе использовали ступенчатый градиент перколла, приготовленный на среде, содержащей 0,3 М сахарозу, 10 мМ MOPS, 10 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$, и 0,2% БСА (pH 7,5). Градиент состоял из 18 и 8 мл 23 и 40% перколла соответственно.

Суспензию митохондрий, выделенных из проростков гороха, наслаивали на градиент перколла и затем центрифугировали при 24500 g в течение 35 мин. При фракционировании митохондрий получали две фракции клеточных компонентов. Фракция интактных митохондрий находилась на границе 23/40% перколла. Эту фракцию собирали и промывали от перколла, разбавляя собранную митохондриальную фракцию в 20 раз средой промывания (объем/объем). Осаждение митохондрий из разбавленной суспензии проводили при 24500 g в течение 10 мин. Осадок чистых митохондрий повторно промывали 10 объемами среды промывания, переосаждали в течение 10 мин при 24500 g и ресуперндировали в 100–270 мкл среды ресуспендирования, содержащей 0,3 М сахарозу и 20 мМ MOPS (pH 7,4). Центрифугирование осуществляли в центрифуге Allegra 64 R (“Beckman Coulter”, США), ротор F-0685.

2.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ И КАЧЕСТВА ОЧИЩЕНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ

Целостность и состояние изолированных митохондрий определяли с помощью традиционных методов, а именно: электронной микроскопии, теста на

доступность цитохрома *c* и полярографического анализа активности митохондрий.

2.8.1. Электронная микроскопия очищенных митохондрий

Фракцию очищенных митохондрий осаждали 3 мин при 10000 g на центрифуге 5415 R (“Eppendorf”, Германия), после чего осажденные органеллы фиксировали в течение часа префиксатором, содержащим 2,5% глутарового альдегида, 0,3 М сахарозу и 20 мМ MOPS, pH 7,4. Затем митохондрии трижды переосаждали при 10000 g в течение 3 минут и отмывали от префиксатора средой ресуспендирования (0,3 М сахароза и 20 мМ MOPS, pH 7,4). Постфиксацию проводили раствором 1%-ой четырехокиси осмия (“Реахим”, Россия), приготовленным на среде ресуспендирования, в течение 2 часов. Материал обезвоживали в серии восходящих концентраций этанола, смеси абсолютного этанола с ацетоном, затем заключали в эпон-аралдит (“Fluka”, Швейцария). Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме “Reichert” (Австрия), помещали на никелевые сеточки без подложки и контрастировали насыщенным раствором уранилацетата (“Реахим”, Россия) в 50% этаноле в течение 30 минут и цитратом свинца (“Sigma”, США) по Рейнольдсу в течение 25 минут (Уикли, 1975). Сеточки с образцами просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе TECNAI G^2 (FEI) и ТЭМ LEO 906E (“Zeiss”, Германия). Микрофотографии получены цифровой камерой NA-Orius (Gatan, Япония).

2.8.2. Тест на доступность цитохрома *c*

Целостность внешней митохондриальной мембраны оценивали по разнице скорости аскорбат-зависимого стимулируемого цитохромом *c* KCN-чувствительного поглощения кислорода в отсутствие и в присутствии 0,03% Тритона X-100 (Benamar et al., 2003). Для оценки интактности использовали следующие реагенты в их конечной концентрации: 32 мкМ цитохрома *c*, 8 мМ

аскорбата и 0,4 мМ цианида калия (KCN). Процент целостности наружной мембраны рассчитывали по формуле:

целостность, % =100 – [(A – C)/(B – C) ×100] (Benamar et al., 2003),

где: A – первоначальная скорость поглощения кислорода, отражающая активность митохондрий с поврежденной наружной мембраной; B – скорость поглощения кислорода в присутствии 0,03% Тритона X-100, разрушающего наружную мембрану органелл, эта скорость характеризует общую активность всех тестируемых митохондрий; C – скорость неферментативного окисления цитохрома *c* после добавления цианида.

2.8.3. Полярографический анализ активности митохондрий

Окислительную и фосфорилирующую активность очищенных митохондрий определяли на полярографе Oxytherm system (“Hansatech Inst.”, Англия) в ячейке объемом 1,5 мл при температуре 20 °C. Митохондрии добавляли в полярографическую ячейку со средой инкубации (pH 7,5), содержащей 10 мМ KH_2PO_4, 5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ KCl, 20 мМ MOPS, 0,3 М маннит. В ячейку добавляли субстрат окисления, 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата. Для инициирования окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий в ячейку вносили АДФ. Конечная концентрация добавленного АДФ составляла 100–200 мкМ. Дыхание ингибировали 0,5 мМ KCN, который добавляли в состоянии 3, когда органеллы активно окисляли субстрат и фосфорилировали АДФ (Побежимова и др., 2004).

Энергетическую активность определяли, рассчитывая параметры окисления и фосфорилирования митохондрий: состояние 3 (V_3) – скорость поглощения O_2 при фосфорилировании АДФ (нмоль O_2/мин/мг белка); состояние 4 (V_4) – скорость поглощения O_2 после истощения АДФ (нмоль O_2/мин /мг белка); коэффициент дыхательного контроля рассчитывали как отношение скорости дыхания в состоянии 3 к скорости дыхания в состоянии 4 (ДК=V_3/V_4).

2.9. СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ НАТИВНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Солюбилизацию митохондриальных нативных белков проводили согласно Sunderhaus с соавторами (Sunderhaus et al., 2007), используя буфер (digitonin solubilization solution), содержащий 5% дигитонина, 30 мМ HEPES, 150 мМ ацетата калия, 10% глицерина, pH 7,4. Соотношение белка и детергента составляло 1:5. Солюбилизацию проводили в течение 30 минут на льду с периодическим помешиванием, после чего образцы центрифугировали при 4 °С в течение 30 минут при 16400g на центрифуге 5415 R (“Eppendorf”, Германия). Супернатант отбирали, разливали по 50 мкл и замораживали при минус 80 °С в морозильной камере (“Sanyo”, Япония). Образцы использовали для разделения на одномерном и двумерном голубом нативном электроферезе.

2.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА

Концентрацию белка в суспензии свежевыделенных митохондрий и в образцах для нативного фореза определяли по методу Bradford (Bradford, 1976). В основе метода лежит определение концентрации комплекса красителя Кумасси G-250 с белком, окрашенного в синий цвет и имеющего максимум поглощения при длине волны 595 нм. Таким образом, увеличение абсорбции раствора при 595 нм пропорционально количеству белка в образце.

Для измерения концентрации белка в митохондриальной суспензии 5 мкл митохондрий разрушали в 1 мл 0,05%-го Тритона X-100. Для измерения отбирали по 5 мкл и добавляли 250 мкл реактива Bradford 1X (“Bio-Rad”, США). Калибровочную кривую строили, используя в качестве стандарта БСА в концентрации от 0,125 до 1 мг/мл, приготовленный на растворе 0,05%-го Тритона X-100. Поглощение определяли при длине волны 595 нм на микропланшетном спектрофотометре Immunochem-2100 (“HTI”, США).

Измерение концентрации белка в образцах для BNE проводили также методом Bradford, разбавляя образцы в 50 раз, чтобы концентрация дигитонина в

образцах составляла 0,1%. Концентрация дигитонина выше 0,1% мешает точному измерению. Калибровочную кривую строили, используя БСА в концентрации от 0,125 до 1 мг/мл, приготовленному на растворе 0,1%-го дигитонина.

2.11. ОДНОМЕРНЫЙ ГОЛУБОЙ НАТИВНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ (1D BNE)

Одномерный голубой нативный электрофорез проводили в блоках градиентного полиакриламидного геля по методу Sunderhaus с соавторами (Sunderhaus et al., 2007), используя Кумасси G-250 (Comassie brilliant blue G-250) для создания дополнительного заряда на белках. Благодаря этому анионному красителю метод и получил название голубой нативный электрофорез (BN PAGE). Электрофорез проводили с помощью прибора Protean II xi Cell (“Bio-Rad”, США) согласно инструкции производителя.

Катодным буфером служил Трицин – Бис-трисовый буфер с pH 7,0, состоящий из 50 мМ трицина, 15 мМ Бис-триса и 0,02% Кумасси G-250. Анодный буфер содержал 50 мМ Бис-триса, pH 7,0 при 4 °C. Градиентный разделяющий гель размером 0,15x16x20 см состоял из “легкого” и “тяжелого” растворов с концентрацией акриламида 3,5 и 16%, бис-акриламида – 0,11 и 0,5% соответственно. Для их приготовления использовали акриламидный раствор 49,5%, содержащий акриламид и бис-акриламид в соотношении 32:1, т.е. 48% акриламида и 1,5% бис-акриламида. “Легкий” и “тяжелый” растворы содержали также 0,25 М аминокапроновой кислоты, 25 мМ Бис-триса, “тяжелый” раствор содержал дополнительно 20% глицерина. Гели полимеризовали, добавляя персульфат аммония и TEMED (тетраметилэтилендиамин) в концентрациях для “легкого” геля – 0,046% и “тяжелого” геля – 0,033%. Заливку градиентного разделяющего геля проводили сверху с помощью перистальтического насоса Perestaltic Pump P-3 (“Pharmacia Fine Chemicals”, Швеция). Концентрирующий гель состоял из 3%-го акрилимида, 0,094% бис-акриламида, 0,25 М аминокапроновой кислоты, 25 мМ Бис-триса, 0,055% персульфата аммония и

0,055% TEMED. Перед нанесением на гель в белковые образцы добавляли раствор Кумасси (5% Кумасси G-250, 750 мМ аминокапроновой кислоты) в количестве 2,5 мкл красителя на 50 мкл образца. В карманы загружали по 80–100 мкг белка. Электрофорез проводили в холодной комнате при 4 °С с дополнительным постоянным охлаждением гелей до 4 °С при помощи охлаждающего модуля прибора, присоединенного к термостату. Первые 45 минут при постоянном напряжении 100 В, затем при постоянной силе тока 15 мА в течение пяти часов. Спустя 2 часа после начала фореза меняли катодный буфер с концентрацией 0,02% Кумасси G-250 на аналогичный буфер, но с концентрацией красителя 0,002%.

По окончании электрофореза в гелях определяли локализацию белковых зон при помощи Кумасси и проводили детекцию ферментативной активности методом зимографии.

2.12. ДВУМЕРНЫЙ ГОЛУБОЙ НАТИВНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С НАТИВНОЙ ВТОРОЙ МЕРОЙ (2D BNE/BNE)

Двумерный голубой нативный электрофорез с нативной второй мерой проводили по методу Sunderhaus с соавторами (Sunderhaus et al., 2007). Для электрофореза использовали прибор Protean II xi Cell (“Bio-Rad”, США).

Катодный и анодный буферы для первой меры разделения были теми же, что и для 1D BNE (глава 2.11). Нативный градиентный гель первой меры имел размер 0,1x16x16 см и плотность 3,5–10%. Градиентный разделяющий гель состоял из “легкого” и “тяжелого” растворов, содержащих 3,5 и 10% акриламида, 0,11 и 0,31% бис-акриламида соответственно, 0,25 М аминокапроновой кислоты, 25 мМ Бис-триса, “тяжелый” раствор содержал дополнительно 20% глицерина. Концентрирующий гель состоял из 3%-го акриламида, 0,094% бис-акриламида, 0,25 М аминокапроновой кислоты, 25 мМ-го Бис-триса, 0,055% персульфата аммония и 0,055% TEMED. Электрофорез проходил при температуре 4 °С и

постоянном напряжении 100 В в течение первых 45 минут, затем при постоянной силе тока 15 мА в течение 2,5 часов.

По окончании электрофореза из гелей первой меры вырезали белковые треки. Суперкомплексы, локализованные в этих треках, делили на отдельные комплексы ЭТЦ при помощи додецилмальтозида (ДДМ) в концентрации 0,03%. Для этого трек, вырезанный из геля первой меры, инкубировали при 4 °С в течение 10 минут в катодном буфере с добавлением ДДМ. После инкубации трек помещали на гель второй меры размером 0,15x18x20 см. Разделение суперкомплексов во второй мере проводили в градиенте плотности 5–18%. “Легкий” и “тяжелый” растворы для градиентного геля второй нативной меры состояли из 5, 18% акриламида и 0,15, 0,56% бис-акриламида соответственно, 0,25 М аминокапроновой кислоты, 25 мМ Бис-триса, 0,03% ДДМ, “тяжелый” дополнительно включал 20% глицерина. Гели полимеризовали, добавляя персульфат аммония и TEMED в концентрациях для “легкого” геля – по 0,045% и “тяжелого” геля – по 0,025%. Фиксировали трек с помощью 0,8 % агарозы, аккуратно заливая ее между стеклами, не допуская образования пузырей. Катодный и анодный буферы для разделения во второй нативной мере были теми же, что и для 1D BNE (глава 2.11), только в катодный буфер был добавлен ДДМ в концентрации 0,03%. Разделение проходило при следующих параметрах: 45 минут при постоянном напряжении 100 В, затем при постоянной силе тока 15 мА в течение двенадцати часов. Электрофорез проводили при температуре 4 °С.

Гель после второй меры помещали в окраску Кумасси либо использовали для детекции активности дыхательных комплексов при помощи зимографии.

2.13. ДВУМЕРНЫЙ ГОЛУБОЙ НАТИВНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С ДЕНАТУРИРУЮЩЕЙ ВТОРОЙ МЕРОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ (2D BNE/SDS)

Условия проведения электрофореза, размер гелей первой меры разделения

были такими же, как описано в главе 2.11. Для разделения субъединиц дыхательных комплексов во второй денатурирующей мере был использован Трицин-SDS-PAGE (Schagger, 2001; Wittig, Schagger, 2007).

Треки с интересующими образцами вырезали из гелей первой нативной меры размером 0,15x16x20 см и инкубировали 30 минут в денатурирующем растворе, содержащем 1% SDS и 1% β-меркаптоэтанола. Затем отмывали в течение 30 секунд и помещали на внешнее стекло (для геля 0,1x16x16 см) сэндвича в положение, соответствующее дну карманов тефлоновой гребенки, т.е. примерно на расстоянии 5 см от верхней границы стекла. После чего собирали сэндвич, зажимая трек между стеклами, и заливали 10%-ный разделяющий гель, содержащий 10% акриламида, 0,31% бис-акриламида, 1 М Триса, 0,1% SDS, 10% глицерина, 0,05% персульфата аммония и 0,05% TEMED, pH 8,45. Концентрирующий гель состоял из 4%-го акриламида, 0,125% бис-акриламида, 1 М Триса, 0,1% SDS, 0,075% персульфата аммония и 0,075% TEMED, pH 8,45. Катодный буфер содержал 0,1 М Триса, 0,1 М трицина и 0,1% SDS, pH 8,25. Анодным буфером служил 0,2 М Трис, pH 8,9.

Форез проводился при следующих параметрах: 50 мА в течение 3-х часов и далее 120 В – 6 часов. После фореза гель либо окрашивали Кумасси, либо использовали для вестерн-блоттинга.

2.14. ОКРАСКА И ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ ГЕЛЕЙ

По окончании электрофореза гели переносили в раствор 12%-ой ТХУ на 1 час для фиксации белковых комплексов или выявляли ферментативную активность в геле. После фиксации ТХУ гели промывали бидистиллированной водой и помещали в раствор для визуализации белка, который содержал 25% изопропиловый спирт, 10% уксусную кислоту, 0,2 % Кумасси R-250.

Для обесцвечивания фона гели отмывали и хранили в растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 12,5% изопропанола. Для нативных гелей также использовали окрашивание раствором коллоидного Кумасси, состоящего из 17%

сульфата аммония, 1,8% фосфорной кислоты, 0,12% Кумасси G-250, 35% метанола (Majek et al., 2013). После коллоидного Кумасси гели отмывали в растворе 1%-ной уксусной кислоты.

2.15. ВЕСТЕРН-БЛОТТИНГ

Иммуноблоттинг включает в себя иммобилизацию белков на нитроцеллюлозной мембране с последующим выявлением анализируемых белков на полученной реплике при помощи специфических антител.

При Вестерн-блоттинге (Western-Blotting) белковые пятна после 2D BNE/SDS переносили на нитроцеллюлозную мембрану на приборе для полусухого переноса Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (“Bio-Rad”, США) в охлажденном буфере для переноса (48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 10% метанол, pH 9,2) в течение 5 часов при постоянном напряжении 15 В (Timmons, Dunbar, 1990).

Эффективность переноса определяли при помощи красителя Ponceau S (0,5% Ponceau S (“Sigma”, США) в 0,1% уксусной кислоте). Мембраны блокировали в 5%-ном растворе обезжиренного сухого молока, приготовленном на буфере TBS, pH 7,5 (20 мМ Трис-HCl, 0,5 М NaCl).

Заблокированную мембрану инкубировали в растворе первичных антител 1,5–2 часа при постоянном помешивании. Время инкубации зависело от активности антител и, как правило, составляло 1–2 часа. После инкубации раствор первичных антител сливали и отмывали мембрану от непрореагировавших антител отмывочным буфером TTBS с pH 7,5 (20 мМ Трис, 0,5 М NaCl, 0,05% Tween-20). Отмытую мембрану помещали в раствор вторичных антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой, на 1 час. Растворы первичных и вторичных антител готовили на буфере TTBS, содержащем 2% молока и 0,02% азида. Затем мембрану вновь отмывали в буфере TTBS и помещали в буфер pH 9,5 (100 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$). Для визуализации белковых полос готовили реакционный раствор для выявления активности щелочной

фосфатазы, состоящий из Трис-HCl буфера с pH 9,5, 0,17 мг/мл 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфата (BCIP) и 0,33 мг/мл нитросинего тетразолия хлорида (NBT). В приготовленном растворе инкубировали мембрану при комнатной температуре в течение 5–20 минут в зависимости от степени развития окраски. Мембрану высушивали, сканировали и проводили анализ данных.

2.16. ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ АНТИТЕЛА

В работе использовали следующие первичные поликлональные кроличьи антитела: на фумаразу и изоцитратдегидрогеназу (любезно предоставлены prof. D. J. Oliver, Университет штата Айова, США); альтернативную оксидазу (“Agrisera”, Швеция); синтетические пептиды внутренней (NDA1) и внешней (NDB1) НАД(Ф)Н-дегидрогеназ (любезно предоставлены профессором A. G. Rasmusson, Университет Лунда, Швеция); субъединицу 51 кДа комплекса I, субъединицу SDH1-1 комплекса II, α-субъединицу митохондриальной процессинговой пептидазы комплекса III (получены в дар от профессора H. P. Braun, Ганноверский университет имени Г. В. Лейбница); субъединицу цитохромоксидазы COXII (“Agrisera”, Швеция). Также использовали следующие первичные моноклональные мышиные антитела: на E1α-субъединицу пируватдегидрогеназного комплекса, α- и β-субъединицы АТФ-синтазы (любезно предоставлены профессором T. Elthon, Университет штата Небраска, США).

В качестве вторичных использовали кроличьи (“Jackson ImmunoResearch”, США, и “Sigma”, США) и мышиные (“Agrisera”, США) антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Все антитела разводили согласно инструкции производителя.

2.17. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС БЕЛКОВ

Определение молекулярных масс полипептидов проводили, используя в качестве белков-маркеров смеси белков с известными молекулярными массами. В набор белков широкого спектра входили: миоглобин (18 кДа), химотрипсиноген

(24 кДа), овальбумин (45 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа), γ-глобулин (160 кДа) (ICN, Biomedicals Inc., США). Также использовали набор белков для нативного фореза, в который входили: тироглобулин (669 кДа), ферритин (440 кДа), каталаза (232 кДа), лактатдегидрогенназа (140 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа) (Pharmacia, HMW calibration kit, Швеция).

2.18. ДЕТЕКЦИЯ АКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ГЕЛЕ

Детекцию ферментативной активности дыхательных комплексов в геле, как индивидуальных, так и находящихся в составе суперкомплексов, проводили по методикам Sabar с соавторами (Sabar et al., 2005) и Ramirez-Aguilar с коллегами (Ramirez-Aguilar et al., 2011).

Для выявления ферментативной активности I-го комплекса использовали Трис-HCl буфер с pH 7,4, содержащий в качестве субстрата окисления 0,225 мМ НАДН и 0,16% хромогена NBT. После инкубации геля в течение 15–20 минут реакцию останавливали, помещая гель в фиксатор, содержащий 40% метанола и 10% уксусной кислоты.

Сукцинатдегидрогеназу (II комплекс) детектировали, используя фосфатный буфер с pH 7,4, содержащий 25 мМ KH_2PO_4, 25 мМ K_2HPO_4, 0,2 мМ PMS (феназинметасульфата), 4,5 мМ ЭДТА, 10 мМ KCN, 84 мМ сукцината и 0,2% NBT. Фиксацию окраски комплекса II проводили так же, как и комплекса I.

Для окрашивания комплекса IV использовали фосфатный буфер с pH 7,4, состоящий из 5 мМ KH_2PO_4, 5 мМ K_2HPO_4, 7,5% сахарозы, 0,036 мг/мл цитохромома *c*, 0,1% DAB (3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорида). Гели инкубировали 7–8 часов, после чего фиксировали развившуюся окраску 7%-ной уксусной кислотой.

Комплекс V выявляли при помощи буфера, содержащего 50 мМ глицина, 5 мМ $MgCl_2$, 5 мМ АТФ, 0,1% $Pb(NO_3)_2$. Гели оставляли в реакционном растворе

на 15–18 часов и затем сканировали в позитивном и негативном режимах, так как образующийся осадок флюорисцирует и более четко виден в негативном режиме.

Все гели сканировали на сканере EPSON PERFECTION V700 PHOTO (“Epson”, Индонезия).

2.19. АНАЛИЗ ГЕЛЕЙ В ПРОГРАММЕ IMAGE J

Гели были проанализированы в программе Image J. Величины относительного содержания белка и активности дыхательных комплексов в гелях оценивали по суммарной плотности выделенных электрофоретических полос в условных единицах. Значения представлены в процентах от контроля.

2.20. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Анализ образцов проводили методом матричной лазерной десорбционной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF). Предварительно образцы подвергали трипсинолизу. Для этого фрагменты геля с пятнами белков вырезали, помещали в несиликонизированные пробирки и трижды по 30 мин отмывали раствором 50%-го ацетонитрила и 25 мМ-го NH_4HCO_3. Затем гель 15 мин дегидратировали в ацетонитриле и 40 мин сушили при комнатной температуре. К высушенным фрагментам геля добавляли раствор трипсина (Promega) 0,005 мг/мкл в 25 мМ NH_4HCO_3, инкубировали при 4 °С до полного впитывания раствора в гель, после чего смесь на 12 ч помещали в термостат при 37 °С. По завершении гидролиза пробы 40 мин экстрагировали раствором 1%-ной трифторуксусной кислоты при 20 °С. Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Ultraflex (Bruker Daltonix) в режиме линейных масс в диапазоне детекции 700–3500 Да. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту (DHB). Разметку спектров проводили, используя программу MS Spectra viewer. Данные анализировали с помощью пакета программ Flex Analysis. Идентификацию полученных масс-спектров проводили с

использованием базы данных NCBI с таксономическим ограничением до Viridi plantae (зеленые растения).

2.21. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Эксперименты проводили в 3–9 биологических повторностях, в каждой из которых было не менее трех аналитических. Данные представлены как средняя арифметическая или медиана, а разброс значений в виде стандартного отклонения или интерквартильной широты [25%; 75% процентиль].

В случае нормального распределения для доказательства значимых различий между средними использовали однофакторный дисперсионный анализ, а при распределении, отличающемся от нормального, применяли Н-критерий Краскела-Уоллиса. Последующее множественное сравнение средних проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $P \leq 0{,}05$. Статистические расчеты осуществляли с помощью программного пакета SigmaPlot 12.5.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ЧИСТОТА И КАЧЕСТВО ИЗУЧАЕМЫХ ФРАКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ

Как указывалось ранее, дыхательная цепь митохондрий имеет сложную надмолекулярную организацию и состоит как из отдельно располагающихся дыхательных комплексов, так и из ассоциаций комплексов, называемых суперкомплексами и респирасомами, которые в свою очередь могут объединяться в целые дыхательные участки – мегакомплексы (Bultema et al., 2009; Welchen et al., 2011; Lenaz, Genova, 2012). Предполагается, что подобная организация открывает новые свойства дыхательной цепи митохондрий по сравнению с отдельно функционирующими монокомплексами. Изучение и характеристика строения системы OXPHOS митохондрий, а также выявление ее новых свойств при помощи методов одномерного и двумерного голубого нативного форезов в градиентном геле (BNE, BNE/BNE, BNE/SDS-PAGE), гистохимического окрашивания активности комплексов в геле, иммунохимии и масс-спектрометрии требуют аккуратного выделения чистых, интактных и функционально активных органелл. Использование неинтактных и некачественно выделенных органелл может привести к получению недостоверных данных и неверному представлению о нативной организации дыхательной цепи митохондрий.

Чистоту и интактность фракций органелл, полученных путем дифференциального центрифугирования с последующей их очисткой на ступенчатом градиенте перколла, контролировали при помощи трансмиссионной электронной микроскопии и биохимических методов – теста на целостность выделенной фракции органелл и полярографического метода анализа их активности. Целостность митохондрий оценивали по доступности экзогенного восстановленного цитохрома *c* для цитохром *c* оксидазы, а полярографический метод позволил оценить скорости фосфорилирующего и нефосфорилирующего дыхания митохондрий и величины дыхательного контроля, отражающие

активность и степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования в этих органеллах.

Анализ чистоты фракции при помощи электронной микроскопии показал высокую степень чистоты выделенных органелл с небольшим загрязнением (менее 5%) микросомальной фракцией (рис. 6).

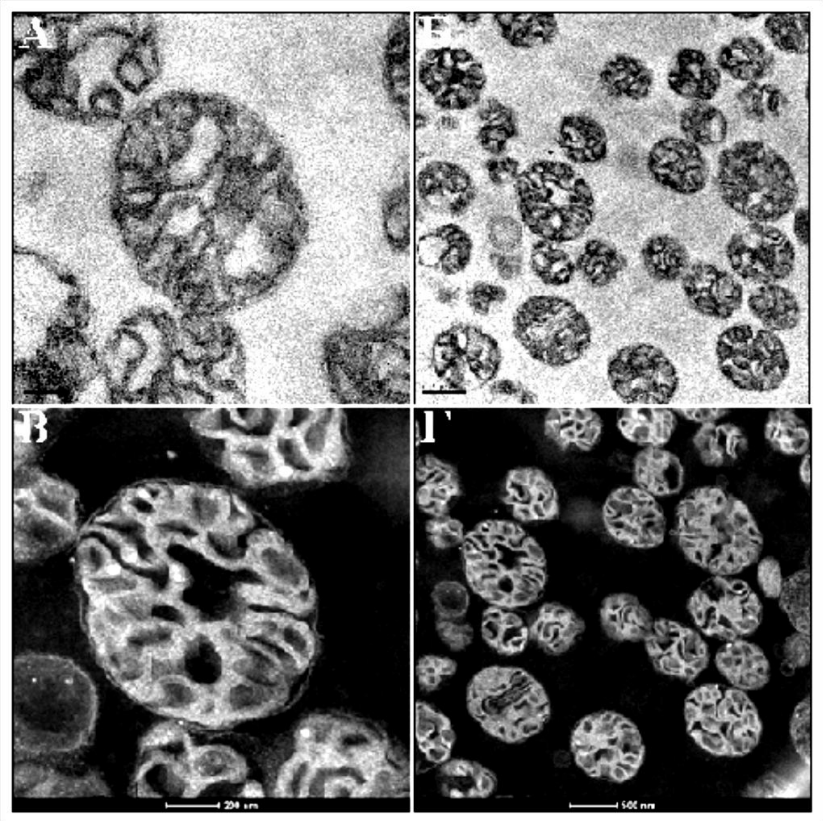


Рис. 6. Митохондрии этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L., сорт "Аксайский усатый 55")

А, В – наиболее типичные органеллы в обычном (А) и сканирующем (В) режимах; Б, Г – фракция очищенных на градиенте перколла органелл в обычном (Б) и сканирующем (Г) режимах. Фотографии образцов получены на трансмиссионном электронном микроскопе "TECNAIG^2" (FEI). Масштабные отрезки для образцов составили: А и В – 200 нм, Б и Г – 500 нм. Фотогрифии сделаны А. В. Сидоровым.

Как видно из рисунка 6, митохондрии проростков гороха имеют гомогенный матрикс, четко выраженную наружную мембрану и большое количество крист. Кристы имеют обычную для митохондрий высших растений форму – они начинаются в виде узкой шейки и заканчиваются формой глобулы или пластинки (Гудвин, Мерсер, 1986). Размер органелл в среднем колеблется от 750 до 950 нм.

Согласно тесту на целостность наружной мембраны и данным полярографического анализа (табл. 1), митохондриальные фракции, очищенные на градиенте перколла, имели высокую интактность (98,5%), активно окисляли субстрат и отличались высокой степенью сопряжения дыхания и фосфорилирования (ДК = 3,3).

Таблица 1

Целостность мембран, скорость окисления и дыхательный контроль митохондрий этиолированных проростков гороха в контрольных условиях

Варианты	Целостность, %	V_3	V_4	ДК
Контроль	98,7 ± 0,9	41,5 ± 4,4	12,6 ± 1,2	3,3 ± 0,2

В качестве субстрата окисления использовали малат (10 мМ) в присутствии глутамата (10 мМ). Митохондрии выделены из контрольных растений, выращенных в течение 6 суток. при 20 °С. V_3, V_4 – скорости фосфорилирующего и нефосфорилирующего дыхания соответственно, в нмоль O_2/мин/мг белка, ДК – дыхательный контроль. В таблице приведены средние арифметические и стандартные отклонения. n=3–6.

Таким образом, представленные данные показывают, что в работе использовались органеллы с высокой степенью чистоты и интактности, обладающие хорошей активностью и сопряженностью процессов окисления и фосфорилирования, что послужило надежной базой для изучения и получения достоверных данных о нативной организации ЭТЦ митохондрий.

3.1.1. Интактность и функциональная активность митохондрий проростков гороха в условиях закаливания и низкотемпературного стресса

Для изучения возможных изменений в надмолекулярной организации дыхательной цепи митохондрий проростков гороха под действием низких температур, прежде всего, необходимо было оценить качество изучаемых органелл после различных низкотемпературных обработок и выяснить, меняется ли интактность и функциональное состояние митохондрий в этих условиях.

Чтобы получить наиболее полную картину возможных изменений в системе OXPHOS растений гороха в условиях гипотермии, были использованы как закаливающие, так и стрессовые низкотемпературные воздействия,

различающиеся по интенсивности и продолжительности. Как отмечалось выше, величина и длительность температурных обработок определялась биологическими особенностями гороха (Стрижова и др., 2008), а также при помощи тестов на устойчивость к низким отрицательным температурам путем промораживания образцов (Туманов, 1979; Барашкова, Виноградова, 1988). Таким образом были определены три типа воздействия: закаливающее, при котором 5-и суточные контрольные проростки проходили холодовую адаптацию в течение 7 суток при 7 °С, мягкое стрессирование 6-и суточных контрольных проростков в течение 7 суток при 2 °С и жесткое стрессирование 6-и суточных контрольных побегов в течение 1,5 часов при минус 7 °С (Кондакова и др., 2013).

Как известно, клеточные мембраны являются естественным барьером и представляют собой первую линию защиты от стресса (Чиркова, 1997). Таким образом, закаливающие и стрессовые температуры в первую очередь воздействуют на клеточные мембраны, в том числе на мембраны субклеточных структур клеток растений, например, таких как митохондрии (Войников, 2013). Устойчивость этих мембран зависит от их эластичности, динамичности липидного матрикса и способности быстро реагировать и перестраиваться в ответ на температурные флуктуации. Поэтому целостность наружной мембраны митохондрий может не только отражать качество выделяемых органелл, но и являться показателем “прочности” мембран и в целом общего состояния митохондрий в изучаемых низкотемпературных условиях. Вследствие тесного взаимодействия мембранных липидных и белковых компонентов изменения в свойствах липидов должны неизбежно влиять и на функции белков в мембранах. Известно, что для нормальной активности ферментов необходимо жидкостное состояние мембран, поэтому каталитические функции мембранных белков изменяются под влиянием липидных перестроек, которые связаны с качественными изменениями жирнокислотного состава (Чиркова, 1997). Под воздействием холода, особенно при закаливании, ненасыщенность жирных кислот мембранных липидов растений может меняться (Войников, 2011). Причем у

холодоустойчивых и морозоустойчивых видов происходит увеличение ненасыщенности жирных кислот в мембранах митохондрий, в то время как холодочувствительные растения, по-видимому, не обладают способностью изменять состав липидов мембран при охлаждении, что может приводить к фазовым переходам в липидных компонентах при низких температурах. Учитывая все вышесказанное, важно было выяснить, как изучаемые низкотемпературные обработки влияют на “прочность” митохондриальных мембран и на активность всей ферментной системы окислительного фосфорилирования.

Как видно из таблицы 2, митохондрии, выделенные из контрольных и закаленных проростков, имели высокую целостность наружной мембраны.

Таблица 2

Целостность мембран, скорости окисления и дыхательный контроль митохондрий этиолированных проростков гороха в условиях гипотермии различной интенсивности

Варианты	Целостность, %	V_3	V_4	ДК
Контроль	98,7 ± 0,9 [а, в]	41,5 ± 4,4 [б]	12,6 ± 1,2 [в]	3,3 ± 0,2 [а, б, в]
Жесткий стресс	90,6 ± 1,8 [а, г, д]	37,9 ± 6,4 [д]	13,6 ± 2,0 [д]	2,8 ± 0,2 [а, д]
Закаливание	98,0 ± 0,6 [г]	35,0 ± 3,2 [б, е]	12,5 ± 1,0 [е]	2,8 ± 0,2 [б, е]
Мягкий стресс	96,8 ± 0,7 [в, д]	45,2 ± 4,4 [д, е]	18,5 ± 1,9 [в, д, е]	2,5 ± 0,3 [в, д, е]

В качестве субстрата окисления использовали малат (10 мМ) в присутствии глутамата (10 мМ). Температурные обработки: контроль – 6 суток при 20 °С; закаливание – 5 суток при 20 °С и 7 суток при 7 °С; мягкий стресс – 6 суток при 20 °С и 7 суток при 2 °С; жесткий стресс – 6 суток при 20 °С и 1,5 часа при минус 7 °С. V_3,V_4 – скорости фосфорилирующего, нефосфорилирующего дыхания в нмоль O_2/мин/мг белка, ДК – дыхательный контроль. В таблице приведены средние арифметические и стандартные отклонения, n=3–6, [а, б, в, г, д] – различия между контролем и жестким стрессом ([а]), контролем и закаливанием ([б]), контролем и мягким стрессом ([в]), жестким стрессом и закаливанием ([г]), мягким стрессом и жестким стрессом ([д]), мягким стрессом и закаливанием ([е]) статистически значимы ($P \leq 0,05$).

Известно, что закаливание приводит к увеличению ненасыщенности жирных кислот в митохондриальных мембранах холодостойких растений (Войников, 2011). Благодаря этому не допускается переход липидов в гексагональную упаковку, и они остаются в жидкокристаллическом состоянии,

сохраняя свою подвижность и обеспечивая оптимальную активность всех мембранных белков. Вероятно, высокая целостность наружной митохондриальной мембраны закаленных проростков гороха может являться результатом адаптивных перестроек липидного матрикса митохондриальных мембран, повышения ненасыщенности жирнокислотного состава и, как следствие, увеличения эластичности мембран.

Мягкий стресс снижал интактность наружной мембраны до 96,8%, а после выдержки проростков гороха при отрицательной температуре минус 7 °С целостность митохондриальной фракции снижалась еще сильнее и достигала 90%, что указывает на повреждающее действие выбранных стрессовых температур, особенно отрицательной. Повреждения наружной мембраны митохондрий в результате действия низких стрессовых температур могут быть вызваны набуханием органелл и локальными разрывами наружной мембраны. Это предположение подтверждают данные других исследователей (Kwiatkowska, 1970; Ishikawa, 1996; Lee et al., 2002; Rurek, 2014), которые обнаружили набухание митохондрий проростков озимой пшеницы после кратковременной выдержки при минус 4° С (Kwiatkowska, 1970; Khristolyubova et al., 1974), а также охлаждения растений маша (Ishikawa, 1996), огурца (Lee et al., 2002) и арабидопсиса (Rurek, 2014). Повреждения наружной мембраны митохондрий в результате действия низких стрессовых температур могут быть также связаны с развитием окислительного стресса. Это подтверждают данные Loubaresse с коллегами (Loubaresse et al., 1991), согласно которым повреждение мембран во время низкотемпературного стресса, особенно при замерзании растений, связано с увеличением содержания перекиси водорода и малонового диальдегида, а также индукцией перекисного окисления липидов.

Функциональная активность органелл также менялась в зависимости от температурной обработки. Все низкие температуры, как закаливающие, так и стрессовые, вызывали существенное снижение степени сопряжения окисления и фосфорилирования. Войников (Войников, 1978, 2011, 2013) в своих

исследованиях, проводимых на морозоустойчивых и неморозостойких злаках, также отмечал переход митохондрий в низкоэнергетическое состояние после охлаждения, причем морозоустойчивые растения быстрее снижали степень сопряжения окисления и фосфорилирования по сравнению с менее устойчивыми видами. Как видно из таблицы 2, для снижения степени сопряжения при разных температурных условиях митохондрии гороха использовали разные механизмы. Так, закаливание приводило к снижению скорости фосфорилирующего дыхания, что, вероятно, связано с активацией альтернативных путей переноса электронов. Это предположение согласуется с данными Грабельных с коллегами (Грабельных и др., 2014), которые показали, что в период закаливания проростков озимой пшеницы происходит активация митохондриальных энергорассеивающих систем, таких как AOX и UCP, что сопровождается снижением генерации активных форм кислорода (АФК).

Жесткий стресс несущественно подавлял фосфорилирующее и активировал нефосфорилирующее дыхание. Мягкий стресс приводил к значительному росту V_4, что может быть также связано с активацией альтернативных путей дыхания.

Таким образом, представленные данные показывают различное поведение митохондрий гороха в ответ на действие низкой температуры. Закаливание вызывает ряд адаптационных перестроек, в результате которых сохраняется эластичность митохондриальных мембран, а ферментативная система окислительного фосфорилирования переходит в менее интенсивный, но устойчивый режим, направленный на поддержание энергией клеточного гомеостаза и снижение образования АФК. В стрессовых условиях происходит, по всей видимости, ухудшение состояния мембран, которое сопровождается увеличением нефосфорилирующего дыхания и снижением степени сопряжения митохондрий. Обнаруженные изменения в состоянии митохондриальных мембран и функциональной активности митохондрий позволяют предположить также и возможные перестройки в надмолекулярной организации системы OXPHOS митохондрий в период гипотермии.

3.2. ОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

Прежде чем перейти к изучению влияния гипотермии на состав и активность суперкомплексов системы OXPHOS митохондрий проростков гороха, необходимо было изучить особенности ее нативной организации в органеллах, изолированных из контрольных растений, которые были выращены в оптимальных температурных условиях. Для этого использовали одномерный и двумерный голубой нативный электрофорезы BN-PAGE (1D BNE, 2D BNE/BNE) с последующей энзимографической детекцией ферментативной активности отдельных комплексов в геле (1D BNE и 2D BNE/BNE), а также иммуноблоттинг двумерных 2D BNE/SDS-гелей с использованием антител на интересующие белки и масс-спектрометрический анализ 2D BNE/SDS-гелей. В отличие от обычного SDS-фореза в системе Laemmli (Laemmli, 1970), голубой нативный форез сохраняет белковые комплексы в нативном и активном состоянии, что предоставляет возможность детекции их активности при помощи энзимографии. Голубым этот форез был назван благодаря присутствию анионного красителя Кумасси G-250 в образцах и катодном буфере, который мягко связывается с поверхностью всех мембранных и многих водорастворимых белков, не денатурируя их.

В настоящее время организация и состав суперкомплексов в различных видах и даже на разных фазах развития растения изучается достаточно активно. Несмотря на это, информация о нативном состоянии и организации системы OXPHOS митохондрий носит порой противоречивый характер, т.к. получена на основании результатов исследований, в которых применялись разные неионогенные детергенты. Среди них есть как более мягкие, такие как дигитонин, который максимально сохраняет нативную конформацию белков, так и более жесткие, такие как додецилмальтозид, который разбивает суперкомплексы на отдельные комплексы.

Нативная конформация дыхательной цепи этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.) на сегодняшний день недостаточно изучена. По нашим данным есть пока одна работа Taylor с соавторами (2005), в которой предпринята попытка изучения организации системы OXPHOS зеленых растений гороха при помощи более жесткого детергента додецилмальтозида. В результате исследований авторы обнаружили в составе дыхательной цепи только один суперкомплекс – $I+III_2$. Все остальные комплексы по их данным располагаются отдельно и не образуют ассоциаций. В нашем исследовании системы OXPHOS проростков гороха (*Pisum sativum* L.) мы использовали мягкий неионный детергент дигитонин, который лучше остальных подобных соединений стабилизирует мембранные комплексы, сохраняя нативную организацию мембранных белков, и в настоящее время считается самым мягким детергентом (Sunderhause et al., 2007).

3.2.1. Энзимография комплексов системы окислительного фосфорилирования митохондрий гороха в нативном голубом одномерном геле 1D BNE

В ходе исследования был обнаружен ряд мажорных и минорных электрофоретических зон с электрофоретической подвижностью R_f 0,01–0,93, представляющих собой нативные митохондриальные белки и их ассоциации (рис. 7, Б) (Кондакова и др., 2014). В некоторых из них при помощи метода энзимографии детектировались дыхательные комплексы и суперкомплексы с предполагаемыми молекулярными массами от 220 до 10000 кДа. Массы определяли, используя маркеры для нативного фореза (рис. 7, А), дополнительно учитывая данные Schagger (Schagger, 2001) и Wittig (Wittig, Schagger, 2007), которые установили разбег молекулярных масс для градиентных гелей в зависимости от их плотности. Точно рассчитать молекулярные массы ассоциаций белков на основании масс нативных маркеров на сегодняшний день пока не представляется возможным, поскольку белки плотно упакованы в ассоциации и

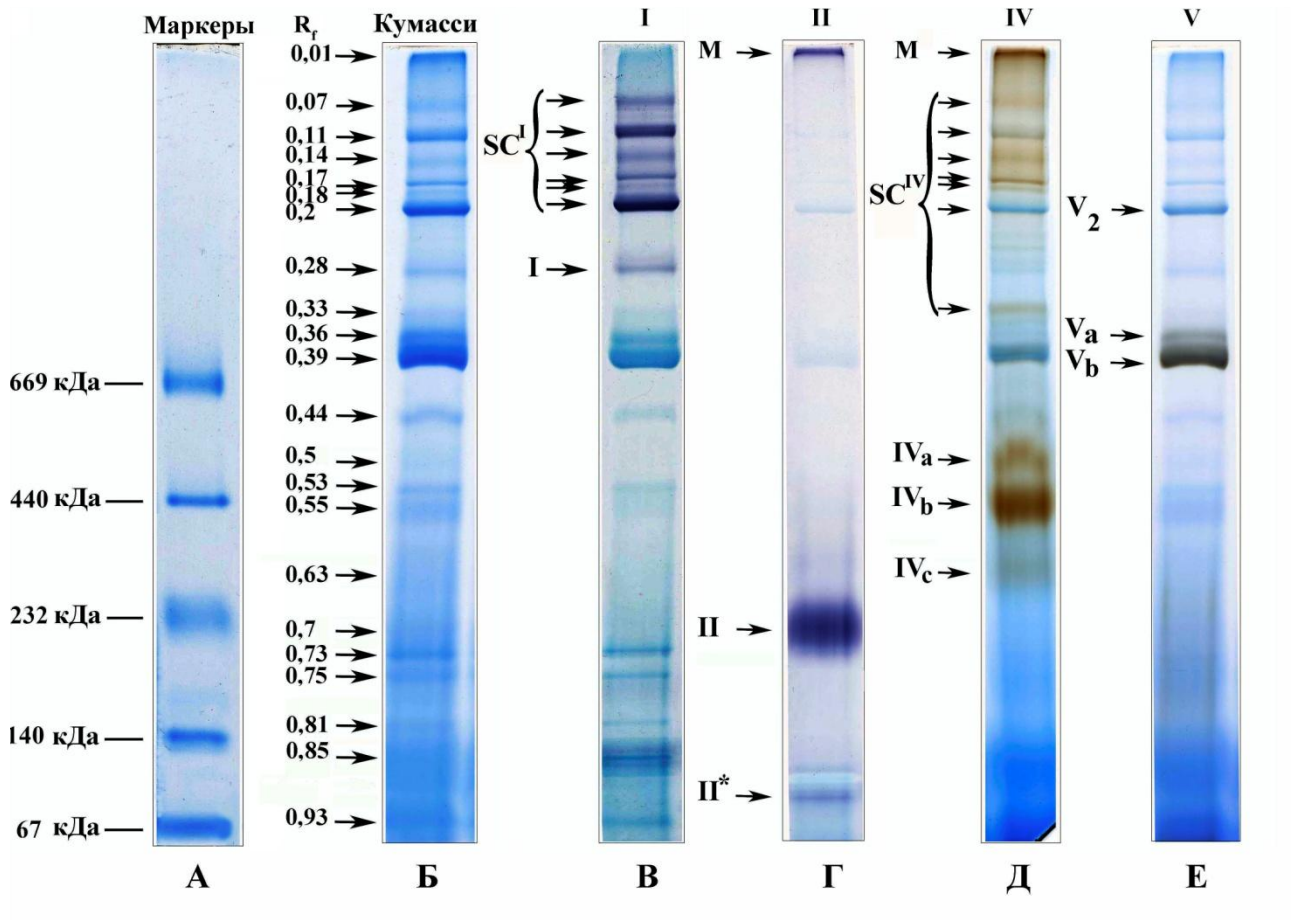


Рис. 7. Зимография митохондриальных дыхательных комплексов проростков гороха в градиентном геле 1D BNE

Дыхательные комплексы и суперкомплексы разделены в градиентном 1D BNE геле 3,5–16%. **А** – маркерные белки-стандарты и их массы; **Б** – спектр нативных митохондриальных белков (комплексом), окрашенных коллоидным Кумасси; **В, Г, Д, Е** – энзимограммы дыхательных комплексов I, II, IV и V в геле соответственно.

Обозначения: R_f – электрофоретическая подвижность, которая рассчитывается как отношение расстояния, пройденного белковой полосой от начала рабочего геля, к аналогичному расстоянию до фронта красителя в этом же геле; стрелки указывают на соответствующие белковые комплексы; SC^I – суперкомплексы, в которых детектируется активность комплекса I; SC^{IV} – суперкомплексы, в которых детектируется активность комплекса IV; M – мегакомплекс, в состав которого входят комплексы II и IV; I – комплекс I; II – комплекс II; II* – субъединицы SDH1 и SDH2 комплекса II; IVa, IV b, IVc – формы a, b, c комплекса IV соответственно; V_2 – димерный комплекс V; Va, Vb – формы a, b комплекса V соответственно.

значительная часть поверхности ферментов в них скрыта и не взаимодействует с Кумасси, а, следовательно, не имеет поверхностного заряда, необходимого для движения в электрическом поле. Это может приводить к ошибочным расчетам масс суперкомплексов относительно нативных маркеров. В связи с этим для

обозначения белковых полос, мы рассчитали электрофоретическую подвижность (R_f) каждой из них (рис. 7, Б).

НАДН-дегидрогеназную активность I-го комплекса в геле определяли по темно-фиолетовым полоскам нерастворимого формазана – продукта реакции восстановления NBT в результате окисления НАДН (рис. 7, В). Как видно из рисунка, активность комплекса I детектировалась в 6-и мажорных и минорных суперкомплексах, а также и в самом отдельно идущем первом комплексе с предполагаемой молекулярной массой примерно 1000–1300 кДа, что согласуется с данными других авторов (приложение Б) (Eubel et al., 2003; Heazlewood et al., 2003; Klodmann, Braun, 2011). Первый комплекс ЭТЦ митохондрий растений достаточно хорошо изучен и в среднем имеет массу 1000 кДа у исследованных на сегодняшний день видов, что превышает массу этого фермента у млекопитающих, которая составляет 900 кДа (Pilkington et al., 1993). Для сравнения бактериальный комплекс I, локализованный в цитоплазматической мембране, имеет массу 550 кДа и считается “минимальной моделью” этого фермента, т.к. содержит минимальный набор субъединиц, необходимых для его работы (Efremov et al., 2010). Превышение массы комплекса I у растений связано с присутствием дополнительных субъединиц с известными функциями, таких как карбоангидраза и l-галактоно-1,4-лактон дегидрогеназа, и субъединиц неизвестой природы (Klodmann, Braun, 2011; Welchen et al., 2011). Установлено, что растительный комплекс I присутствует во внутренней митохондриальной мембране как в ассоциациях с комплексами III_2 и IV, так и в мономерной форме, причем у разных видов соотношение ассоциированной формы и мономерной отличается (Welchen et al., 2011). Так, в митохондриях клубней картофеля, этиолированных проростков фасоли, суспензионной культуры арабидопсиса лишь 50% комплекса I входит в состав суперкомплекса $I+III_2$, а остальные 50% присутствуют в виде отдельно расположенного фермента. В отличие от этих видов, в органеллах этиолированных проростков ячменя 90% этого комплекса ассоциирует с димерным комплексом III_2 (Eubel et al., 2003).

Денситометрический анализ относительного содержания митохондриального нативного белка в гелях, окрашенных Кумасси (рис. 7, Б), и относительной активности комплекса I (рис. 7, В) в зонах локализации фермента позволяет предположить, что в митохондриях проростков гороха около 90% этого комплекса входит в состав суперкомплексов (приложение В). Самая высокая активность НАДН-дегидрогеназы отмечена в мажорном суперкомплексе с R_f 0,2 (43,8%) и ассоциации с R_f 0,11 (21%).

На долю первого комплекса (R_f 0,28), отдельно расположенного во внутренней митохондриальной мембране, приходится лишь 8% от общего содержания нативных белков в зонах детекции его активности (приложение В).

Детекция активности комплекса II выявила две мажорные и одну минорную темно-фиолетовые полосы (рис. 7, Г). Верхняя – соответствует самому крупному мегакомплексу с предполагаемой массой около 10000 кДа, а вторая мажорная – отдельно расположенной сукцинатдегидрогеназе с массой около 220 кДа. По-видимому, минорная полоса является результатом диссоциации двух гидрофильных субъединиц фермента SDH1 и SDH2 от гидрофобных интегральных мембранных субъединиц SDH3 и SDH4. Наши данные по молекулярной массе сукцинатдегидрогеназы гороха (R_f 0,7) согласуются с результатами других авторов (Eubel et al., 2003, 2004; Huang et al., 2010), которые также обнаружили комплекс II со сходными массами в митохондриях арабидопсиса и картофеля (приложение Б). Так, масса сукцинатдегидрогеназы в органеллах суспензионной культуры клеток арабидопсиса, клубней и стеблей картофеля колеблется по данным разных источников от 150 до 180 кДа (Eubel et al., 2003; Huang et al., 2010). Комплекс II у риса имеет массу 100 кДа (Huang et al., 2010).

Наши данные показывают, что сукцинатдегидрогеназа в ЭТЦ митохондрий проростков гороха представлена главным образом ферментом с массой 220 кДа (R_f 0,7), неассоциированным с суперкомплексами (приложение Г). Факт обнаружения комплекса II в составе самого “тяжелого” мегакомплекса (рис. 7, Г)

является интересным, т.к. считается, что этот комплекс не входит в состав суперкомплексов и имеются лишь единичные сведения о его ассоциации с другими комплексами ЭТЦ митохондрий (Acin-Perez et al., 2008; Lenaz, Genova, 2007). Так, Acin-Perez с коллегами (Acin-Perez et al., 2008) обнаружили, что в митохондриях мышей этот фермент входит в состав суперкомплексов I+II+III_2+IV и II+III_2+IV.

Выявление активности комплекса IV показало его присутствие в мегакомплексе (R_f 0,01) (так же как и комплекса II (рис. 7, Г)), в 7-и суперкомплексах (R_f 0,07–0,2 и 0,33), а также в виде монокомплексов IVa, IVb и IVc с предполагаемыми массами 480, 430 и 340 кДа соответственно (рис. 7, Д). На рисунке они имеют коричневатую окраску. Денситометрический анализ позволяет предположить, что форма IVb фермента, по-видимому, является мажорным монокомплексом в митохондриях гороха, так как в данной области с R_f 0,55 содержание и активность цитохром *c* оксидазы превышает содержание и активность других несвязанных форм фермена и составляет 18,2 и 47,1% соответсвенно (приложение В). Высокая активность цитохром *c* оксидазы обнаружена и в мегакомплексе (рис. 7, Д), включающем сукцинатдегидрогеназу (рис. 7, Г). Молекулярные массы цитохромоксидазы отличаются в разных источниках (приложение Б). Так, Jansch с коллегами (Jansch et al., 1996) в митохондриях клубней картофеля обнаружили две формы фермента с массами 230 и 160 кДа. Chen с группой авторов (Chen et al., 2012) показали, что цитохромоксидаза в органеллах дрожжей имеет массу 400 кДа. Eubel с соавторами (Eubel et al., 2003) выявили наличие двух форм IV-го комплекса, IVa и IVb, с массами 350 кДа и 270 кДа соответственно, в суспензионной культуре клеток арабидопсиса и этиолированных проростках фасоли (приложение Б). В митохондриях из клубней картофеля присутствовала только форма IVa, а в проростках ячменя – только форма IVb. Исследователи установили, что различия в массе между двумя обнаруженными формами цитохромоксидазы связаны с присутствием в комплексе IVa дополнительных субъединиц, среди которых

субъединица 32 кДа является гомологичной белку COX VIb дрожжей и млекопитающих (LaMarche et al., 1992; Weishaupt, Kadenbach, 1992). Было показано, что эта субъединица с массой 10 кДа может легко отделяться и регулировать активность цитохром *c* оксидазы. Вероятно, различия в массах, обнаруженных нами монокомплексов IV (рис. 7, Д) также могут быть связаны с наличием дополнительных и в том числе регуляторных субъединиц.

Энзимография комплекса V выявила две мономерные формы АТФ-синтазы, Va и Vb, а также димерную форму этого фермента V_2 (рис. 7, Е). Основной мажорной формой этого комплекса является форма Vb с массой 700 кДа, Va и V_2 присутствуют в минорных количествах. Рассчитанная нами масса мажорной формы АТФ-синтазы соответствует данным других исследователей (Jansch et al., 1996; Eubel et al., 2004; Dudkina et al., 2011), согласно которым масса V-го комплекса составляет 600 кДа (приложение Б). Как видно из рисунка 7 (Б и Е), относительное содержание мажорного АТФ-синтазного комплекса (R_f 0,39) в митохондриях проростков гороха превышает содержание любого из остальных нативных белков, обнаруженных после 1D BNE, и составляет 18,6% от их общего количества (приложение Г). Наши данные совпадают с данными Eubel с коллегами (Eubel et al., 2004), согласно которым в растениях, в отличие от дрожжей (Arnold et al., 1998; Schagger, 2001; Zhang et al., 2002; Eubel et al., 2004), млекопитающих (Wittig 2006) и водорослей (Rexroth et al., 2004), АТФ-синтаза солюбилизируется в основном в виде мономера. Интересно, что АТФ-синтаза из митохондрий *Chlamydomonas reinhardtii* (Rexroth et al., 2004) отличается высокой устойчивостью к действию детергентов. Она выделяется только в стабильной димерной форме V_2 даже в присутствии додецилмальтозида. Обнаруженная нами минорная форма Va имеет массу приблизительно 780 кДа и, по-видимому, отличается от Vb наличием дополнительной субъединицы (или субъединиц) с предполагаемой массой 80 кДа. Димерная АТФ-синтаза локализуется в области суперкомплекса $I+III_2+IV$, что позволяет предположить, возможную ассоциацию димера с этим суперкомплексом.

Энзимографического метода детекции активности комплекса III в голубом нативном геле BNE по нашим данным еще нет из-за отсутствия подходящего хромогена (Sabar et al., 2005).

3.2.2. Детекция митохондриальных дыхательных комплексов и АТФ-синтазы на двумерных градиентных нативных гелях 2D BNE/BNE

Энзимография дыхательных комплексов на гелях первой меры дает первое представление об организации ЭТЦ изучаемых митохондрий и позволяет выявить электрофоретические зоны, в которых локализована активность ферментов, но не дает точную информацию о составе суперкомплексов. Для более детального изучения структуры обнаруженных суперкомплексов мы использовали двумерный голубой нативный электрофорез BNE/BNE с применением додецилмальтозида во второй мере, который разбивает надмолекулярные структуры, но сохраняет индивидуальные белковые комплексы (Sunderhaus et al., 2007; Кондакова и др., 2014).

На геле после второй меры суперкомплексы распадаются на отдельные комплексы и субкомплексы, располагающиеся под основной диагональной линией разделившихся нативных белков, которые визуализируются при помощи коллоидного Кумасси (рис. 8, А слева). Детекция активности первого комплекса на второй мере BN-PAGE подтверждает данные, полученные после первой меры, и обнаруживает комплекс I в 7-и белковых пятнах (рис. 8, А справа). Шесть из них являются суперкомплексами предположительно с массами от 1700 кДа и выше, и одно пятно представляет собой отдельно расположенный в дыхательной цепи комплекс I. В зависимости от условий разделения комплекс I может частично распадаться на тяжелое мембранное плечо и легкое матриксное.

Кроме того, на геле, окрашенном Кумасси, видно, что в состав пяти обнаруженных нами суперкомплексов входит еще один комплекс с молекулярной массой около 580 кДа. Поскольку масса комплекса III в различных видах

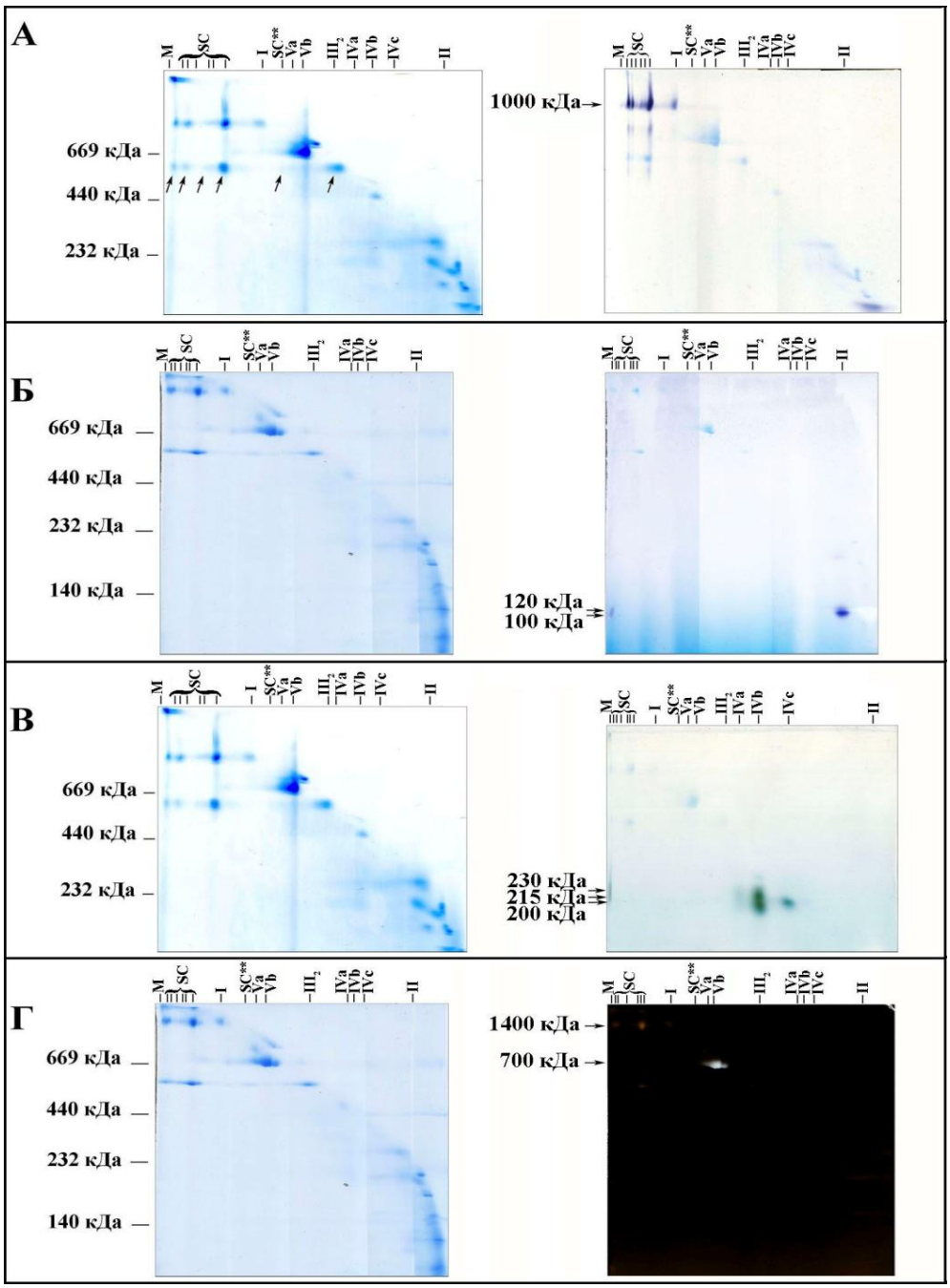


Рис. 8. Разделение и энзимография митохондриальных дыхательных комплексов гороха на двумерных гелях 2D BNE/BNE

Для разделения в первой мере использовали градиентный гель 3,5–10%, во второй – 5–18%. **А**, **Б**, **В**, **Г** – BNE/BNE-гели, окрашенные Кумасси (на всех рисунках слева), и после энзимографической детекции активности дыхательных комплексов (на всех рисунках справа): **А** – НАДН-дегидрогеназы (комплекс I); **Б** – сукцинатдегидрогеназы (комплекс II); **В** – цитохром *c* оксидазы (COX, комплекс IV) и **Г** – F_1F_O-АТФ-синтазы (комплекс V), представленный гель отсканирован в негативном режиме. Стрелками на геле, окрашенном Кумасси (**А)**, отмечен комплекс III. На гелях, окрашенных Кумасси, слева представлены молекулярные массы маркерных белков. На гелях после энзимографической детекции активности дыхательных комплексов слева представлены молекулярные массы соответствующих ферментов.

Обозначения: M – мегакомплекс $(II+III_2+IV_{1-4})_n$; SC – суперкомплекс $I+III_2+IVn$; SC** – суперкомплекс III_2+IV; III_2 – комплекс III_2; I, II, IVa, IVb, IVc, Va,Vb – как в рис. 7.

примерно одинакова и составляет 500 кДа, а наше разделение во второй мере для суперкомплексов, состоящих из комплексов I, III_2 и IV, совпадает с данными других авторов (Eubel et al., 2003, 2004; Sunderhause et al., 2007), то мы предполагаем, что на геле представлен комплекс III (рис. 8, А, обозначен черными стрелками).

Детекция активности комплекса II обнаружила два белковых пятна с массами примерно 100 и 120 кДа. Эти белки находятся как в области отдельного комплекса II, так и в области мегакомплекса, и составляют нативную форму сукцинатдегидрогеназы с массой 220 кДа (рис. 8, Б, справа).

Активность комплекса IV на второй мере BN-PAGE детектируется в составе самого тяжелого мегакомплекса, а также в выявленных на первой мере трех индивидуальных комплексах IV (рис. 7, Д), которые состоят из трех разных белков с массами 200, 215 и 230 кДа (рис. 8, В, справа). Причем комплексы IVa и IVb имеют схожий состав и включают субкомплексы 200 и 230 кДа (рис. 8, В, справа). Учитывая то, что массы комплексов IVa и IVb составляют 480 и 430 кДа соответственно (рис. 7, Д), а эти формы фермента состоят из двух одинаковых субкомплексов, можно предположить, что комплекс IVa имеет дополнительную субъединицу массой 50 кДа. Эта субъединица, вероятно, так же как и субъединица COX VIb, обнаруженная у дрожжей и млекопитающих (LaMarche et al., 1992; Weishaupt, Kadenbach, 1992), может легко отделяться и выполнять регуляторную функцию. Комплекс IVc представлен только одним белком 215 кДа (рис. 8, В справа) и, следовательно, отличается по составу от двух предыдущих комплексов. Масса нативной формы IVc составляет 340 кДа (рис. 7, Д). Вероятно, второй белок этого комплекса не детектируется энзимографически.

Пятый комплекс визуализируется одним пятном в области 700 кДа и дополнительно его активность наблюдается в области димерной АТФ-синтазы (рис. 8, Г, справа).

В целом данные разделения и энзимографии дыхательных комплексов во второй нативной мере с использованием додецилмальтозида подтвердили и

дополнили результаты, полученные на первой нативной мере (Кондакова и др., 2014). Оказалось, что самой стабильной при действии додецилмальтозида является мономерная форма АТФ-синтазы, в то время как сукцинатдегидрогеназа и цитохромоксидаза распадаются на субкомплексы. Также удалось детектировать, что две формы цитохромоксидазы IVa и IVb имеют одинаковый состав и отличаются лишь одной субъединицей с массой 50 кДа, которая предположительно имеет регуляторную функцию. Форма IVc отличается по составу от IVa и IVb. Кроме того, при разделении во второй мере удалось обнаружить предполагаемый комплекс III, который не детектируется колориметрически (рис. 8, А, слева).

3.2.3. Анализ субъединичного состава суперкомплексов и комплексов системы окислительного фофорилирования митохондрий проростков гороха при помощи иммунохимии и масс-спектрометрии двумерных гелей 2D BNE/SDS

Дальнейшее более детальное изучение субъединичного состава суперкомплексов и отдельных комплексов системы OXPHOS, а также олигомерных митохондриальных белков на двумерных гелях с денатурирующей второй мерой позволило определить окончательный состав надмолекулярных структур и показать новые особенности организации ЭТЦ митохондрий проростков гороха, недетектируемые ранее используемыми методами 1D BNE и 2D BNE/BNE. Поскольку полной информации по всему протеому гороха в базе данных NCBI на сегодняшний день нет, то для более точной идентификации белков времяпролетную масс-спектрометрию (MALDI-TOF) дополняли иммунохимическим анализом с имеющимися антителами на субъединицы комплексов и альтернативные ферменты дыхательной цепи растительных митохондрий, а также на некоторые ферменты цикла Кребса. На данный момент при помощи масс-спектрометрического метода удалось проанализировать часть

белковых пятен (табл. 3), остальные данные получены при помощи иммунохимического анализа (рис. 9).

В результате сочетания этих двух методов удалось идентифицировать 45 белковых пятен из видимых 136 (рис. 10). Эта информация открывает новые детали и дает дополнительные, неизвестные ранее сведения о нативной организации системы OXPHOS в митохондриях проростков гороха.

Детекцию комплекса I на гелях 2D BNE/SDS проводили иммунохимическим методом, используя антитела на субъединицу этого фермента с массой 51 кДа. Эта субъединица входит в НАДН-окисляющий модуль матриксного домена комплекса I, включает флавинмононуклеотид (ФМН) и сайт окисления НАДН, и представляет собой точку входа электронов в комплекс I (Klodmann, Braun, 2011). Иммуноблоттинг показал наличие трех окрашенных отчетливых белковых пятен – продуктов иммунохимической реакции антиген-антитело (рис. 9, комплекс I). Два из них соответствуют предполагаемым мажорным суперкомплексам $I+III_2+IV$ и $I+III_2+IV_n$, а одно менее яркое пятно представляет собой отдельный комплекс I. Окраска между двумя мажорными суперкомплексами охватывает остальные минорные суперкомплексы и является результатом реакции антител с субъединицей комплекса I в ассоциациях дыхательных ферментов с предполагаемым составом $I+III_2+IV_n$ (рис. 9, комплекс I), содержание которых значительно меньше обнаруженных мажорных ассоциаций, что согласуется с данными энзимографии (рис. 7, В).

Антитела на субъединицу SDH1–1 комплекса II выявили 4 белковых пятна с массой 70 кДа (рис. 9, комплекс II). Значение массы приближается к данным Peters с коллегами (Peters et al., 2012), которые на иммуноблоттах после обычного SDS-PAGE в митохондриях культуры клеток арабидопсиса детектировали SDH1–1 с массой 66 кДа. Как видно из рисунка 9 (комплекс II), среди четырех обнаруженных белковых зон выделяется мажорное пятно, соответствующее основной форме комплекса II, и два пятна поменьше, расположенные справа. Последние, судя по отсутствию или слабой активности сукцинатдегидрогеназы в

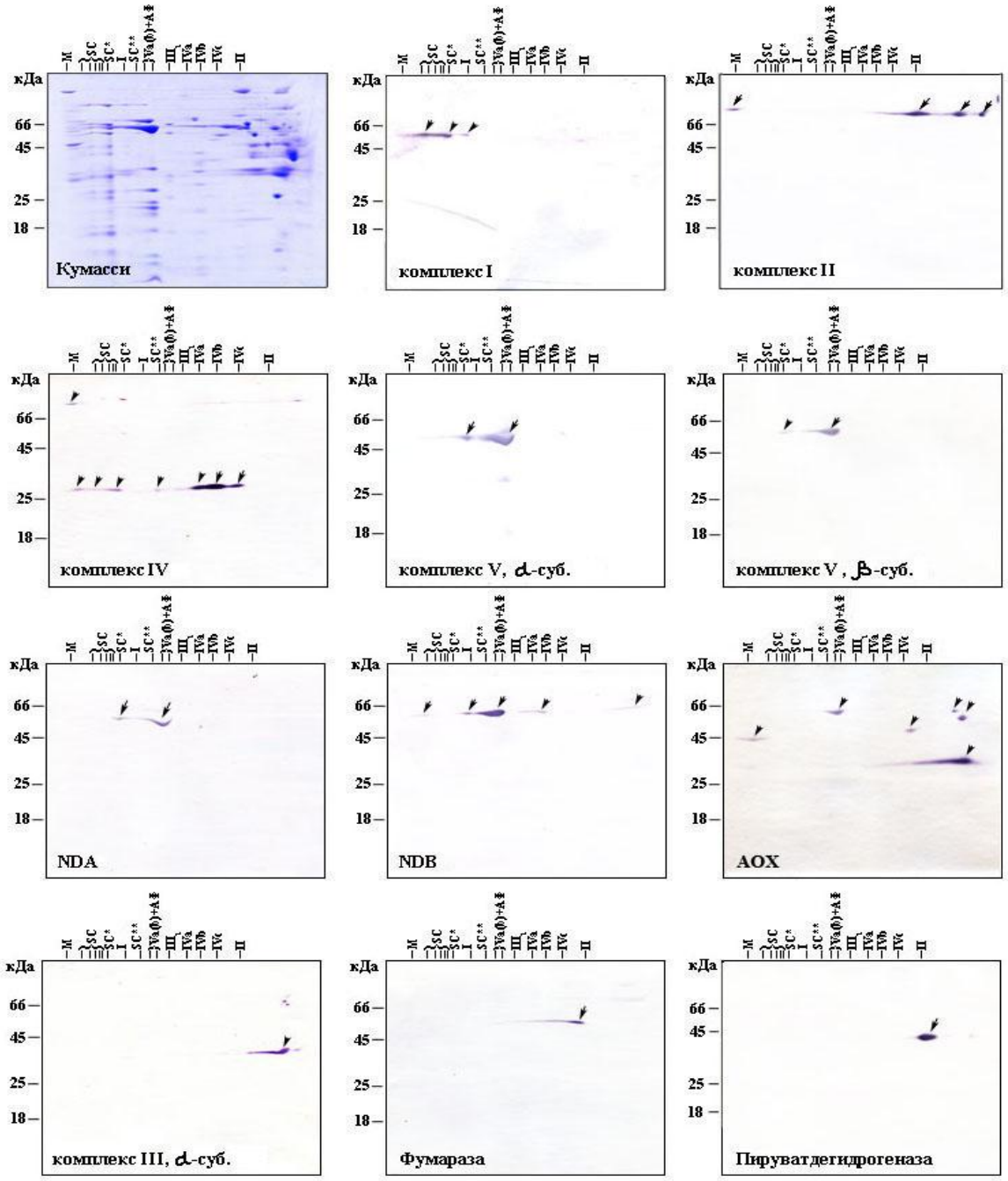


Рис. 9. Иммунохимическая детекция субъединиц дыхательных комплексов, а также альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, AOX и некоторых ферментов цикла Кребса – фумаразы и пируватдегидрогеназы

На рисунке приведён гель 2D BNE/SDS, окрашенный Кумасси, и иммуноблоттинги с антителами на: комплекс I – субъединицу 51 кДа; комплекс II – субъединицу SDH1–1; комплекс III – α-субъединицу MPP; комплекс IV – субъединицу COXII; комплекс V – α- и β-субъединицы компонента F_1; NDA и NDB – внутреннюю и внешнюю ротенон-резистентные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы соответственно; AOX – альтернативную оксидазу; фумаразу; пируватдегидрогеназу – E1-α-субъединицу пируватдегидрогеназного комплекса. Градиентный гель 1D плотностью 3,5–16%, а гель 2D – 10%. На геле, окрашенном Кумасси, и на мембранах слева указаны молекулярные массы маркерных белков.

Обозначения: SC* – суперкомплекс I+NDA+III_2+IV; SC** – суперкомплекс NDA+NDB+III_2+IV; Va(b)+АФ – суперкомплекс Va(b)+NDA+NDB+AOX; M, SC, III_2 – как в рис. 8; I, II, IVa, IVb, IVc, Va,Vb – как в рис. 7.

этих зонах на 1D BNE и 2D BNE/BNE гелях, по-видимому, представляют собой не целый фермент, а диссоциировавшие субъединицы SDH1–1. Небольшое количество SDH1–1 в верхней левой части иммуноблотта (рис. 9, комплекс II) совпадает с зоной активности фермента в мегакомплексе (рис. 7, Г).

Иммуноблоттинг с анителами на субъединицу COXII комплекса IV показал, что субъединица имеет массу 30 кДа и визуализируется практически во всех детектируемых ранее (рис. 7, Д) зонах активности фермента с мажорным пятном, соответствующим основной форме цитохромоксидазы – IVb. Интересно, что помимо мономерной формы в верхней части иммуноблотта обнаруживается еще и тримерная форма COXII с видимой массой 90 кДа, в том числе и в "тяжелом" мегакомплексе (рис. 9, комплекс IV).

Иммунохимическая детекция АТФ-синтазного комплекса выявила наличие α- и β-субъединиц компонента F_1 с массами 55 и 60 кДа соответственно в области мономера АТФ-синтазы и в области ее димера, находящегося в районе предполагаемого суперкомплекса $I+III_2+IV$ (рис. 9, V-ый комплекс, α- и β-субъединицы). Результаты иммунохимии согласуются с данными масс-спектрометрического анализа соответствующих белковых пятен. Масс-спектры этих белков показали высокий SCOR (степень совпадения), полученный на основании базы данных NCBI, с масс-спектрами α-субъединицы АТФ-синтазы из *Pisum sativum* и β-субъединицы этого фермента из *Medicago trancatula* (табл. 3; рис. 10, пятна 5 и 6 соответственно). Интересно расположение этих субъединиц на иммуноблоте – они составляют две половинки одного пятна и β-субъединица "укладывается" сверху в α-субъединицу (рис. 9, комплекс V, α-субъединица и β-субъединица).

Детекцию комплекса III проводили при помощи масс-спектрометрического и иммунохимического анализов. Масс-спектрометрический анализ позволил обнаружить α- и β-субъединицы митохондриальной процессинговой пептидазы (MPP) в зонах предполагаемой локализации комплекса III, выявленных ранее на 2D BNE/BNE (рис. 8, А, Кумасси).

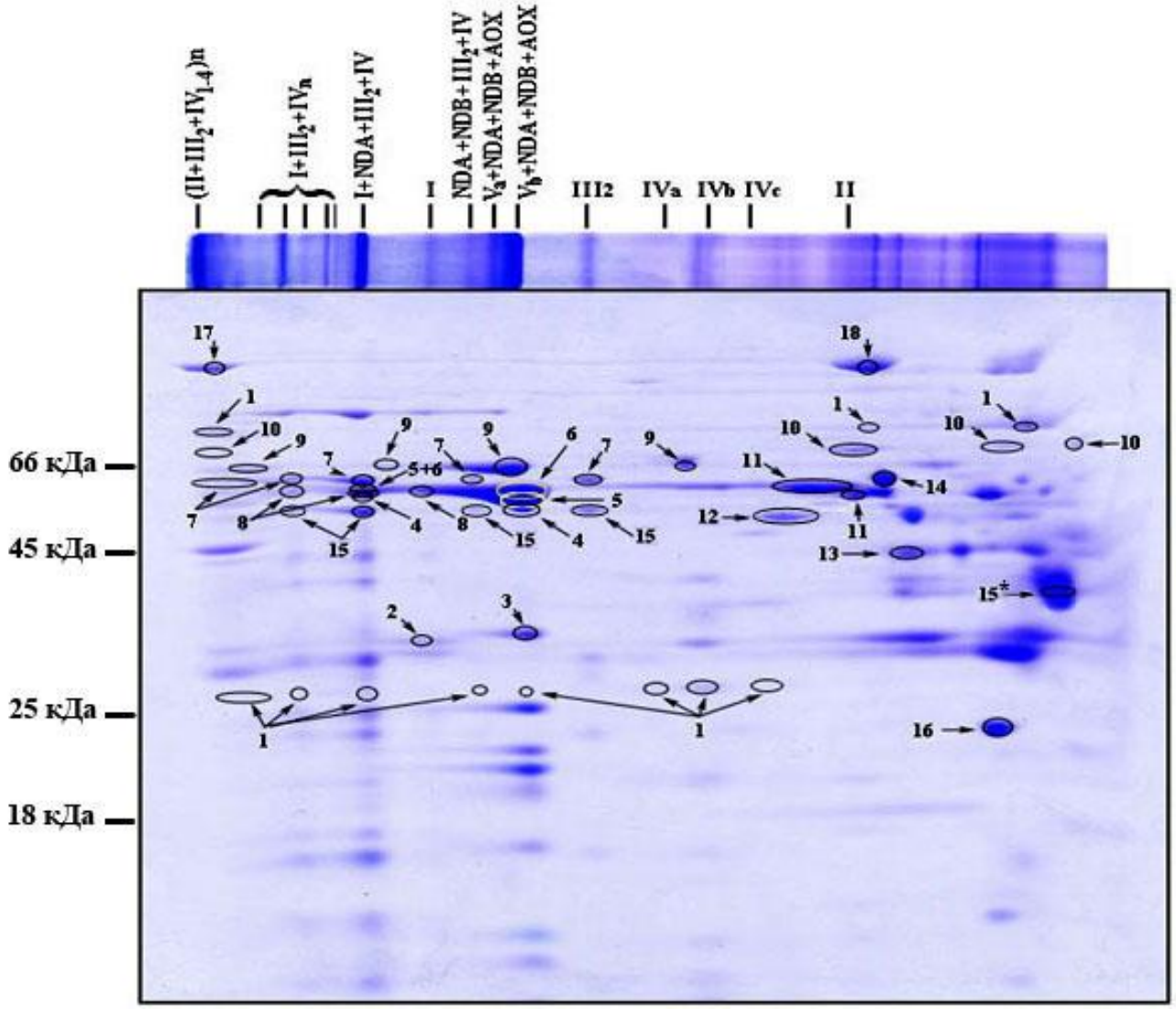


Рис. 10. Двумерное разделение митохондриальных белковых комплексов и суперкомплексов (комплексома) проростков гороха при помощи 2D BNE/SDS (двумерный голубой нативный форез со второй мерой SDS-PAGE)

Цифры обозначают белковые субъединицы, идентифицированные при помощи иммунохимии или масс-спектрометрического анализа MALDI. Обозначения приведены в таблице 3. На треке 1D BNE (сверху) отмечено расположение дыхательных комплексов и состав суперкомплексов ЭТЦ митохондрий проростков гороха. Градиентный гель первой меры имел плотность 3,5–16%, а для разделения во второй денатурирующей мере использовали 10%-ый ПААГ. Обозначения как на рис. 9.

Таблица 3

Идентификация белковых пятен на 2D BNE/SDS-гелях

пятно	Идентифицированный белок	Мол. масса, кДа	Метод идентификации
1	COXII – субъединица II цитохром *c* оксидазы	30	Иммунохимия, рис. 9
2	Прохибитин 1	32	MALDI (gi 35747434, SCOR 75, *Medicago trancatula*)
3	Альтернативная оксидаза – AOX	36	Иммунохимия, рис. 9
4	Внутренняя ротенон-резистентная НАДН-дегидрогеназа – NDA	50	Иммунохимия, рис. 9
5	α-субъединица компонента F_1 АТФ-синтазного комплекса	55	Иммунохимия, рис. 9; MALDI (gi 357982, SCOR 358, *Pisum sativum*)
6	β-субъединица компонента F_1 АТФ-синтазного комплекса	60	Иммунохимия, рис. 9; MALDI (gi 357982, SCOR 88, *Medicago trancatula*)
7	β-субъединица митохондриальной процессинговой пептидазы MPP (субъединица комплекса III ЭТЦ)	60	MALDI (gi 502103363, SCOR 144, *Cicer arietinum*)
8	Субъединица 51 кДа комплекса I	51	Иммунохимия, рис. 9
9	Внешняя ротенон-резистентная НАД(Ф)Н-дегидрогеназа – NDB	60	Иммунохимия, рис. 9
10	Субъединица сукцинатдегидрогеназы SDH1-1	70	Иммунохимия, рис. 9
11	Дегидрино-подобные белки	56	Иммунохимия, данные не представлены
12	Фумараза	51	Иммунохимия, рис. 9
13	E1-α-субъединица пируватдегидрогеназного комплекса	43	Иммунохимия, рис. 9
14	Δ-1-пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназа	61	MALDI (gi 357477461, SCOR 116, *Cicer arietinum* и *Medicago trancatula*)
15	α-субъединица митохондриальной процессинговой пептидазы MPP (субъединица комплекса III ЭТЦ)	55	MALDI (gi 502138725, SCOR 107, *Cicer arietinum*)
15*	α-субъединица митохондриальной процессинговой пептидазы MPP (субъединица комплекса III ЭТЦ)	40	Иммунохимия, рис. 9
16	Митохондриальная супероксиддисмутаза $СОД_2$	26	MALDI (gi 20902, SCOR 81, *Pisum sativum*)
17	E1-субъединица 2-оксоглутарат-дегидрогеназного комплекса	116	MALDI (gi 922339111, SCOR 401, *Medicago trancatula*)
18	Глициндегидрогеназа (декарбоксилирующая)	115	MALDI (gi 121083, SCOR 285, *Pisum sativum*)

Известно, что МРР растений, в отличие от локализованного в матриксе фермента млекопитающих и дрожжей, полностью интегрирована в цитохром-bc_1-комплекс и состоит из двух субъединиц – α и β (Glaser, Whelan, 2007). Интересно, что в *Neurospora crassa* α-МРР и β-МРРпредставлены в матриксе как индивидуальные белки, однако основная часть β-МРР ассоциирована с цитохром-bc_1-комплексом и идентична так называемому коровому белку I этого фермента (Schulte et al., 1989; Glaser, Whelan, 2007). Предполагается, что β-МРР распознает сайты отщепления пресиквенса, а α-МРР обладает основной каталитической активностью. Масс-спектры пятен 15 и 7 совпали со спектрами α- и β-субъединиц МРР нута (*Cicer arietinum*) на 41 и 47% соответственно (табл. 3). Массы этих субъединиц у нута соответствуют молекулярным массам белков на геле и составляют приблизительно 55 и 60 кДа соответственно (рис. 10). Обнаруженные субъединицы детектируются в зонах предполагаемой локализации комплекса III, выявленных ранее на 2D BNE/BNE (рис. 8, А, слева). Эти данные с высокой степенью вероятности позволяют предположить, что полипептиды 15 и 7 представляют собой α- и β-субъединицы МРР проростков гороха.

В отличие от масс-спектрометрии иммунохимическая детекция комплекса III при помощи антител на α-субъединицу МРР показала выраженную иммунохимическую реакцию антител с белком массой 40 кДа, расположенным в правой части иммуноблота (рис. 9, комплекс III). Это позволяет предположить отщепление части белка либо в процессе солюбилизации мембранных белков дигитонином, либо под действием Кумасси в ходе разделения белков на первой мере 1D BNE.

Таким образом, идентификация α- и β-МРР позволила определить расположение как отдельного комплекса III_2, так и окончательно определить состав суперкомплексов I+III_2+IV и III_2+IV (рис. 10).

Иммунохимическая детекция альтернативных ферментов обнаружила ротенон-резистентные внутренние (NDA) и внешние (NDB) НАД(Ф)Н-дегидрогеназы с массами 50 и 60 кДа соответственно, а также мономерные и

димерные формы альтернативной оксидазы с массами от 33 до 66 кДа (рис. 9, NDA, NDB и AOX). Такое разнообразие AOX, вероятно, связано с тем, что используемые антитела (Agrisera) реагируют с различными изоформами AOX, включая AOX1A, AOX1B, AOX1C, AOX1D и AOX2, и указывает на наличие нескольких изоформ митохондриальной AOX у гороха. Как показали результаты иммуноблоттинга, AOX в митохондриальной мембране присутствует в основном в несвязанной с суперкомплексами форме, что согласуется с данными Eubel с соавторами (Eubel et al., 2003). Однако небольшое количество фермента локализовано в области АТФ-синтазы и в районе между мегакомплексом и суперкомплексами, что позволяет предположить ассоциацию AOX по крайней мере с комплексом V системы OXPHOS.

Иммунохимический анализ выявил также окрашенные отчетливые продукты иммунохимической реакции альтернативных ротенон-резистентных внутренних (NDA) и внешних (NDB) НАД(Ф)Н-дегидрогеназ с соответствующими антителами в области комплекса V и суперкомплекса III_2+IV (рис. 9), что дает возможность предположить их ассоциацию с этими компонентами системы OXPHOS. Причем основная часть NDA и NDB, по-видимому, находится в ассоциациях с суперкомплексами. Результаты показывают более широкое распространение NDB на иммуноблотах, обнаруживая этот белок в электрофоретических зонах с массами 140, 450, 700, 1700 кДа и выше как в ассоциациях с АТФ-синтазой и суперкомплексом III_2+IV, так и в свободной форме (рис. 9, NDB). NDA в митохондриях проростков гороха локализуется в области АТФ-синтазного комплекса (700-780 кДа) и суперкомплексов I+III_2+IV и III_2+IV, что предполагает ассоциацию фермента с этими структурами (рис. 9, NDA). Ранее Rasmusson и Agius (Rasmusson, Agius, 2001) при помощи двумерного электрофореза 2D BNE/SDS мембранных митохондриальных белков из клубней картофеля показали, что NDA на иммуноблотах локализуется в области 150–200 кДа, а NDB показывает более широкое распространение и выявляется в нескольких пятнах с массами 180, 500, 600 и 700 кДа. Причем NDB представлен

главным образом белками с массами 500–700 кДа, а белок 180 кДа содержится в небольшом количестве. Авторы предположили, что эти ферменты в нативных условиях имеют олигомерную природу, формируя крупные структуры, включающие от 3–4 (в случае с NDA и NDB) до 12 (NDB) субъединиц. Принимая во внимание тот факт, что Rasmusson и Agius (Rasmusson, Agius, 2001) не учитывали и не изучали организацию суперкомплексов и других мембранных ферментов и возможную ассоциацию NDA и NDB с этими структурами, можно предположить, что массы этих ферментов, определенные авторами, не всегда отражают реальную нативную массу белков, а могут являться результатом их прочной ассоциации с такими структурами, как АТФ-синтаза и суперкомплексы. Факт обнаружения нами ассоциаций NDA, NDB и AOX с АТФ-синтазой, NDA с суперкомплексом I+III_2+IV, а также NDA и NDB с суперкомплексом III_2+IV является новой информацией (Кондакова и др., 2016б), т.к. ранее считалось, что эти альтернативные ферменты не входят в состав дыхательных надмолекулярных структур (Eubel et al., 2003; Klodmann et al., 2011; Welchen et al., 2011). Так, Eubel с коллегами (Eubel et al., 2003) не нашли альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы и AOX в составе суперкомплексов. Однако в последнее время начали появляться единичные данные об ассоциации некоторых альтернативных ферментов с дыхательными комплексами. Так, Matus-Ortega с коллегами (Matus-Ortega et al., 2015) в митохондриях *Saccharomyces cerevisiae*, в которых, как известно, отсутствует первый комплекс дыхательной цепи, показали ассоциацию внутренней альтернативной НАД(Ф)Н-дегидрогеназы Ndi1 с комплексами III_2 и IV, предположив, что эти ферменты образуют респирасомо-подобную структуру. Более того, они установили, что Ndi1 образует также комплекс с АДФ/АТФ-транслокатором и переносчиком фосфата.

Помимо альтернативных и основных дыхательных ферментов ЭТЦ, при помощи иммунохимии или MALDI-анализа были идентифицированы такие белки, как фумараза, пируватдегидрогеназа, оксоглутаратдегидрогеназа, глициндегидрогеназа, которые, судя по выявленной локализации, не ассоциируют

с суперкомплексами (рис. 9, фумараза и пируватдегидрогеназа; рис. 10, пятна 17, 18 соответственно). Кроме того, при помощи антител на К-сегмент дегидринов были обнаружены дегидрино-подобные белки в области 220-340 кДа (рис. 10, таблица 3, пятно 11). MALDI-анализ выявил в составе комплекса I прохибитин-подобный белок, гомологичный прохибитину из *Medicago trancatula* (рис. 10, таблица 3, пятно 2). Эти белки, как было показано на митохондриях млекопитающих, могут выступать в качестве шаперонов ферментов дыхательной цепи (Mishra et al., 2005), участвовать в регуляции дыхательной активности (Coates et al., 2001), в формировании крист (Merkwirth, Langer, 2009), а также защищать клетку от окислительного стресса (Theiss, Sitaraman, 2011). Вероятно, этот белок является важным фактором, стабилизирующим структуру как отдельно первого комплекса, так и в составе суперкомплексов.

Данные, полученные при помощи энзимографии (рис. 7, рис. 8), иммунохимии (рис. 9) и MALDI-анализа (рис. 10) позволяют предположить, что дыхательная цепь митохондрий этиолированных проростков гороха в нативном состоянии представлена мажорным суперкомплексом I+NDA+III_2+IV с предполагаемой молекулярной массой более 1700–1900 кДа; пятью респирасомами, включающими разное количество копий комплекса IV (I+III_2+IV_n); суперкомплексом NDA+NDB+III_2+IV; мегакомплексом (II+III_2+IV)$_n$ с предполагаемой молекулярной массой около 10000 кДа; а также двумя АТФ-синтасомами – Va и Vb, ассоциированными с альтернативными ферментами (Кондакова и др., 2014, 2016б). Содержание мажорной АТФ-синтасомы Vb превышает содержание всех остальных суперкомплексов и составляет 36,3% от их количества (приложение Д). Ассоциация альтернативных ферментов с суперкомплексами, а также наличие сукцинатдегидрогеназы в составе мегакомплекса в растительных митохондриях показаны впервые. Наши результаты обнаружили, что основная часть внутренних и внешних альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, детектируемых используемыми антителами, ассоциирует с суперкомплексами системы OXPHOS, а

альтернативная оксидаза в основном находится в свободной несвязанной форме. Кроме обнаруженных суперкомплексов, все дыхательные ферменты присутствуют и в виде отдельных комплексов, причём комплекс IV имеет три формы – IVa, IVb и IVc. Комплексы IVa и IVb имеют схожий состав и отличаются дополнительной субъединицей массой 50 кДа, которая, предположительно, может легко отделяться и выполнять регуляторную функцию.

Эти результаты существенно дополняют и расширяют данные Taylor с коллегами (Taylor et al., 2005) об организации ЭТЦ зеленых растений гороха, полученные при помощи более жесткого детергента додецилмальтозида, что позволило авторам обнаружить лишь самый устойчивый суперкомплекс – $I+III_2$. Все остальные комплексы по их данным располагаются отдельно и не образуют ассоциаций.

3.3. ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СОСТАВ, СОДЕРЖАНИЕ И АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

На сегодняшний день существует немного работ по изучению влияния факторов среды на состав и активность суперкомплексов системы OXPHOS митохондрий. В основном полученные данные предполагают, что в растительных митохондриях в условиях гипоксии и аноксии происходит снижение содержания суперкомплексов, которое восстанавливается до нормы после возвращения в оптимальные условия. Так, Ramirez-Aguilar с соавторами (Ramirez-Aguilar et al., 2011) показали, что при гипоксии и низком значении pH количество ассоциаций дыхательных комплексов и респирасом в митохондриях клубней картофеля существенно снижается, происходит диссоциация комплекса I из состава суперкомплексов с последующим увеличением содержания и активности более мелкого суперкомплекса III_2+IV. Эти изменения носят обратимый характер, и состав суперкомплексов восстанавливается после возвращения клубней в оптимальные условия хранения. Кроме того, авторы предполагают, что выход

комплекса I из состава суперкомплексов может являться регуляторным механизмом вовлечения альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, которые, как известно, активируются низкими значениями pH. Другие исследования по влиянию аноксии на содержание суперкомплексов в митохондриях проростков риса показали, что при прорастании семян риса в анаэробных условиях в органеллах отмечалось крайне низкое содержание суперкомплекса III_2+IV и других дыхательных комплексов (Millar et al., 2004b). Однако при изменении условий уже к концу первых суток роста в аэрируемых условиях наблюдалось резкое и активное увеличение содержания суперкомплексов и дыхательных ферментов. Это указывает на зависимость биогенеза митохондриальных дыхательных ферментов и их ассоциаций от наличия кислорода в среде роста. Кроме информации по влиянию некоторых стрессовых факторов на состав ЭТЦ митохондрий, есть также единичные данные Chien с соавторами (Chien et al., 2011), сравнивающие организацию системы OXPHOS митохондрий двух видов бамбука, обладающих различной способностью адаптироваться к холоду. Согласно результатам этих исследователей зимостойкий вид бамбука характеризуется большим содержанием суперкомплексов, включающих первый и пятый комплексы. Таким образом, представленные факты предполагают, что надмолекулярная организация системы окислительного фосфорилирования необходима для эффективного и экономного дыхания митохондрий в нормальных условиях развития, которая претерпевает изменения в неблагоприятных условиях и восстанавливается после возвращения в оптимальные. Однако для подтверждения и дополнения этого предположения необходимо больше информации о состоянии системы OXPHOS митохондрий разных видов при более широком спектре стрессовых воздействий, различающихся по интенсивности и продолжительности.

Поскольку по нашим сведениям информации по влиянию закаливающих и стрессовых низких температур на состав сложноорганизованной системы OXPHOS митохондрий пока нет, мы предприняли попытку изучить влияние на

нее гипотермии различной интенсивности, используя в качестве модельного объекта органеллы этиолированных проростков гороха. На основании данных, продемонстрировавших функциональные изменения митохондрий при гипотермии (табл. 2), можно предположить, что в условиях холодовой адаптации, а также при стрессовых воздействиях низких положительных и отрицательных температур могут происходить изменения и в надмолекулярной организации системы окислительного фосфорилирования митохондрий.

3.3.1. Оценка физиологического состояния растений в изучаемых условиях гипотермии

Прежде чем перейти к изучению влияния гипотермии на организацию дыхательной цепи митохондрий, необходимо было выяснить, как меняется общее физиологическое состояние этиолированных проростков гороха после холодового закаливания и действия стрессовых отрицательных и низких положительных температур. Оценка физиологического состояния растений проводилась по основным показателям: выживаемости (табл. 4) и степени развития окислительного стресса (табл. 5) в изучаемых условиях гипотермии.

Таблица 4

Выживаемость этиолированных проростков гороха после различных низкотемпературных обработок

Выживаемость, %			
Контроль	**Жесткий стресс**	**Закаливание**	**Мягкий стресс**
74 [73;74]	32 [29;34]	94 [90;100]	60 [54; 70]

Примечание: Выживаемость рассчитывалась как процент выживших после промораживания при минус 7 °С в течение 1,5 ч растений от их общего количества. Температурные обработки: контроль – 6 суток при 20 °С; закаливание – 5 суток при 20 °С и 7 суток при 7 °С; мягкий стресс – 6 суток при 20 °С и 7 суток при 2 °С; жесткий стресс – 6 суток при 20 °С и 1,5 часа при минус 7 °С. Me [25%; 75%], n=5. Различия между всеми обработками статистически значимы ($P \leq 0,05$). Статистическую значимость различий определяли по критерию Краскела-Уоллиса.

Как видно из таблицы 4, промораживание контрольных растений приводило к гибели в среднем 26% проростков гороха (табл. 4). Закаливание увеличило устойчивость растений, и количество выживших растений возрастало с 74% (в контроле) до 94% (в опытном варианте). В то же время мягкий и жесткий стрессы существенно снижали количество выживших растений: мягкий стресс – до 60%, жесткий стресс – до 32%.

Как известно, центральным фактором многих абиотических стрессов, в том числе и низкотемпературного, является окислительный стресс, который сопровождается всплеском продукции АФК. Одной из причин развития окислительного стресса при действии низких температур может служить снижение скорости биохимических реакций, что способствует увеличению времени полужизни полувосстановленных продуктов реакций и накоплению свободных радикалов. В результате может возникнуть серьезный дисбаланс между образованием АФК, возможностью их ликвидации и скоростью репарационных процессов, что обычно приводит к накоплению повреждений в клетке (Полесская, 2007). Одним из часто используемых методов при оценке степени окислительных повреждений является измерение накопления в растительных тканях малонового диальдегида. Это соединение является вторичным конечным продуктом перекисного окисления фосфолипидов мембран, провоцируемого АФК, и служит маркером ПОЛ. Уровень ПОЛ оценивали по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), основную массу которых и составляет малоновый диальдегид (МДА). Помимо МДА тиобарбитуровая кислота может частично реагировать с различными альдегидами, аминокислотами, веществами, содержащими SH-, NH_2-группы, поэтому при использовании данного метода говорят об изменении концентрации не МДА, а ТБК-реактивных продуктов и МДА-подобных соединений.

Результаты исследований показали, что содержание ТБК-реактивных продуктов в закаленных проростках гороха превышало контроль в среднем на 8,5% и составило 15,3 нмоль/г сырой массы (табл. 5). В то же время жесткий и

мягкий стрессы приводили к более значительному накоплению и увеличению содержания этих продуктов в среднем на 30%, что составило 18,4 и 18,3 нмоль/г сырой массы соответственно (табл. 5).

Данные позволяют предположить, что стрессовые отрицательные и низкие положительные температуры приводят к более активному развитию окислительного стресса и увеличению продуктов окисления мембран (табл. 5).

Таблица 5

Содержание ТБК-реактивных продуктов в этиолированных проростках гороха после различных низкотемпературных обработок

ТБК-реактивные продукты, нмоль/г сырой массы			
Контроль	**Жесткий стресс**	**Закаливание**	**Мягкий стресс**
14,1 [а, б, в] [12,9; 15,3]	18,4 [а, г] [16,6; 21,4]	15,3 [в, г, д] [14,1; 16,1]	18,3 [б, д] [16,6; 20,0]

Примечание: содержание ТБК-реактивных продуктов рассчитывалось в нмоль/г сырой массы. Температурные обработки как в табл. 4. Me [25%; 75%], n=4, **[а, б, в, г, д]** – различия между контролем и жестким стрессом (**[а]**), контролем и мягким стрессом (**[б]**), контролем и закаливанием (**[в]**), жестким стрессом и закаливанием (**[г]**), мягким стрессом и закаливанием (**[д]**) статистически значимы ($P \leq 0,05$). Статистическую значимость различий определяли по критерию Краскела-Уоллиса.

При закаливании содержание продуктов ПОЛ увеличивается не так сильно как при стрессах (табл. 5), что, вероятно, говорит о контролируемом процессе адаптивной перестройки метаболизма в данных условиях. Наши результаты подтверждаются данными других исследователей, которые показали, что при замерзании тканей корней рододендрона происходит накопление перекиси водорода и малонового диальдегида (Loubaresse et al., 1991), а акклиматизация злаков к низким температурам роста стимулирует накопление липидорастворимых антиоксидантов, эффективно удаляющих активированный кислород и ингибирующих реакции перекисного окисления липидов (Kendall, McKersie, 1989).

Таким образом, представленные данные подтверждают правильность выбранной закаливающей обработки для проростков гороха и предполагают, что при холодовом закаливании происходит адаптивная настройка метаболизма и в первую очередь всей сложноорганизованной внутриклеточной антиоксидантной

системы защиты, направленная на устранение повреждений, вызванных низкой температурой, а также на индукцию холодостойкости. Интересно, что жесткий стресс сильнее, чем мягкий снижает выживаемость проростков, но не приводит к соответствующему более высокому росту ТБК-реактивных продуктов. Это, вероятно, связано как с чувствительностью метода, так и с тем, что анализируется содержание только малонового диальдегида, а не оценивается дополнительно еще и другой продукт перекисного окисления липидов – 4-гидроксиноненал. Кроме того, не изучается общее содержание АФК, которое при действии отрицательной температуры может быть существенно выше, чем в условиях стрессовой низкой положительной температуры. Тем не менее, данные (табл. 5) ясно показывают, что стрессовые низкотемпературные обработки существенно снижают устойчивость растений, вызывая накопление гидроперекисей липидов и, как следствие, увеличение повреждений клеточных мембран.

3.3.2. Влияние гипотермии различной интенсивности на состав суперкомплексов, комплексов системы окислительного фосфорилирования в митохондриях проростков гороха

При помощи одномерного голубого нативного электрофореза с последующим денситомерическим анализом гелей и двумерного голубого нативного электрофореза со второй мерой SDS было изучено влияние холодовой адаптации, стрессовых отрицательных и низких положительных температур на состав и содержание суперкомплексов и комплексов системы OXPHOS митохондрий, а также других нативных митохондриальных белков проростков гороха.

Результаты исследований показали, что гипотермия различной интенсивности существенно не повлияла на спектр митохондриального комплексома, но вызвала изменения в содержании некоторых суперкомплексов и комплексов дыхательной цепи (рис. 11 и 12, табл. 6). Как видно из рисунка 11, и как следует из данных таблицы 6, все низкотемпературные обработки приводили

к снижению количества суперкомплексов $I+III_2+IV_n$ (рис. 11, табл. 6, полосы 2–6), $I+NDA+III_2+IV$ (рис. 11, табл. 6, полоса 7), Va+NDA+NDB+AOX (рис. 11, табл. 6, полоса 9) и Vb+NDA+NDB+AOX (рис. 11, табл. 6, полоса 10). Интересно, что содержание мегакомплекса $(II+III_2+IV_{1-4})_n$ снижалось в среднем на 19% только в условиях жесткого стресса (рис. 11, Ж, табл. 6, полоса 1), а при закаливании, наоборот, происходило его увеличение в среднем на 16,2%, в условиях мягкого стресса существенных изменений в его содержании не обнаружено (рис. 11, треки З и М; табл. 6, полоса 1).

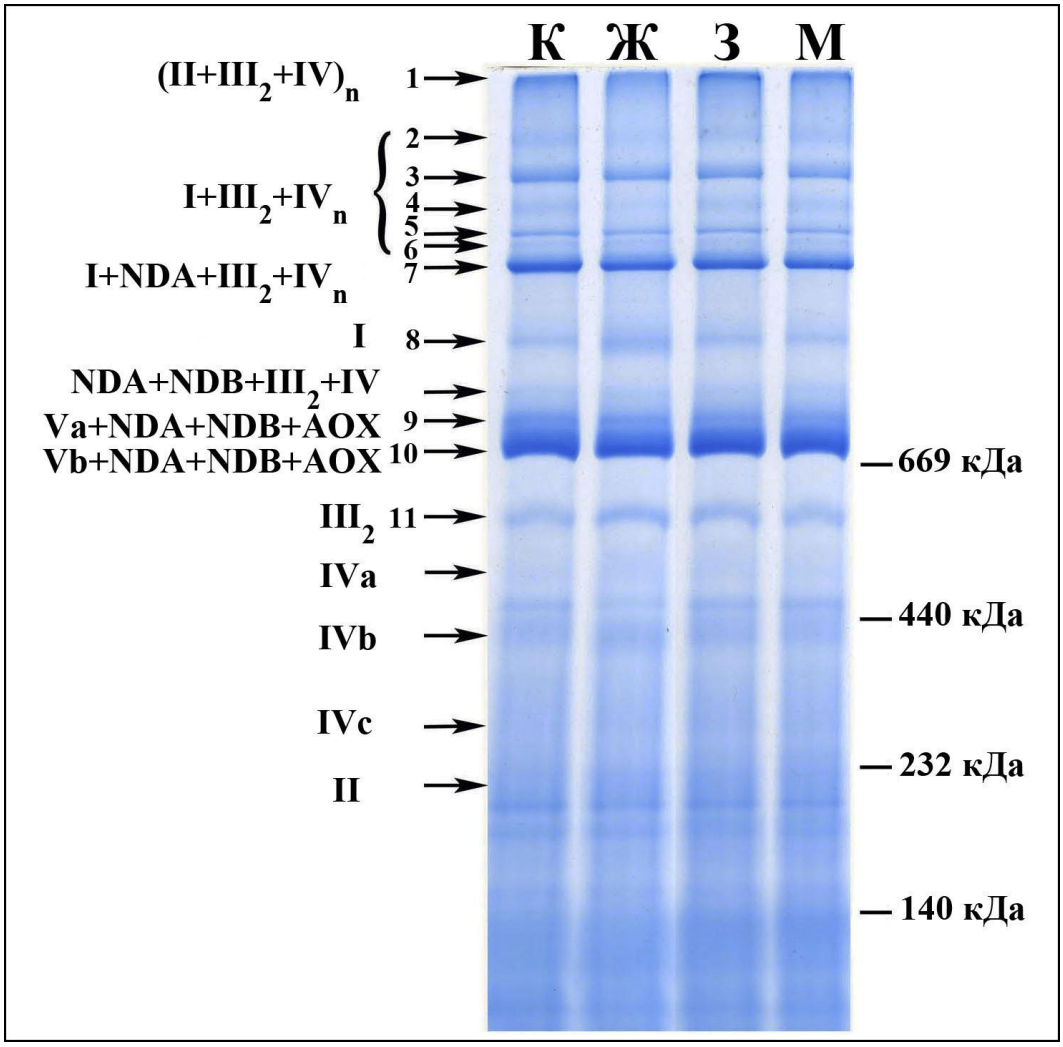


Рис. 11. Влияние гипотермии различной интенсивности на содержание дыхательных суперкомплексов и комплексов системы OXPHOS

На рисунке представлен градиентный гель 1D BNE, окрашенный коллоидным Кумасси. Слева цифрами обозначены номера полос; справа указаны молекулярные массы маркеров.

Обозначения: К – контроль, Ж – жесткий стресс, З – закаливание, М – мягкий стресс; Температурные обработки как в табл. 4; I, II, III_2, IVa, IVb, IVc, Va, Vb – дыхательные комплексы I, II, III_2, IVa, IVb, IVc, Va, Vb соответственно; стрелки указывают на соответствующие белковые комплексы.

Таблица 6

Изменение содержания дыхательных комплексов и суперкомплексов при закаливании и в условиях низкотемпературного стресса

Полоса	R_f	Название комплекса или суперкомплекса	Относительное содержание белка, % от контроля			
			Контроль	Жесткий стресс	Закаливание	Мягкий стресс
1	0,01	$(II+III_2+IV_{1–4})_n$	**100** [а, б] [100; 100]	**80,9** [а, г, д] [79,4; 86,6]	**116,2** [б, г, е] [111,7; 143,5]	**102,0** [д, е] [93,6; 107,8]
2	0,07	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**56,1** [а] [41,9; 74,1]	**81,2** [б] [67,7; 96,3]	**74,9** [в] [67,1; 87,5]
3	0,11	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**80,9** [а] [77,2; 93]	**91,7** [б] [84,2; 99,2]	**94,7** [в] [83,2; 97,7]
4	0,14	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**38,3** [а] [33,1; 79,7]	**73,4** [б] [66,1; 80,3]	**80,3** [в] [61,9; 88,3]
5	0,17	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**76,9** [а, г, д] [73,5; 81]	**86,7** [б, г] [78,7; 93,2]	**91,8** [в, д] [87,9; 94,7]
6	0,18	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**82,4** [а] [73,6; 83]	**86,0** [б] [74,3; 88,3]	**96,8** [в] [85,6; 98]
7	0,2	$I+NDA+III_2+IV$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**89,5** [а] [85,3; 95,1]	**92,6** [б] [91,6; 96,7]	**89,3** [в] [86,4; 94,5]
8	0,28	I	**100** [а, б, в] [100; 100]	**148,5** [а, г, д] [135; 161,2]	**102,9** [б, г] [99,7; 104,6]	**104,1** [в, д] [99,7; 133,2]
9	0,36	Va+NDA+NDB+AOX	**100** [а, б, в] [100; 100]	**90,7** [а] [81,2; 96,0]	**90,1** [б] [86,6; 95,8]	**92,6** [в] [90,1; 96,6]
10	0,39	Vb+NDA+NDB+AOX	**100** [а, б, в] [100; 100]	**94,8** [а] [85,6; 96,9]	**98,1** [б] [94,8; 99,3]	**98,4** [в] [92,3; 101,6]
11	0,44	III_2	**100** [а, б, в] [100; 100]	**126,2** [а] [115,9; 147,2]	**114,4** [б] [109,6; 120,9]	**117,3** [в] [103,2; 122,5]

Примечание: в таблице приведены результаты обсчета 10-и электрофоретических полос на гелях 1D BNE, окрашенных Кумасси. Полосы представляют собой суперкомплексы и комплексы дыхательной цепи митохондрий проростков гороха. Контроль принимался за 100%, Me [25%; 75%], n=3-5, [а, б, в, г, д, е] – различия между контролем и жестким стрессом ([а]), контролем и закаливанием ([б]), контролем и мягким стрессом ([в]), жестким стрессом и закаливанием ([г]), жестким стрессом и мягким стрессом ([д]), мягким стрессом и закаливанием ([е]) статистически значимы ($P \leq 0,05$). Статистическую значимость различий определяли по критерию Краскела-Уоллиса.

На фоне общего уменьшения содержания большинства суперкомплексов происходило накопление отдельно функционирующих комплексов I и III_2 (табл. 6). При этом в условиях жесткого стресса наблюдалось резкое увеличение количества комплекса I, в среднем на 48,5%, что значительно превышало уровни содержания этого фермента при холодовом закаливании и мягком стрессе. Количество комплекса III_2 существенно возрастало при всех используемых низкотемпературных обработках. Вероятно, общее снижение содержания

суперкомплексов, в состав которых входят комплексы I, III_2 и IV, и накопление отдельно функционирующих комплексов I и III_2 могут являться результатом распада ассоциаций $I+III_2+IV_n$ и $I+NDA+III_2+IV$.

Наши данные согласуются с результатами Ramirez-Aguilar с соавторами (Ramirez-Aguilar et al., 2011), которые показали, что при гипоксии и низком значении pH содержание суперкомплексов $I+III_2+IV_{1-3}$ и $I+III_2$ в митохондриях клубней картофеля существенно снижается. Это сопровождается высвобождением комплекса I из состава суперкомплексов с последующим увеличением содержания более мелкого суперкомплекса III_2+IV. Вероятно, снижение количества ассоциаций дыхательных комплексов в стрессовых условиях и в условиях адаптации является общей реакцией системы окислительного фосфорилирования на изменения условий среды.

Согласно нашим данным (табл. 6), гипотермия любой интенсивности приводит к увеличению содержания отдельно функционирующих комплексов I и III_2. В условиях кратковременного жесткого воздействия происходит более активный распад ряда суперкомплексов и высвобождение комплекса I, а в условиях длительного закаливания и мягкого стресса, по-видимому, распад ассоциаций сопровождается постепенной деградацией этого фермента.

Анализ митохондриального комплексома при помощи двумерного голубого нативного электрофореза со второй мерой SDS показал, что после всех применяемых низкотемпературных обработок субъединичный состав суперкомплексов и комплексов системы OXPHOS существенно не менялся (рис. 12). Это говорит о стабильности компонентов системы окислительного фосфорилирования в неблагоприятных низкотемпературных условиях. Подобные результаты были получены Taylor с коллегами (Taylor et al., 2005), но при использовании более жесткого неионного детергента додецилмальтозида для солюбилизации мембранных белков. Эти исследователи показали, что выдерживание 10-и дневных зеленых растений гороха при 4 °C в течение 36 часов, а также обработка гербицидами и засуха не приводят к существенным

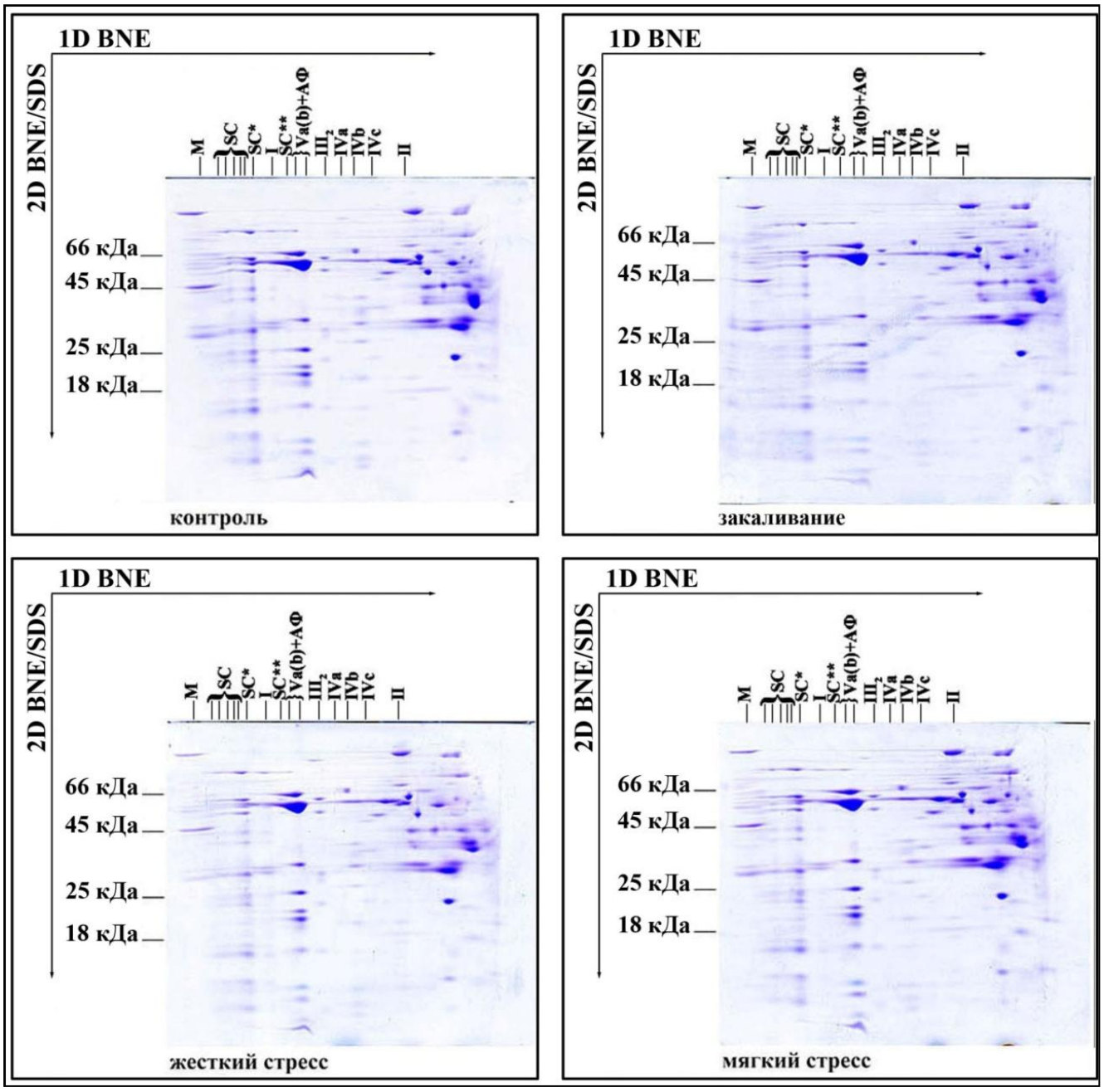


Рис. 12. Влияние гипотермии различной интенсивности на митохондриальный комплексом

На рисунке представлен гель 2D BNE/SDS, окрашенный Кумасси R-250. Температурные обработки те же, что и в подписи к табл. 5. Слева указаны молекулярные массы маркеров

Обозначения: M – мегакомплекс $(II+III_2+IV_{1-4})_n$; SC – суперкомплексы $I+III_2+IV_{1-4}$; SC* – суперкомплекс $I+NDA+III_2+IV$; SC** – суперкомплекс $NDA+NDB+III_2+IV$; Va(b)+АФ – суперкомплекс Va(b)+NDA+NDB+AOX; I, II, III_2, IVa, IVb, IVc, Va, Vb – дыхательные комплексы I, II, III_2, IVa, IVb, IVc, Va,Vb соответственно.

количественным и качественным изменениям в субъединичном составе комплексов окислительного фосфорилирования. Основные изменения были замечены в растворимой фракции митохондриальных белков, вовлеченных в углеродный метаболизм и формирование устойчивости к неблагоприятным условиям. Эти данные подтверждают наше предположение о стабильной организации дыхательных комплексов и их ассоциаций.

Так же как и на одномерном голубом нативном геле (рис. 11), при разделении нативных митохондиральных белков во второй денатурирующей мере (рис. 12) заметно снижение содержания всех субъединиц большинства суперкомплексов в условиях гипотермии. В условиях жесткого стресса наблюдается также значительное уменьшение содержания многих белков в области 50–400 кДа нативной меры 1D, соответственно расположенных в правой половине 2D гелей (рис. 12). Интересно, что при закаливании отмечается увеличение низкомолекуряных субъединиц с массами до 25 кДа в мегакомплексе $(II+III_2+IV_{1-4})_n$ (рис. 12, М). Кроме того, в отличие от остальных вариантов в комплексоме “закаленных” митохондрий на 2D BNE/SDS отчетливо выделяется субъединичный состав мегакомплекса (рис. 12, М). Мы предполагаем, что накапливающиеся низкомолекулярные субъединицы могут придавать новые свойства и стабилизировать эту структуру в условиях холодовой адаптации.

3.3.3. Активность дыхательных монокомплексов и комплексов в составе суперкомплексов системы окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха в условиях гипотермии

Как отмечалось выше, организация системы окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха существенно не меняется в изучаемых условиях гипотермии, но наблюдаются изменения в содержании как отдельных дыхательных ферментов, так и суперкомплексов системы OXPHOS. Вполне ожидаемо, что эти перестройки могут отражаться также и на активности дыхательных комплексов. Учитывая высокую чувствительность

энзимографического метода, можно предположить выявление новых закономерностей, не обнаруженных на гелях, окрашенных Кумасси. Анализ изменений активности комплексов системы OXPHOS митохондрий, изолированных из проростков гороха, проводили при помощи денситометрического анализа, используя подсчет суммарной интенсивности пиков активных зон в программе Image J.

Результаты расчетов показали, что гипотермия любой интенсивности приводит к снижению активности I-го комплекса в составе суперкомплексов, причем в некоторых минорных электрофоретических полосах разница между вариантами видна отчетливее (рис. 13, приложение Е). Так, жесткая обработка сильнее всего, в среднем на 54,2%, понижает активность комплекса I в минорном суперкомплексе $I+III_2+IV_n$ с R_f 0,07 (рис. 13, график SC $I+III_2+IV_n$), в то время как в мажорной ассоциации $I+NDA+III_2+IV$ с R_f 0,2 активность снижается примерно на 10% при всех изучаемых обработках (рис. 13, график SC* $I+NDA+III_2+IV$). Это можно объяснить высокой НАДН-дегидрогеназной активностью комплекса I, которая в мажорных зонах детектируется по темно-фиолетовой окраске продукта реакции высокой интенсивности. Таким образом, разница между вариантами в этих зонах может частично нивелироваться из-за высокого содержания фермента. Напротив, в минорных полосах (суперкомплексах и отдельном комплексе I) содержание белка низкое, поэтому разница в активности может просматриваться более четко. На фоне общего снижения активности фермента в составе суперкомплексов при гипотермии, в стрессовых условиях происходит рост активности его свободной, не связанной с другими дыхательными ферментами формы. Так, при действии низкой отрицательной температуры обнаружено значительное увеличение активности отдельно функционирующего комплекса I в среднем на 96,2%, а при мягком стрессе – на 13,9%. Учитывая то, что содержание этого фермента при жестком стрессе увеличивается на 48,5% (табл. 6, полоса 8), а активность вырастает на 96,2%, мы предполагаем, что рост активности связан не только с увеличением содержания белка, но и с дополнительной активацией

фермента в этих условиях. Содержание свободного комплекса I в условиях мягкого стресса значительно ниже, чем при жестком стрессе, но, по-видимому, в этих условиях также происходит дополнительная активация фермента, поскольку его количество увеличивается в среднем на 4,1% (табл. 6, полоса 8), а активность вырастает на 13,9% (рис. 13, график КОМПЛЕКС I). В период закаливания содержание и активность индивидуального комплекса I сохраняются практически на уровне контроля (табл. 6, полоса 8; рис. 13, график КОМПЛЕКС I).

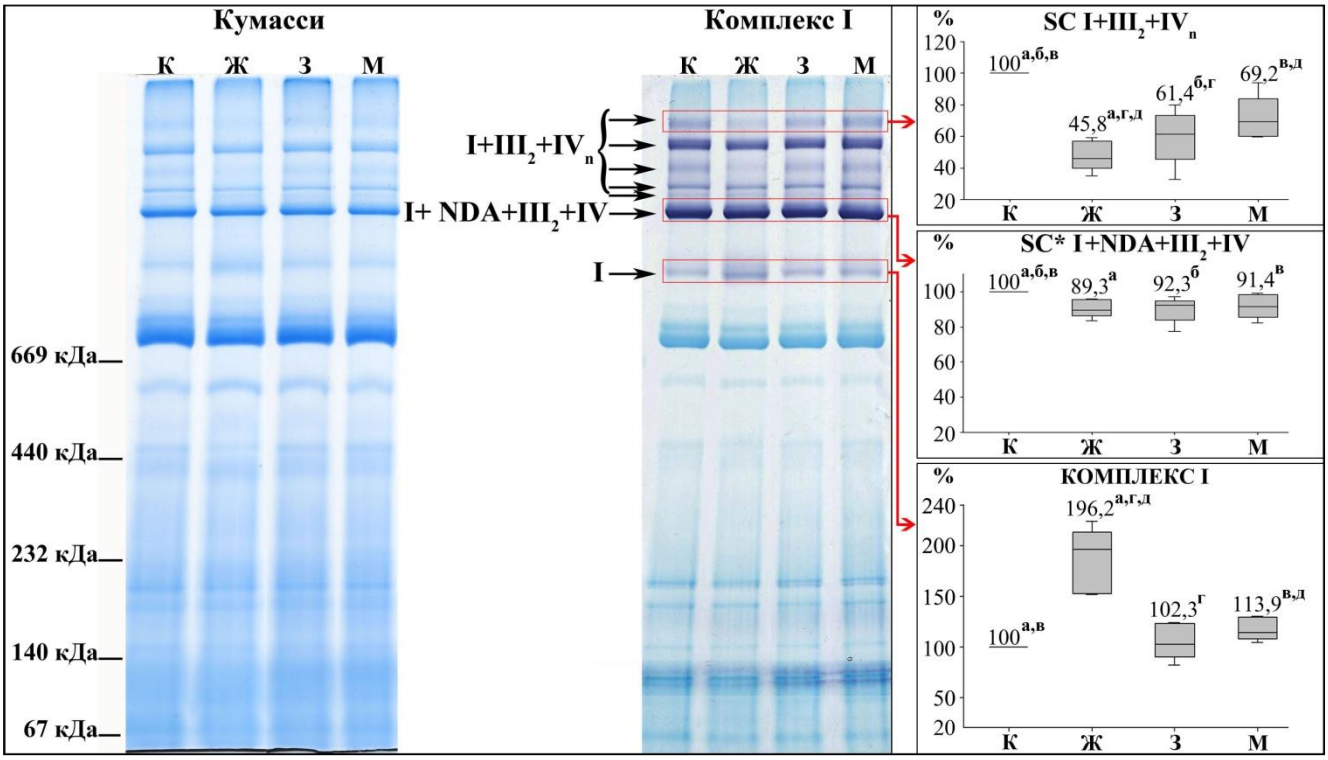


Рис. 13. Влияние гипотермии на НАДН-дегидрогеназную активность комплекса I дыхательной цепи митохондрий проростков гороха

Обозначения: К – контроль, Ж – жесткий стресс, З – закаливание, М – мягкий стресс. Слева представлены маркеры нативных белков. Черные стрелки указывают на суперкомплексы, содержащие комплекс I и монокомплекс I. Красные стрелки указывают на результаты денситометрического анализа относительной активности фермента в соответствующих зонах детекции по вариантам, которые представлены в виде графиков. Относительную активность оценивали по суммарной интенсивности окраски продукта реакции в зоне детекции фермента и выражали в процентах от контроля. Красными прямоугольниками обозначены суперкомплексы I+III_2+IVn с R_f 0,07, I+NDA+III_2+IV с R_f 0,2 и комплекс I с R_f 0,28 по вариантам. Me [25%; 75%], бары показывают минимальные и максимальные значения, n=4, $^{а, б, в, г, д, е}$ – различия между контролем и жестким стрессом (^{а}), контролем и закаливанием (^{б}), контролем и мягким стрессом (^{в}), жестким стрессом и закаливанием (^{г}), жестким стрессом и мягким стрессом (^{д}), мягким стрессом и закаливанием (^{е}) статистически значимы ($P \leq 0,05$). Статистическую значимость различий определяли по критерию Краскела-Уоллиса.

Сопоставляя эти результаты с данными по окислительному стрессу (табл. 5), можно предположить связь между накоплением продуктов перекисного окисления липидов и увеличением активности и содержания монокомплекса I в период низкотемпературных стрессов. Нужно отметить, что в условиях жесткого стресса высвобождение первого комплекса идет интенсивнее.

Рост активности первого комплекса, как указывалось выше, был отмечен также Ramirez-Aguilar с соавторами (Ramirez-Aguilar et al., 2011) в митохондриях клубней картофеля в условиях окислительного стресса, вызванного гипоксией. По данным Lenaz и Genova (Lenaz, Genova, 2012) на животных митохондриях было также показано, что факторы, приводящие к развитию окислительного стресса, такие как ксенобиотики, старение, нейродегенеративные заболевания, рак и другие, также приводят к выходу комплекса I из состава суперкомплексов. Вероятно, диссоциация комплекса I является общей реакцией митохондрий многих видов на окислительный стресс.

Активность комплекса II в составе мегакомплекса при жестком стрессе также снижается примерно на 23,3%, (рис. 14, А, график М $(II+III_2+IV)_n$) в то время как активность свободной несвязанной сукцинатдегидрогеназы, наоборот, немного увеличивается в среднем на 1,6% (рис. 14, А, график КОМПЛЕКС II). При закаливании и мягком стрессе происходит увеличение активности сукцинатдегидрогеназы в мегакомплексе $(II+III_2+IV_{1–4})_n$, но существенных изменений в содержании монокомплекса не происходит (рис. 14, А, график КОМПЛЕКС II).

Наиболее выраженные изменения активности комплекса IV детектируются в мегакомплексе $(II+III_2+IV_{1–4})_n$ (рис. 14, Б, график М $(II+III_2+IV)_n$). В этой структуре при низких отрицательных температурах активность цитохром *c* оксидоредуктазы падает в среднем на 23,3%, а в условиях закаливания и мягкого стресса происходит ее рост на 29,7 и 28,4% соответственно. В суперкомплексах $I+III_2+IV_n$ с R_f 0,07–0,18 наблюдается снижение активности комплекса IV

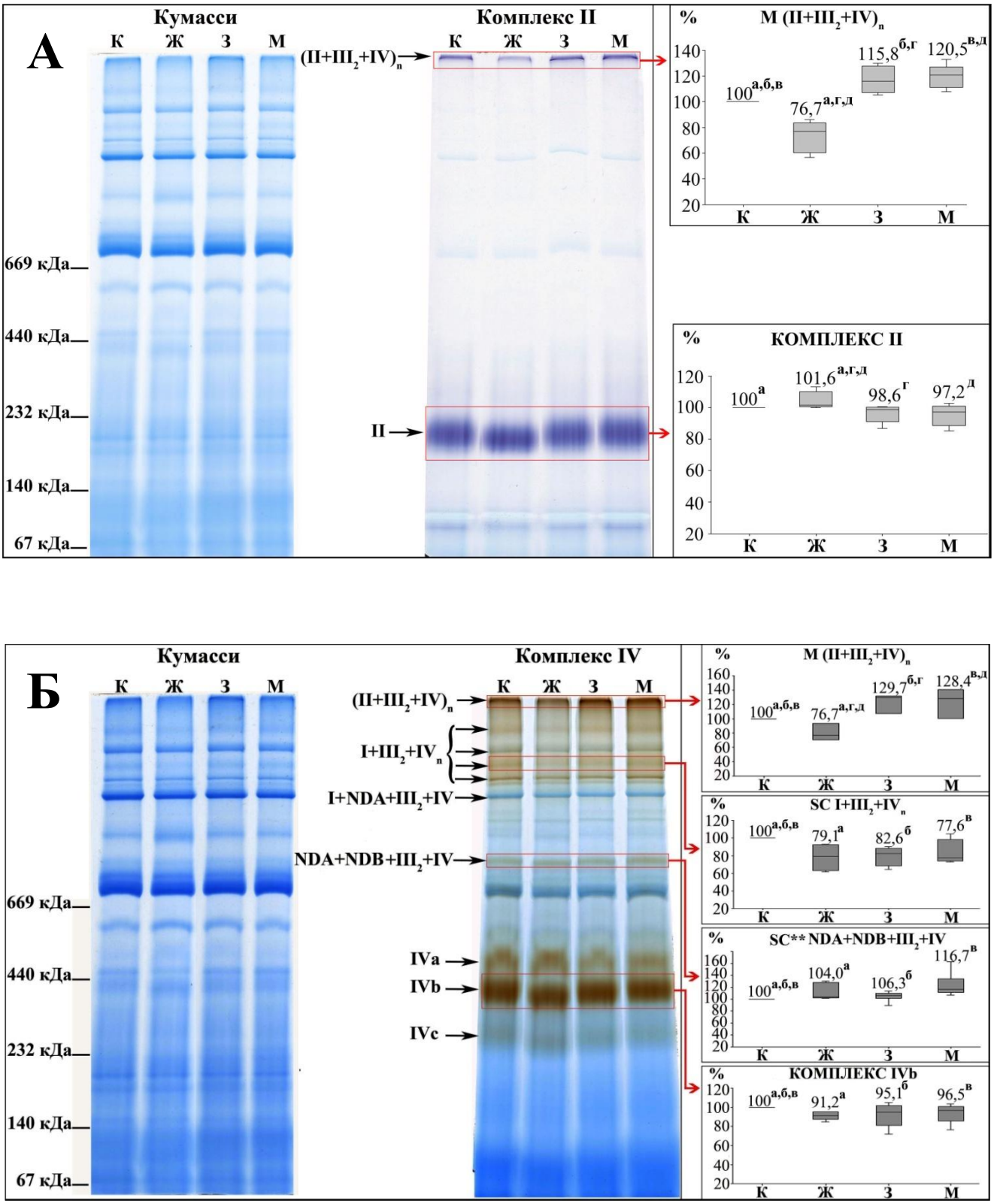


Рис. 14. Влияние гипотермии на активность сукцинатдегидрогеназы (А) и цитохром *c* оксидазы (Б) в митохондриях проростков гороха

Обозначения: Обозначения “К, Ж, З, М” и значение стрелок те же, что и на рис. 13. Слева представлены маркеры нативных белков. Me [25%; 75%], бары показывают минимальные и максимальные значения, n=4, $^{а, б, в, г, д, е}$ – как в подписи к рис. 13.

практически при всех используемых низкотемпературных обработках (приложение Е). Так, в суперкомплексе I+III_2+IV_n с R_f 0,14 (рис. 14, Б, график SC I+III_2+IV_n) активность цитохром *c* оксидазы упала в среднем примерно на 20% под воздействием всех изучаемых условий гипотермии, а вот в самом "мелком" суперкомплексе NDA+NDB+III_2+IV (рис. 14, Б, график SC** NDA+NDB+III_2+IV), напротив, в стрессовых условиях происходит её небольшой рост. Активность свободных форм цитохромоксидазы подавляется в разной степени практически при всех низкотемпературных обработках.

Жесткий стресс вызывает существенное снижение активности всех форм комплекса V – димерной формы V_2, Va и Vb, в среднем на 27,9–20,9% (рис. 15, приложение Е). При закаливании активность всех форм АТФ-синтазы подавляется в среднем на 10%.

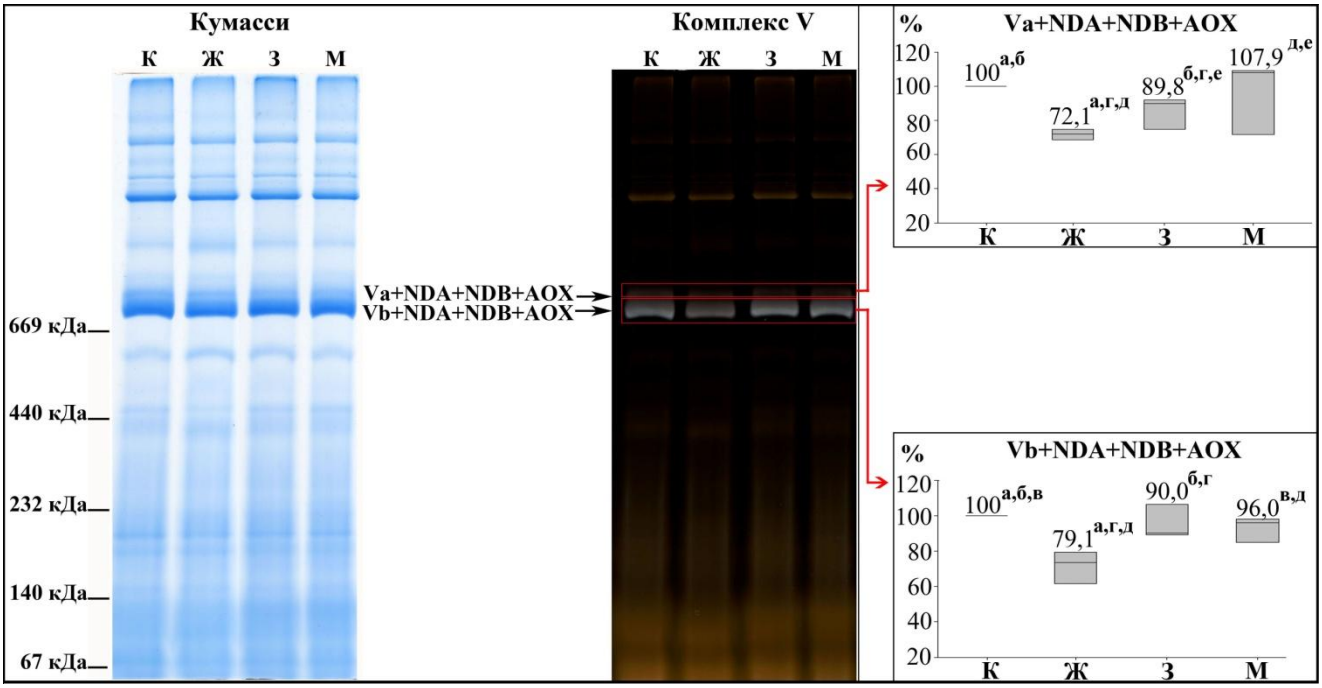


Рис. 15. Изменения в активности АТФ-синтазы митохондрий проростков гороха в условиях гипотермии

Обозначения: Обозначения и значение стрелок те же, что и на рис. 13. Слева представлены маркеры нативных белков. Me [25%; 75%], n=3, $^{а, б, в, г, д, е}$ – как в подписи к рис. 13.

Мягкий стресс приводит к снижению активности только мажорной формы Vb, статистически значимого изменения в активности форм V_2 и Va не наблюдается (рис. 15, приложение Е).

В целом представленные данные говорят о стабильной организации системы окислительного фосфорилирования митохондрий гороха, а снижение температуры приводит к понижению или повышению содержания и активности отдельных ее компонентов. Так, показано, что в условиях гипотермии не происходит формирования новых ассоциаций дыхательных ферментов, но уменьшается содержание и активность большинства обнаруженных суперкомплексов, таких как суперкомплексы $I+III_2+IV_n$, $I+NDA+III_2+IV$, Va+NDA+NDB+AOX и Vb+NDA+NDB+AOX. Интересно, что содержание и активность мегакомплекса $(II+III_2+IV_{1-4})_n$ снижаются только в условиях жесткого стресса, а при закаливании, наоборот, наблюдается их увеличение. В условиях мягкого стресса, несмотря на то, что существенных изменений в его содержании не обнаружено, активность этой ассоциации растёт так же как и при закаливании. В результате распада суперкомплексов $I+III_2+IV_n$ и $I+NDA+III_2+IV$ в условиях гипотермии происходит выход и накопление отдельно функционирующих комплексов I и III_2. Этот процесс, по-видимому, происходит благодаря развитию окислительного стресса, о чём можно судить по увеличению содержания продуктов ПОЛ. Вероятно, при низкотемпературном стрессе эти изменения являются результатом повреждений и направлены на смягчение неблагоприятного воздействия низких температур, в то время как в условиях закаливания – результатом адаптационных перестроек, и необходимы для менее интенсивного и контролируемого дыхания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время при помощи современных методов электронной микроскопии, одномерного и двумерного голубого нативного электрофорезов в градиентном полиакриламидном геле, масс-спектрометрического анализа активно изучается организация и состав суперкомплексов системы окислительного фосфорилирования митохондрий животных, грибов, бактерий и растений. Накопленная за последние годы информация изменила существовавшее ранее представление о структурной организации митохондриальной системы OXPHOS и показала, что дыхательные комплексы и АТФ-синтаза организованы в сложные динамичные структуры, так называемые суперкомплексы и мегакомплексы (Welchen et al., 2011; Lenaz, Genova, 2012). Предполагается, что объединение комплексов в единую структуру может увеличивать их стабильность внутри суперкомплексов, способствовать более эффективному распределению электронов между реактивными сайтами ферментов в пределах суперкомплексов и препятствовать образованию опасных интермедиатов реакций. Подобная ассоциация может быть также важна для регуляции метаболических путей, таких, например, как цикл Кребса, синтез аскорбата и аминокислот. Наряду с надмолекулярными структурами в системе OXPHOS митохондрий присутствуют также отдельно расположенные дыхательные комплексы.

Организация системы окислительного фосфорилирования митохондрий, виды и содержание суперкомплексов и индивидуальных комплексов в разных организмах различается (приложение А). Однако имеются определенные закономерности. Так, например, большое количество суперкомплексов $I+III_2$ характерно для растений, суперкомплекс III_2+IV_{1-4} является мажорным у грибов, а в митохондриях млекопитающих ЭТЦ представлена в основном респирасомами $I+III_2+IV_{1-4}$ (Chaban et al., 2014). Выявление закономерностей в организации системы OXPHOS митохондрий, анализ данных осложнялись тем, что для изучения использовались различные неионные детергенты, различающиеся по силе разрушения белково-липидных и межлипидных связей. Поэтому применение

более мягких неионных детергентов дает возможность получить более полную информацию о нативной организации комплексов дыхательной цепи и АТФ-синтазы в митохондриях.

В нашем исследовании системы OXPHOS проростков гороха (*Pisum sativum* L.) использовали дигитонин, который лучше остальных подобных соединений стабилизирует мембранные комплексы и в настоящее время считается самым мягким неионным детергентом (Sunderhaus et al., 2007). Кроме того, митохондриальный комплексом солюбилизировали только из свежевыделенных митохондрий, обладающих высокой степенью чистоты и интактности, хорошей активностью и сопряженностью процессов окисления и фосфорилирования, что послужило надежной базой для получения достоверных данных о надмолекулярной организации системы окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха. Также для максимального сохранения нативного состояния белковых структур в отличие от ряда авторов (Eubel et al., 2003, 2004; Sunderhaus et al., 2007; Klodmann, 2011) мы использовали более мягкие условия проведения нативного голубого фореза в первой мере разделения, снижая концентрацию Кумасси G250 после половины пробега в 10 раз (глава 2.11). Высокая концентрация Кумасси в катодном буфере может приводить к потере некоторых слабосвязанных белков.

Ранее Taylor с соавторами (Taylor et al., 2005) предпринимали попытку изучения организации ЭТЦ митохондрий из зеленых растений гороха при помощи более жесткого детергента додецилмальтозида, разбивающего суперкомплексы на отдельные комплексы или более мелкие ассоциации дыхательных комплексов. В результате исследований авторы обнаружили в составе ЭТЦ только один суперкомплекс I+III_2 и отдельно функционирующие дыхательные комплексы (рис. 16, А). Результаты наших исследований показали, что комплексы дыхательной цепи и АТФ-синтаза в митохондриях этиолированных проростков гороха имеют гораздо более сложную организацию и в нативном состоянии система OXPHOS представлена: мажорным суперкомплексом I+NDA+III_2+IV; пятью

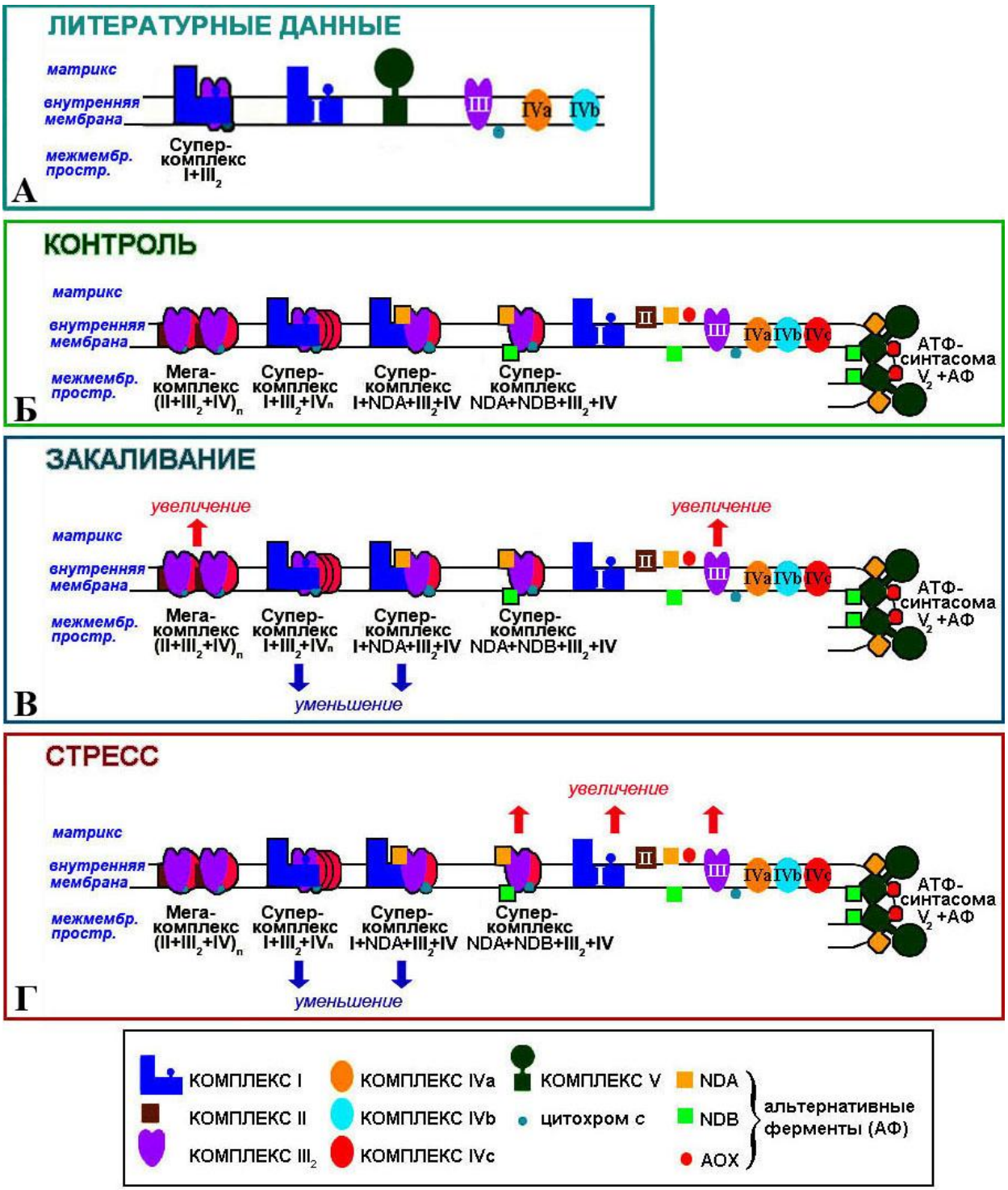


Рис. 16. Схема организации системы OXPHOS митохондрий проростков гороха в оптимальных и низкотемпературных условиях.

А – нативная организация дыхательных комплексов и АТФ-синтазы зеленых растений гороха по данным Taylor с соавторами (Taylor et al., 2005), данные получены при использовании жесткого детергента додецилмальтозида; Б – нативная организация системы OXPHOS митохондрий проростков гороха в оптимальных условиях; В, Г – изменения в надмолекулярной структуре системы OXPHOS митохондрий проростков гороха в условиях низкотемпературного закаливания и стресса соответственно. В вариантах Б, В и Г солюбилизирующим агентом являлся дигитонин. АТФ-синтаза представлена в виде димера, т.к. показано, что в митохондриях этот фермент имеет в основном димерную форму (Davies et al., 2012; Chaban et al., 2014), которая при солюбилизации органелл распадается на мономеры.

респирасомами $I+III_2+IV_n$, включающими разное количество копий комплекса IV; суперкомплексом $NDA+NDB+III_2+IV$; мегакомплексом $(II+III_2+IV)_n$ с предполагаемой молекулярной массой около 10000 кДа; а также двумя формами АТФ-синтазы – Va и Vb, ассоциированными с альтернативными ферментами (рис. 16, Б) (Кондакова и др., 2014, 2016б).

Факт обнаружения комплекса II в составе мегакомплекса $(II+III_2+IV)_n$ является интересным, т.к. считается, что он не входит в состав суперкомплексов и имеются лишь единичные сведения о его ассоциации с другими дыхательными ферментами ЭТЦ митохондрий (Lenaz, Genova, 2007; Acin-Perez et al., 2008). Так, например, в митохондриях мышей сукцинатдегидрогеназа обнаружена в составе суперкомплексов $I+II+III_2+IV$ и $II+III_2+IV$ (Acin-Perez et al., 2008).

Ассоциации NDA, NDB и AOX с АТФ-синтазой, NDA с суперкомплексом $I+III_2+IV$, а NDA и NDB с суперкомплексом III_2+IV в растительных митохондриях обаружены впервые, поскольку ранее считалось, что эти альтернативные ферменты не связаны с дыхательными надмолекулярными структурами (Eubel et al., 2003; Klodmann et al., 2011; Welchen et al., 2011). Однако в последнее время начали появляться единичные данные об ассоциации некоторых альтернативных ферментов с дыхательными комплексами. Так, Matus-Ortega с коллегами (Matus-Ortega et al., 2015) в митохондриях *Saccharomyces cerevisiae*, в которых, как известно, отсутствует комплекс I дыхательной цепи, обнаружили связь внутренней альтернативной НАД(Ф)Н-дегидрогеназы Ndi1 с комплексами III_2 и IV, предположив, что эти ферменты образуют респирасомо-подобную структуру. Более того, они выявили, что Ndi1 образует также комплекс с АДФ/АТФ-транслокатором и переносчиком фосфата. Наши результаты показали, что основная часть внутренних и внешних альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, детектируемых имеющимися антителами, ассоциирует с суперкомплексами окислительного фосфорилирования, а альтернативная оксидаза в основном находится в свободной, несвязанной форме. Мы предполагаем, что присутствие альтернативных ферментов в составе суперкомплексов может увеличивать

адаптационные возможности системы OXPHOS растительных митохондрий (Кондакова и др., 2016б). Так, в стрессовых условиях, когда активность комплекса I подавляется, NDA альтернативно может поддерживать работу комплексов III и IV в составе респирасомы I+NDA+III_2+IV. Функциональную значимость ассоциации альтернативных ферментов с АТФ-синтазой еще предстоит выяснить.

Интересно наличие двух мономерных форм АТФ-синтазы в митохондриях проростков гороха – Va и Vb. Ранее сообщалось о наличии только одной мажорной формы этого фермента, совпадающей по массе с комплексом Vb у гороха (Eubel et al., 2003; Krause et al., 2004; Pineau et al., 2005; Taylor et al., 2005; Bultema et al., 2009). Однако позднее Chien с коллегами (Chien et al., 2015) также обнаружили вторую форму АТФ-синтазы в органеллах из корневищ бамбука, которая по молекулярной массе приближается к обнаруженному нами комплексу Va. Авторы предположили, что это суперкомплекс V+F_1, с чем пока сложно согласиться, так как в этом случае эта структура должна была бы иметь более высокую молекулярную массу. Дополнительные субъединицы минорной формы Va еще предстоит изучить.

Помимо обнаруженных суперкомплексов в ЭТЦ митохондрий гороха все дыхательные ферменты присутствуют и в виде отдельных комплексов, причём комплекс IV представлен тремя формами – IVa, IVb и IVc (Кондакова и др., 2014). Комплексы IVa и IVb имеют схожий состав и отличаются дополнительной субъединицей (или субъединицами) с общей массой 50 кДа. Ранее рядом авторов (LaMarche et al., 1992; Weishaupt, Kadenbach, 1992) было также обнаружено наличие двух форм комплекса IV, IVa и IVb в митохондриях дрожжей и млекопитающих, которые отличались дополнительной субъединицей COX VIb с массой 10 кДа. Было показано, что эта субъединица может легко отделяться и регулировать активность цитохром *c* оксидазы. Позднее гомологичный белок с массой 32 кДа был обнаружен и в растительном комплексе IVa (Eubel et al., 2003). Вероятно, различия в массах между формами IVa и IVb в митохондриях

проростков гороха также могут быть связаны с наличием дополнительных и в том числе регуляторных субъединиц.

Как отмечалось выше, нативная организация системы окислительного фосфорилирования митохондрий в различных видах и даже на разных фазах развития растения изучается активно, но исследования по влиянию факторов среды на ее структуру пока единичны. В частности есть данные, показывающие, что в условиях гипоксии, низкого pH и аноксии происходит снижение содержания и распад дыхательных суперкомплексов (Millar et al., 2004b; Ramirez-Aguilar et al., 2011). Однако исследования по влиянию гипотермии на состав и активность суперкомплексов в растительных митохондриях практически не проводились. Для получения новых данных и расширения представления об адаптивном и стрессовом состоянии митохондриальной системы окислительного фосфорилирования мы использовали три различные низкотемпературные обработки – закаливание, “мягкое” стрессирование низкой положительной и “жесткое” стрессирование отрицательной температурами.

Результаты исследований показали, что в условиях гипотермии не происходит формирование новых ассоциаций дыхательных ферментов, но уменьшается содержание большинства обнаруженных суперкомплексов, таких как $I+III_2+IV_n$, I+NDA+III_2+IV, Va+NDA+NDB+AOX и Vb+NDA+NDB+AOX, что предположительно может быть связано с распадом и частичной деградацией этих структур (рис. 16, В и Г; табл. 6). На фоне общего снижения содержания большинства суперкомплексов происходит накопление отдельно функционирующих комплексов I и III_2, что, вероятно, является результатом распада респирасом $I+III_2+IV_n$ и I+NDA+III_2+IV в низкотемпературных условиях (Кондакова и др., 2016а).

Изменения в содержании компонентов системы OXPHOS отражаются и на активности ферментов, функционирующих как отдельно, так и в составе суперкомплексов. Так, гипотермия вызывает снижение активности дыхательных комплексов в респирасомах. В то же время в стрессовых условиях наблюдается

рост активности монокомплекса I, причем прирост активности превышает прирост содержания фермента. Это позволяет предположить, что помимо концентрационной зависимости изменения активности в период стресса включаются еще и дополнительные факторы, активирующие отдельно функционирующий комплекс I. При закаливании активность этого дыхательного фермента остается на уровне контроля. В условиях гипотермии отмечено также небольшое увеличение активности более мелкого суперкомплекса NDA+NDB+III_2+IV.

Наши данные согласуются с результатами Ramirez-Aguilar с соавторами (Ramirez-Aguilar et al., 2011), которые показали, что при гипоксии и низком значении pH содержание суперкомплексов I+III_2+IV_{1-3} и I+III_2 в митохондриях клубней картофеля существенно снижается, что сопровождается выходом комплекса I из состава суперкомплексов с последующим увеличением содержания более мелкого суперкомплекса III_2+IV. Вероятно, снижение количества ассоциаций дыхательных комплексов в стрессовых условиях и в условиях адаптации является общей реакцией системы окислительного фосфорилирования на изменения условий среды.

В условиях закаливания снижение содержания и активности большинства суперкомплексов и сохранение функционального состояния монокомплекса I на прежнем уровне совместно с другими факторами приводит к уменьшению фосфорилирующего дыхания и разобщению процессов окисления и фосфорилирования. Высокая целостность митохондриальных мембран закаленных растений, небольшое, по сравнению со стрессом, увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов и общее повышение устойчивости проростков к промораживанию совместно с изменениями в содержании суперкомплексов и функциональной активности органелл показывают, что закаливание вызывает ряд адаптационных перестроек, в результате которых сохраняется эластичность митохондриальных мембран, а ферментативная система окислительного фосфорилирования переходит в менее

интенсивный режим работы, направленный на поддержание энергией клеточного гомеостаза и снижение образования АФК.

В стрессовых условиях происходит общее снижение устойчивости проростков гороха, ухудшение состояния мембран в результате развития процессов ПОЛ, снижение содержания и активности большинства суперкомплексов, накопление и рост активности дыхательных монокомплексов и разобщение процессов окисления и фосфорилирования.

Таким образом, представленные в работе данные открывают новые особенности строения системы окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха, а также указывают на частичную потерю суперкомплексной организации этой системы в условиях гипотермии различной интенсивности, которая сопровождается накоплением комплексов I и III_2 и увеличением активности более мелкой ассоциации NDA+NDB+III_2+IV.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 14-04-01233.

ВЫВОДЫ

1) Система окислительного фосфорилирования митохондрий из этиолированных проростков гороха имеет сложную организацию и в нативном состоянии представлена как ранее обнаруженными в других растительных видах респирасомами $I+III_2+IV_n$, так и впервые описанными нами, прежде не детектируемыми суперкомплексами, такими как: мажорная респирасома $I+NDA+III_2+IV$, суперкомплекс $NDA+NDB+III_2+IV$, мегакомплекс $(II+III_2+IV)_n$, и две АТФ-синтасомы a и b-форм – $Va(b)+NDA+NDB+AOX$.

2) Внутренние и внешние альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы ассоциируют с суперкомплексами OXPHOS, а альтернативная оксидаза в основном находится в свободной, несвязанной форме.

3) В условиях гипотермии уменьшаются содержание и активность большинства обнаруженных суперкомплексов, таких как суперкомплексы $I+III_2+IV_n$, $I+NDA+III_2+IV$ и $Va(b)+NDA+NDB+AOX$.

4) В результате распада суперкомплексов $I+III_2+IV_n$ и $I+NDA+III_2+IV$ происходит накопление отдельно функционирующих комплексов I и III_2. При этом в условиях закаливания активность комплекса I остается на уровне контроля, а при стрессах – значительно увеличивается. При гипотермии также отмечено увеличение активности более мелкой ассоциации дыхательных ферментов $NDA+NDB+III_2+IV$.

5) В условиях гипотермии распад суперкомплексов происходит на фоне развития процессов перекисного окисления липидов клеточных мембран в проростках гороха. В стрессовых условиях ПОЛ протекает интенсивнее и приводит к снижению интактности митохондриальных мембран.

6) При закаливании частичный распад суперкомплексов и сохранение активности комплекса I на прежнем уровне совместно с другими факторами приводят к разобщению процессов окисления и фосфорилирования, снижению продукции АФК и сохранению интактности мембран.

7) В условиях стресса распад суперкомплексов и увеличение содержания и активности комплексов I и III_2, важных сайтов образования АФК, являются одной из причин нарушения функционирования митохондрий и приводят к разобщенному дыханию, дальнейшему росту продукции АФК и снижению интактности мембран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров В. Я. Клетки, макромолекулы и температура / В. Я. Александров. – Л.: Наука, 1975. – 329 с.

2. Барашкова Э. А. Оценка зимо- и морозостойкости полевых культур / Э. А. Барашкова, В. В. Виноградова // Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям. – Л., 1988. – С. 128–154.

3. Боровик О. А. Альтернативные ферменты дыхательной цепи митохондрий принимают участие в развитии морозоустойчивости озимой пшеницы / О. А. Боровик // В мире научных открытий. – 2014. – № 8 (56). – С. 7–21.

4. Боровский Г. Б. Ассоциация дегидринов с митохондриями пшеницы при низкотемпературной адаптации / Г. Б. Боровский, И. В. Ступникова, А. И. Антипина [и др.] // Физ. Раст. – 2005. – Т. 52, № 2. – С. 1–6.

5. Верещагин А. Г. Липиды в жизни растений / А. Г. Верещагин. – М.: Наука, 2007. – 73 с.

6. Войников В. К. Белок холодового шока 310 кД разобщает окислительное фосфорилирование в растительных митохондриях / В. К. Войников, О. И. Грабельных, А. В. Колесниченко, Т. П. Побежимова // Физ. Раст. – 2001а. – Т. 48, № 1. – С. 89–94.

7. Войников В. К. Действие холода на жирнокислотный состав и энергетическую активность митохондрий клеток растений / В. К. Войников, Т. П. Побежимова, Н. Н. Варакина // Физиол. и биох. культ. растений. – 1985. – Т. 17, № 5. – С. 431–440.

8. Войников В. К. Количество свободных жирных кислот митохондрий озимой ржи при гипотермии / В. К. Войников, Г. Б. Лузова, В. П. Лемзяков // Изв. СО АН СССР. Сер. Биол. Наук. – 1980. – Т. 1, № 5. – С 119–125.

9. Войников В. К. Митохондрии растений при температурном стрессе / В. К. Войников. – Н.: Гео, 2011. – 163 с.

10. Войников В. К. Последствия охлаждения на функциональную активность митохондрий пшеницы, пырея и пшенично-пырейных гибридов / В. К. Войников // Физ. Раст. – 1978. – Т. 25, № 4. – С. 761–766.

11. Войников В. К. Стрессовый разобщающий растительный белок БХШ 310 индуцирует термогенез в митохондриях пшеницы при гипотермии in vivo / В. К. Войников, О. И. Грабельных, Т. П. Побежимова [и др.] // Доклады РАН. – 2001б. – Т. 377, № 4. – С. 565–567.

12. Войников В. К. Энергетическая и информационная системы растительных клеток при гипотермии / В. К. Войников. – Н.: Наука, 2013. – 212 с.

13. Войников В. К. Температурный стресс и митохондрии растений / В. К. Войников. – Н.: Наука, 1987. – 133 с.

14. Грабельных О. И. Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и “внешняя” NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы / О. И. Грабельных, О. А. Боровик, Е. Л. Таусон [и др.] // Биохимия. – 2014. – Т. 79, вып. 6. – С. 647–662.

15. Грабельных О. И. Энергетические функции растительных митохондрий в стрессовых условиях / О. И. Грабельных // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2005. – Т. 1, № 1. – С. 37–54.

16. Гудвин Т. Введение в биохимию растений: в 3 т. Т. 1. / Т. Гудвин, Э. Мерсер; пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – 392 с.

17. Колесниченко А. В. Изменения в содержании белка 310 кД при холодовом закаливании проростков озимой пшеницы / А. В. Колесниченко, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Физиол. и биох. культ. растений. – 1997. – Т. 29, № 2. – С. 383–391.

18. Колесниченко А. В. Содержание стрессового белка 310 кД в проростках озимой пшеницы при гипотермии и водном дефиците / А. В. Колесниченко, Г. Б. Боровский, В. К. Войников, Н. В. Дорофеев // Физиол. и биох. культ. растений. – 1999. – Т. 31, № 2. – С. 145–149.

19. Колесниченко А. В. Характеристика белка из озимой ржи, накапливающегося при гипотермии / А. В. Колесниченко, Г. Б. Боровский, В. К. Войников [и др.] // Физ. Раст. – 1996. – Т. 43. – С. 894–899.

20. Кондакова М. А. Ассоциация дегидринов проростков гороха с суперкомплексами дыхательной цепи митохондрий в период гипотермии / М. А. Кондакова, И. В. Уколова, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2013. – Т. 9, № 4. – С. 279–288.

21. Кондакова М. А. Влияние гипотермии на содержание суперкомплексов и комплексов системы окислительного фосфорилирования в митохондриях проростков гороха *Pisum sativum* L. / М. А. Кондакова, И. В. Уколова, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Вестник ИрГСХА. – 2016а. – Вып. 77. – С. 71–78.

22. Кондакова М. А. Новые суперкомплексы в системе окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха *Pisum sativum* L. / М. А. Кондакова, И. В. Уколова, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016б. – Т. 6, № 3. – С. 143–146.

23. Кондакова М. А. Особенности строения электрон-транспортной цепи митохондрий проростков гороха (*Pisum sativum* L.) / М. А. Кондакова, И. В. Уколова, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Вестник ИрГСХА. – 2014. – Вып. 65. – С. 13-21.

24. Меденцев А. Г. Регуляция и физиологическая роль цианидрезистентной оксидазы у грибов и растений / А. Г. Меденцев, А. Ю. Аринбасарова, В. К. Акименко // Биохимия. – 1999. – Т. 64, № 11. – С. 1457–1472.

25. Микельсаар Х. Фосфолипиды и окислительное фосфорилирование / Х. Микельсаар, И. И. Северина, В. П. Скулачев // Успехи соврем. биологии. – 1974. – Т. 78. – С. 348–370.

26. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. Т. 2. / Д. Нельсон, М. Кокс; пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 633 с.

27. Побежимова Т. П. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез / Т. П. Побежимова, А. В. Колесниченко, О. И. Грабельных. – М.: ООО «НПК Промэкспобезопасность», 2004. – 98 с.

28. Побежимова Т. П. Функционирование дыхательной цепи растительных митохондрий при температурных стрессах: дис. доктора биол. наук: 03.00.12 / Т. П. Побежимова. – Иркутск, 1997. – 401 с.

29. Полесская О. Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: Учебное пособие / О. Г. Полесская. – М.: КДУ, 2007. – 140 с.

30. Рахманкулова З. Ф. Дыхательные суперкомплексы растительных митохондрий структура и возможные функции / З. Ф. Рахманкулова // Физ. Раст. – 2014. – Т. 61, № 6. – С. 765–777.

31. Романенко А. С. Субклеточная локализация дегидринов в проростках растений пшеницы при низкотемпературной адаптации / А. С. Романенко, Г. Б. Боровский, И. В. Уколова, Л. А. Ломоватская // Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27, № 2. – С. 156–165.

32. Стрижова Ф. М. Растениеводство: учебное пособие / Ф. М. Стрижова, Л. Е. Царева, Ю. Н. Титов. – Барнаул: АГАУ, 2008. – 219 с.

33. Трунова Т. И. Растение и низкотемпературный стресс / Т. И. Трунова. – М.: Наука, 2007. – 54 с.

34. Туманов И. И. Физиология закаливания и морозостойкости растений / И. И. Туманов. – М.: Наука, 1979. – 350 с.

35. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли; пер. с англ. – М.: Мир, 1975. – 328 с.

36. Хохлова Л. П. Сезонные изменения митохондрий у закаленных и незакаленных к холоду растений озимой пшеницы / Л. П. Хохлова, Н. Н. Кучеренкова, Й. Р. Абдрахимова // Физ. Раст. – 1993. – Т. 40, № 4. – С. 607–612.

37. Хочачка П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро. – М.: Мир, 1988. – 567 с.

38. Христолюбова Н. Б. Функциональная морфология цитоплазматических органелл / Н. Б. Христолюбова. – Н.: Наука., 1977. – 189 с.

39. Чиркова Т. В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям / Т. В. Чиркова // Соросовский образовательный журнал. – 1997, № 9. – С. 12–17.

40. Abdrakhmanova A. Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica* / A. Abdrakhmanova, V. Zickermann, M. Bostina [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – V. 1658, № 1–2. – P. 148–156.

41. Acin-Perez R. Respiratory active mitochondrial supercomplexes / R. Acin-Perez, P. Fernandez-Silva, M. L. Peleato [et al.] // Mol. Cell. – 2008. – V. 32, № 4. – P. 529–539.

42. Acin-Perez R. Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria / R. Acin-Perez, M. P. Bayona-Bafaluy, P. Fernandez-Silva [et al.] // Mol. Cell. – 2004. – V. 13. – P. 805–815.

43. Althoff T. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex $I_1III_2IV_1$ / T. Althoff, D. J. Mills, J. L. Popot, W. Kühlbrandt // EMBO J. – 2011. – V. 30. – P. 4652–4664.

44. Armstrong A. F. Dynamic changes in the mitochondrial electron transport chain underpinning cold acclimation of leaf respiration / A. F. Armstrong, M. R. Badger, D. A. Day [et al.] // Plant Cell Environ. – 2008. – V. 31. – P. 1156–1169.

45. Arnold I. Yeast mitochondrial F_1F_O-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits / I. Arnold, K. Pfeiffer, W. Neupert [et al.] // EMBO J. – 1998. – V. 17, № 24. – P. 7170–7178.

46. Balabaskaran Nina P. Highly Divergent Mitochondrial ATP synthase complexes in *Tetrahymena thermophila* / P. Balabaskaran Nina, N. V. Dudkina, L. A. Kane [et al.] // PloS Biol. – 2010. – V. 8, № 7. – P 1–15.

47. Balsa E. NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain / E. Balsa, R. Marco, E. Perales-Clemente [et al.] // Cell Metab. – 2012. – V. 16, № 3. – P. 378–386.

48. Baradaran R. Crystal structure of the entire respiratory complex I / R. Baradaran, J. M, Berrisford, G. S. Minhas, L. A. Sazanov // Nature. – 2013. – V. 494. – P. 443–448.

49. Barrientos A. Cytochrome oxidase assembly does not require catalytically active cytochrome *c* / A. Barrientos, D. Pierre, J. Lee, A. Tzagoloff // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 8881–8887.

50. Bartoli C. G. Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV / C. G. Bartoli, G. M. Pastori, C. H. Foyer // Plant Physiol. – 2000. – V. 123. – P. 335–344.

51. Benamar A. Membrane integrity and oxidative properties of mitochondria isolated from imbibing pea seeds after priming or accelerated ageing / A. Benamar, C. Tallon, D. Macherel // Seed Science Research. – 2003. – V. 13, № 1. – P. 35–45.

52. Blakely E. L. A mitochondrial cytochrome *b* mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in humans and yeast / E. L. Blakely, A. L. Mitchell, N. Fisher [et al.] // FEBS J. – 2005. – V. 272. – P. 3583–3592.

53. Boekema E. J. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system / E. J. Boekema, H. P. Braun // J. Biol. Chem. – 2007. – V. 282, № 1. – P. 1–4.

54. Borecky J. Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress / J. Borecky, A. E. Vercesi // Bioscience Reports. – 2005. – V. 25, № 3. – P. 271–284.

55. Borovskii G. B. Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment / G. B. Borovskii, I. V. Stupnikova, A. I. Antipina [et al] // BMC Plant Biology. – 2002. – V. 2. – P. 5.

56. Bottinger L. Phosphatidylethanolamine and cardiolipin differentially affect the stability of mitochondrial respiratory chain supercomplexes / L. Bottinger, S. E. Horvath, T. Kleinschroth [et al.] // J. Mol. Biol. – 2012. – V. 423, № 5. – P. 677–686.

57. Boumans H. The Respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit / H. Boumans, L. A. Grivell, J. A. Berden // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273, № 9. – P. 4872–4877.

58. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248–254.

59. Braun H. P. The bifunctional cytochrome *c* reductase/processing peptidase complex from plant mitochondria / H. P. Braun, U. K. Schmitz // J. Bioenerg. Biomembr. – 1995. – V. 27. – P. 423–436.

60. Bultema J. Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato / J. Bultema, H. P. Braun, E. Boekema, R. Kouril // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1787. – P. 60–67.

61. Cardol P. Mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in eukaryotes: a highly conserved subunit composition highlighted by mining of protein data bases / P. Cardol // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – V. 1807. – P. 1390–1397.

62. Carr H. S. Assembly of cytochrome *c* oxidase within the mitochondrion / H. S. Carr, D. R. Winge // Acc. Chem. Res. – 2003. – V. 36, № 5. – P. 309–316.

63. Carroll J. Bovine complex I is a complex of 45 different subunits / J. Carroll, I. M. Fearnley, J. M. Skehel [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – V. 281, № 43. – P. 32724–32727.

64. Chaban Y. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilization / Y. Chaban, E. J. Boekema, N. V. Dudkina // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – V. 1837, № 4. – P. 418–426.

65. Chance B. The respiratory chain and oxidative phosphorylation / B. Chance, G. R. Williams // Adv Enzymol Relat Subj Biochem. – 1956. – V. 17. – P. 65–134.

66. Chen Y. C. Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability / Y. C. Chen, E. B. Taylor, N. Dephoure [et al.] // Cell Metab. – 2012. – V. 15, № 3. – P. 348–360.

67. Chien L. F. Mitochondrial energy metabolism in young bamboo rhizomes from *Bambusa oldhamii* and *Phyllostachys edulis* during shooting stage / L. F. Chien, Y. C. Wu, H. P. Chen // Plant Physiol. Biochem. – 2011. – V. 49, № 4. – P. 449–457.

68. Claypool S. M. Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane / S. M. Claypool, Y. Oktay, P. Boontheung // J. Cell Biol. – 2008. – V. 182, № 5. – P. 937–950.

69. Close T. J. A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn / T. J. Close, A. A. Kortt, P. M. Chandler // Plant Mol. Biol. – 1989. – V. 13, № 1. – P. 95–108.

70. Close T. J. A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide / T. J. Close, R. D. Fenton, F. Moonan // Plant Mol. Biol. – 1993. – V. 23, № 2. – P. 279–286.

71. Close T. J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydratation proteins / T. J. Close // Physiol. Plant. – 1996. – V. 97. – P. 795–803.

72. Coates P. J. Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence / P. J. Coates, R. Netutil, A. McGregor [et al.] // Exp. Cell Res. – 2001. – V. 265, № 2. – P. 262–273.

73. Cogliati S. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency / S. Cogliati, C. Frezza, M. E. Soriano [et al.] // Cell. – 2013. – V. 155, № 1. – P. 160–171.

74. Considine M. J. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots / M. J. Considine, R. C. Holtzapffel, D. A. Day [et al.] // Plant Physiol. – 2002. – V. 129, № 3. – P. 949–953.

75. Curi G. C. Nuclear and mitochondrial genes encoding cytochrome *c* oxidase subunits respond differently to the same metabolic factors / G. C. Curi, E.

Welchen, R. L. Chan, D. H. Gonzalez // Plant Physiol. Biochem. – 2003. – V. 41, № 8. – P. 689–693.

76. Davies K. M. Structure of the yeast F_1F_O-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae / K. M. Davies, C. Anselmi, I. Wittig [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – V. 109. – P. 13602–13607.

77. Diaz F. Cytochrome *c* oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts / F. Diaz, H. Fukui, S. Garcia, C. T. Moraes // Mol. Cell. Biol. – 2006. – V. 26, № 13. – P. 4872–4881.

78. Dienhart M. K. The yeast Aac2 protein exists in physical association with the cytochrome *bc1* COX supercomplex and the TIM23 machinery / M. K. Dienhart, R. A. Stuart // Mol. Biol. Cell. – 2008. – V. 19. – P. 3934–3943.

79. Douce R. Mitochondria in higher plants: structure, function and biogenesis / R. Douce. – London: Acad. Press, 1985. – 327 p.

80. Dudkina N. V. Interaction of complexes I, III, and IVwithin the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography / N. V. Dudkina, M. Kudryashev, H. Stahlberg, E. J. Boekema // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – V. 108. – P. 15196–15200.

81. Dudkina N. V. Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane / N. V. Dudkina, J. Heinemeyer, S. Sunderhaus [et al.] // Trends Plant Sci. – 2006. – V. 11. – P. 232–240.

82. Dudkina N. V. Row-like organization of ATP synthase in intact mitochondria determined by cryo-electron tomography / N. V. Dudkina, G. T. Oostergetel, D. Lewejohann [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – V. 1797, № 2. – P. 272–277.

83. Dudkina N. V. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III / N. V. Dudkina, H. Eubel, W. Keegstra [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005a. – V. 102. – P. 3225–3229.

84. Dudkina N. V. Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane /

N. V. Dudkina, J. Heinemeyer, W. Keegstra [et al.] // FEBS Lett. – 2005b. – V. 579, № 25. – P. 5769–5772.

85. Dudkina N. V. The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes / N. V. Dudkina, S. Sunderhause, E. J. Boekema, H. P. Braun // J. Bioenerg. Biomembr. – 2008. – V. 40. – P. 419–424.

86. Dure III L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation / III L. Dure // Plant J. – 1993. – V. 3. – P. 363–369.

87. Efremov R. G. The architecture of respiratory complex I / R. G. Efremov, R. Baradaran, L. A. Sazanov // Nature. – 2010. – V. 465. – P. 441–445.

88. Elhafez D. Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in arabidopsis: interaorganelle location and expression / D. Elhafez, M. W. Murcha, R. Clifton [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2006. – V. 47. – P. 43–54.

89. Engqvist M. Two D-2-hydroxy-acid dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* with catalytic capacities to participate in the last reactions of the methylglyoxal and beta-oxidation pathways / M. Engqvist, M. F. Drincovich, U. I. Flugge, V. G. Maurino // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284. – P. 25026–25037.

90. Eubel H. Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria / H. Eubel, J. Heinemeyer, H.P. Braun // Plant Physiol. – 2004. – V. 134. – P. 1450–1459.

91. Eubel H. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II / H. Eubel, L. Jansch, H. P. Braun // Plant Physiol. – 2003. – V. 133. – P. 274–286.

92. Finnegan P. M. Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants // Plant mitochondria: from genome to function, V. 17 in Advances in Photosynthesis and Respiration / P. M. Finnegan, K. L. Soole, A. L. Umbach; D. A. Day, A. H. Millar, J. Whelan. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. – P. 163–230.

93. Fiorani F. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of arabidopsis AOX1a transgenic plants / F. Fiorani, A. L. Umbach, J. N. Siedow // Plant Physiol. – 2005. – V. 139. – P. 1795–1805.

94. Fontanesi F. Assembly of mitochondrial cytochrome *c*-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process / F. Fontanesi, I. C. Soto, D. Horn, A. Barrientos // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2006. – V. 291, № 6. – P. 1129–1147.

95. Fowler L. R. Studies on the electron transfer system / L. R. Fowler, H. S. Richardson // J. Biol. Chem. – 1963. – V. 238. – P. 456–463.

96. Garcia Montes de Oca L. Y. The composition of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes / L. Y. Garcia Montes de Oca, A. Chagolla-Lopez, L. Gonzalez de la Vara [et al.] // J. Bioenerg. Biomembr. – 2012. – V. 44, № 4. – P. 473–486.

97. Genova M. L. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes / M. L. Genova, G. Lenaz // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – V. 1837, № 4. – P. 427–443.

98. Giraud M. F. Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? / M. F. Giraud, P. Paumard, V. Soubannier [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – V. 1555, № 1–3. – P. 174–180.

99. Glaser E. Import of nuclear-encoded mitochondrial proteins / E. Glaser, J. Whelan // In D. C. Logan, ed. Plant mitochondria. St. Andrews: Blackwell Publishing, 2007. –P. 97–140.

100. Gohil V. M. Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent / V. M. Gohil, P. Hayes, S. Matsuyama [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, № 41. – P. 42612–42618.

101. Gresser M. J. Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F_1 adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate, and

oxygen exchange measurements with an alternating three-site model / M. J. Gresser, J. A. Myers, P. D. Boyer // J. Biol. Chem. – 1982. – V. 257. – P. 12030–12038.

102. Guillot-Salomon T. Phospholipids and polypeptides in the outer membrane of maise mitochondria / T. Guillot-Salomon, R. Remy, C. Cantrel [et al.] // Phytochemistry. – 1997. – V. 44. – P. 29–43.

103. Gupta K. J. Plant respiratory metabolism: a special focus on the physiology of beetroot (*Beta Vulgaris* L.) mitochondria / K. J. Gupta, H. Rolletschek // In B. Neelwarne, ed. Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications. New York: Springer, 2013. – P. 91–104.

104. Gupta K. J. Regulation of respiration when the oxygen availability changes / K. J. Gupta, A. Zabalza, J. T. van Dongen // Physiol. Plant. – 2009. – V. 137, № 4. – P. 383–391.

105. Guy C. L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism / C. L. Guy // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1990. – V. 41. – P. 187–223.

106. Hackenbrock C. R. The random collision model and a critical assessment of the diffusion and collision in mitochondrial electron transport / C. R. Hackenbrock, B. Chazotte, S. Gupta // J. Bioenerg. Biomembr. – 1986. – V. 18. – P. 331–368.

107. Hara M. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco / M. Hara, S. Terashima, T. Fukaya, T. Kuboi // Planta. – 2003. – V. 217, № 2. – P. 290–298.

108. Hatefi Y. Studies on the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-coenzyme Q reductase / Y. Hatefi, A. G. Haavik, D. E. Griffiths // J. Biol. Chem. – 1962. – V. 237, № 5. – P. 1676–1680.

109. Hatefi Y. Studies on the electron transport system XXX. DPNH-cytochrome *c* reductase I / Y. Hatefi, A. G. Haavik, P. Jurtshuk // Biochim. Biophys. Acta. – 1961. – V. 52, № 1. – P. 106–118.

110. Hatefi Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system / Y. Hatefi // Annu. Rev. Biochem. – 1985. – V. 54. – P. 1015–1069.

111. Hatefi Y. The preparation and properties of DPNH-cytochrome *c* reductase (complex I-III of the respiratory chain) / Y. Hatefi, J. S. Rieske // Methods Enzymol. – 1967. – V. 10. – P. 225–231.

112. Heazlewood J. L. Mitochondrial complex I from arabidopsis and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits / J. L. Heazlewood, K. A. Howell, A. H. Millar //Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – V. 1604, № 3. – P. 159–169.

113. Heinemeyer J. A structural model of the cytochrome *c* reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria / J. Heinemeyer, H. P. Braun, E. J. Boekema, R. Kouril // J. Biol. Chem. – 2007. – V. 282. – P. 12240–12248.

114. Hildebrandt T. M. Modulation of sulfide oxidation and toxicity in rat mitochondria by dehydroascorbic acid / T. M. Hildebrandt // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – V. 1807. – P. 1206–1213.

115. Hodges D. M. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds / D. M. Hodges, J. M. DeLong, C. F. Forney, R. K. Prange // Planta. – 1999. – V. 207. – P. 604–611.

116. Huang S. Experimental analysis of the rice mitochondrial proteome, its biogenesis and heterogeneity / S. Huang, N. L. Taylor, R. Narsai [et al.] // Plant Physiol. – 2009. – V. 149, № 2. – P. 719–734.

117. Huang S. Functional and composition differences between mitochondrial complex II in arabidopsis and rice are correlated with the complex genetic history of the enzyme / S. Huang, N. L. Taylor, R. Narsai [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2010. – V. 72, № 3. – P. 331–342.

118. Hughes D. W. Temporally modular gene expression during cotyledon development / D. W. Hughes, G. A. Galau // Genes Dev. – 1989. – V. 3. – P. 358–369.

119. Ikeda K. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle / K. Ikeda, S. Shiba, K. Horie-Inoue [et al.] // Nature Communication. – 2013. – V. 4. – P. 1–9.

120. Ishikawa H. Ultrastructural features of chilling injury: injured cells and the early events during chilling of suspension-cultured mung bean cells / H. Ishikawa // Am. J. Bot. – 1996. – V. 83. – P. 825–835.

121. Ito K. Isolation two distinct cold-inducible c DNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*) / K. Ito // Plant Science. – 1999. – V. 149. – P. 167–173.

122. Jansch L. New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria / L. Jansch, V. Kruft, U. K. Schmitz, H. P. Braun // Plant J. – 1996. – V. 9. – P. 357–368.

123. Kadowaki K. Targeting presequence acquisition after mitochondrial gene transfer to the nucleus occurs by duplication of existing targeting signal / K. Kadowaki, N. Kubo, K. Ozawa, A. Hirai // EMBO J. – 1996. – V. 15, № 23. – P. 6652–6661.

124. Kendall E. J. Free Radical and freezing injury to cell membranes of winter wheat / E. J. Kendal, B. D. McKersie // Phisiol. Plant. – 1989. – V. 76, № 3. – P. 86–94.

125. Kerscher S. J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases / S. J. Kerscher // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1459, № 2–3. – P. 274–283.

126. Khalimonchuk O. Biogenesis of cytochrome *c* oxidase / O. Khalimonchuk, G. Rodel // Mitochondrion. – 2005. – V. 5, № 6. – P. 363–388.

127. Khristolyubova N. V. Studies of the functional activity of mitochondria and cell ultrastructure of the coleoptile in wheat, *Agropyron* and their hybrids (incomplete amphidiploids) during decreasing temperature / N. V. Khristolyubova, V. V. Khvostova, V. T. Safonova, T. K. Usova // Theoret. App. Genet. – 1974. – V. 44, № 6. – P. 255–261.

128. Klodmann J. Defining the protein complex Proteome of plant mitochondria / J. Klodmann, M. Senkler, C. Rode, H. P. Braun // Plant Physiol. – 2011. – V. 157. – P. 587–598.

129. Klodmann J. Proteomic approach to characterize mitochondrial complex I from plants / J. Klodmann, H. P. Braun // Phytochem. – 2011. – V. 72, № 10. – P. 1071–1080.

130. Konert G. Protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunit B′γ interacts with cytoplasmic ACONITASE 3 and modulates the abundance of AOX1A and AOX1D in *Arabidopsis thaliana* / G. Konert, A. Trotta, P. Kouvonen [et al.] // New Phytologist. – 2015. – V. 205, № 3. – P. 1250–1263.

131. Krause F. "Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach / F. Krause, N. H. Reifschneider, D. Vocke [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, № 46. – P. 48369–48375.

132. Kuhlbrandt W. Rotary ATPases: a new twist to an ancient machine / W. Kuhlbrandt, K. M. Davies // Trends Biochem Sci. – 2016. – V. 41. – N. 1. – P. 106–116.

133. Kurimoto K. Maintenance of growth rate at low temperature in rice and wheat cultivars with a high degree of respiratory homeostasis is associated with a high efficiency of respiratory ATP production / K. Kurimoto, A. H. Millar, H. Lambers [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2004. – V. 45. – P. 1015–1022.

134. Kwiatkowska M. Cytological changes connected with the process of adaptation to low temperatures in the coleoptile epidermis of *Agropiron glaucum* / M. Kwiatkowska // Acta Soc. Bot. Pol. – 1970. – V. 39, № 2. – P. 361–371.

135. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.

136. Laloi M. A plant cold-induced uncoupling protein / M. Laloi, M. Klein, J. W. Riesmeier [et al.] // Nature. – 1997. – V. 389. – P. 135–136.

137. LaMarche A. E. Isolation and characterization of COX12, the nuclear gene for a previously unrecognized subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *c*

oxidase / A. E. LaMarche, M. I. Abate, S. H. Chan, B. L. Trumpower // J. Biol. Chem. – 1992. – V. 267, № 31. – P. 22473–22480.

138. Lapuente-Brun E. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain / E. Lapuente-Brun, R. Moreno-Loshuertos, R. Acin-Perez [et al.] // Science. – 2013. – V. 340. – P. 1567–1570.

139. Lee S. H. Chilling root temperature causes rapid ultrastructural changes in cortical cells of cucumber (*Cucumis sativus* L.) root tips / S. H. Lee, A. P. Singh, G. C. Chung [et al.] // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53, № 378. – P. 2225–2237.

140. Lenaz G. Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions versus solid state electron channeling / G. Lenaz, M. L. Genova // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2007. – V. 292, № 4. – P. 1221–1239.

141. Lenaz G. Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation / G. Lenaz, M. L. Genova // In B. Kadenbach, ed. Mitochondrial oxidative phosphorylation: nuclear-encoded genes, enzyme regulation and pathophysiology, Marburg: Springer, 2012. – P. 107–144.

142. Li C. R. Overexpression of an alternative oxidase gene, OsAOX1a, improves cold tolerance in *Oryza sativa* L. / C. R. Li, D. D. Liang, R. F. Xu [et al.] // Gen. Mol. Res. – 2013. – V. 12, N 4. – P. 5424–5432.

143. Loubaresse M. Effects of freezing on membrane lipid peroxidation of rhododendron roots (Rhododendron cv. Demontague, Jean-Marie de Montague) / M. Loubaresse, A. Paulin, J. Dereuddre // Compt. Rend. Acad. Sci. III. – 1991. – V. 313. – P. 453–459.

144. Lynch D. V. Low temperature-induced alterations in the chloroplast and microsomal membranes of *Dunaliella salina* / D. V. Lynch, G. A. J. Thompson // Plant Physiol. – 1982. – V. 69, № 6. – P. 1369–1375.

145. Maia I. G. AtPUMP: an arabidopsis gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein / I. G. Maia, C. E. Benedetti, A. Leite [et al.] // FEBS Lett. – 1998. – V. 429. – P. 403–406.

146. Majek P. Staining of proteins for 2D SDS-PAGE using Coomassie Blue – speed versus sensitivity / P. Majek, Z. Riedelová-Reicheltová, J. Suttnar, J. E. Dyr // Electrophoresis. – 2013. – V. 34, № 13. – P. 1972–1975.

147. Majlath I. Effect of light on the gene expression and hormonal status of winter and spring wheat plants during cold hardening / I. Majlath, G. Szalai, V. Soos [et al.] // Physiol. Plant. – 2012. – V. 145. – P. 296–314.

148. Maranzana E. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I / E. Maranzana, G. Barbero, A. I. Falasca [et al.] // Antioxid. Redox. Signal. – 2013. – V. 19, № 13. – P. 1469–1480.

149. Matos A. R. Alternative oxidase involvement in cold stress response of *Arabidopsis thaliana fad2* and FAD3+ cell suspensions altered in membrane lipid composition / A. R. Matos, C. Hourton-Cabassa, D. Cicek [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2007. – V. 48. – P. 856–865.

150. Matus-Ortega M. G. New complexes containing the internal alternative NADH dehydrogenase (Ndi1) in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* / M. G. Matus-Ortega, C. A. Cardenas-Monroy, O. Flores-Herrera [et al.] // Yeast. – 2015. – V. 32, № 10. – P. 629–641.

151. McKenzie M. Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients / M. McKenzie, M. Lazarou, D. R. Thorburn, M. T. Ryan // J. Mol. Biol. – 2006. – V. 361, № 3. – P. 462–469.

152. Merkwirth C. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis / C. Merkwirth, T. Langer // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1793, № 1. – P. 27–32.

153. Meunier B. Mutations of cytochrome *c* oxidase subunits 1 and 3 in *Saccharomyces cerevisiae*: assembly defect and compensation / B. Meunier, J. W. Taanman // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – V. 1554, № 1–2. – P. 101–107.

154. Meyer E. H. Resolving and identifying protein components of plant mitochondrial respiratory complexes using three dimensions of gel electrophoresis / E.

H. Meyer, N. L. Taylor, A. H. Millar // J. Proteome Res. – 2008. – V. 7, № 2. – P. 786–794.

155. Michalecka A. M. Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light / A. M. Michalecka, A. S. Svensson, F. I. Johansson [et al.] // Plant Physiol. – 2003. – V. 133. – P. 642–652.

156. Mileykovskaya E. Arrangement of the respiratory chain complexes in *Saccharomyces cerevisiae* supercomplex III_2IV_2 revealed by single particle cryo-electron microscopy / E. Mileykovskaya, P. A. Penczek, J. Fang [et al.] // J. Biol. Chem. – 2012. – V. 287, № 27. – P. 23095–23103.

157. Mileykovskaya E. Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes / E. Mileykovskaya, W. Dowhan // Chem. Phys. Lipids. – 2014. – V. 179. – P. 42–48.

158. Millar A. H. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses / A. H. Millar, V. Mittova, G. Kiddle [et al.] // Plant Physiol. – 2003. – V. 133. – P. 443–447.

159. Millar A. H. Mitochondrial cytochrome *c* oxidase and succinate dehydrogenase contain plant-specific subunits / A. H. Millar, H. Eubel, L. Jansch [et al.] // Plant Mol Biol. – 2004a. – V. 56. – P. 77–89.

160. Millar A. H. Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants / A. H. Millar, J. Whelan, K. L. Soole, D. A. Day // Annu. Rev. Plant Biol. – 2011. – V. 62. – P. 79–104.

161. Millar A. H. Changes in the mitochondrial proteome during the anoxia to air transition in rice focus around cytochrome-containing respiratory complexes / A. H. Millar, A. E. Trend, J. L. Heazlewood // J. Biol. Chem. – 2004b. – V. 279, № 38. – P. 39471–39478.

162. Minauro-Sanmiguel F. Structure of dimericmitochondrial ATP synthase: novel F_O bridging features and the structural basis ofmitochondrial cristae biogenesis /

F. Minauro-Sanmiguel, S. Wilkens, J. J. Garcia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – V. 102, № 35. – P. 12356–12358.

163. Mishra S. Prohibitin: a potential target for new therapeutics / S. Mishra, L. C. Murphy, B. L. G. Nyomba, L. J. Murphy // Trends in Molecular Medicine. – 2005. – V. 11, № 4. – P. 192–197.

164. Mizuno N. Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat / N. Mizuno, A. Sugie, F. Kobayashi, S. Takumi // Plant Physiol. – 2008. – V. 165, № 4. – P. 462–467.

165. Moller I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I. M. Moller // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – V. 52. – P. 561–591.

166. Moore A. L. Compelling EPR evidence that the alternative oxidase is a diiron carboxylate protein / A. L. Moore, J. E. Carre, C. Affourtit [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – V. 1777. – P. 327–330.

167. Moore A. L. Unraveling the heater: New insights into the structure of the alternative oxidase / A. L. Moore, T. Shiba, L. Young [et al.] // Annu. Rev. Plant Biol. – 2013. – V. 64. – P. 637–663.

168. Moreno-Lastres D. Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly / D. Moreno-Lastres, F. Fontanesi, I. Garcia-Consuegra [et al.] // Cell Metab. – 2012. – V. 15, № 3. – P. 324–335.

169. Nakagawa T. Molecular cloning of a cDNA for the smallest nuclear-encoded subunit of sweet potato cytochrome *c* oxidase: analysis with the cDNA of the structure and import into mitochondria of the subunit / T. Nakagawa, M. Maeshima, K. Nakamura, T. Asahi // Eur. J. Biochem. – 1990. – V. 191, № 3. – P. 557–561.

170. Nantes I. L. Low temperature and agin-promotored expression of PUMP in potato tuber mitochondria / I. L. Nantes, M. M. Fagian, R. Catisti [et al.] // FEBS Lett. – 1999. – V. 457. – P. 103–106.

171. Nijtmans G. Assembly of cytochrome-*c* oxidase in cultured human cells / L. G. Nijtmans, J. W. Taanman, A. O. Muijsers [et al.] // Eur. J. Biochem. – 1998. – V. 254, № 2. – P. 389–394.

172. Ohtsu K. Characterization and expression of the genes for cytochrome *c* oxidase subunit VIb (COX6b) from rice and *Arabidopsis thaliana* / K. Ohtsu, M. Nakazono, N. Tsutsumi, A. Hirai // Gene. – 2001. – V. 264, № 2. – P. 233–239.

173. Ow Y. L. Cytochrome *c*: functions beyond respiration / Y. L. Ow, D. R. Green, Z. Hao, T. W. Mak // Nature Rev. Mol. Cell Biol. – 2008. – V. 9. – P. 532–542.

174. Paumard P. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology / P. Paumard, J. Vaillier, B. Coulary [et al.] // EMBO J. – 2002. – V. 21, № 3. – P. 221–230.

175. Pearce D. A. Degradation of cytochrome oxidase subunits in mutants of yeast lacking cytochrome *c* and suppression of the degradation by mutation of *yme1* / D. A. Pearce, F. Sherman // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270, № 36. – P. 20879–20882.

176. Perales M. Disruption of a nuclear gene encoding a mitochondrial gamma carbonic anhydrase reduces complex I and supercomplex I+III_2 level sand alters mitochondrial physiology in arabidopsis / M. Perales, H. Eubel, J. Heinemeyer [et al.] // J. Mol. Biol. – 2005. – V. 350. – P. 263–277.

177. Peters K. A structural investigation of complex I and I+III_2 supercomplex from *Zea mays* at 11–13 Å resolution: assignment of the carbonic anhydrase domain and evidence for structural heterogeneity within complex I / K. Peters, N. V. Dudkina, L. Jansch [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – V. 1777. – P. 84–93.

178. Peters K. Complex I–complex II ratio strongly differs in various organs of *Arabidopsis thaliana* / K. Peters, M. Nieben, C. Peterhansel [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2012. – V. 79, № 3. – P. 273–284.

179. Pfeiffer K. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes / K. Pfeiffer, V. Gohil, R. A. Stuart [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278, № 52. – P. 52873–52880.

180. Pilkington S. J. Structural organization of complex I from bovine mitochondria / S. J. Pilkington, J. M. Arizmendi, I. M. Fearnley [et al.] // Biochem. Soc. Trans. – 1993. – V. 21, № 1. – P. 26–31.

181. Pineau B. Targeting the NAD7 subunit to mitochondria restores a functional complex I and a wild type phenotype in the *Nicotiana sylvestris* CMS II mutant lacking *nad7* / B. Pineau, C. Mathieu, C. Gerard-Hirne [et al.] // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280, № 28. – P. 25994–26001.

182. Pineau B. The importance of cardiolipin synthase for mitochondrial ultrastructure, respiratory function, plant development, and stress responses in arabidopsis / B. Pineau, M. Bourge, J. Marion [et al.] // Plant Cell. – 2013. – V. 25. – P. 4195–4208.

183. Ramirez-Aguilar S. J. The composition of plant mitochondrial supercomplexes changes with oxygen availability / S. J. Ramirez-Aguilar, M. Keuthe, M. Rocha [et al.] // J. Biol. Chem. – 2011. – V. 286. – P. 43045–43053.

184. Rasmusson A. G. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria / A. G. Rasmusson, K. L. Soole, T. E. Elthon // Annu. Rev. Plant Biol. – 2004. – V. 55. – P. 23–39.

185. Rasmusson A. G. Rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases in plants: immunodetection and distribution of native proteins in mitochondria / A. G. Rasmusson, S. C. Agius // Plant Physiol. Biochem. – 2001. – V. 39. – P. 1057–1066.

186. Rexroth S. Dimeric H^+-ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* / S. Rexroth, J. M. Meyer zu Tittingdorf, H. J. Schwassmann [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – V. 1658, № 3. – P. 202–211.

187. Ribas-Carbo M. The electron partitioning between the cytochrome and alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivars of maize differing in chilling sensitivity / M. Ribas-Carbo, R. Aroca, M. A. Gonzalez-Meler [et al.] // Plant Physiol. – 2000. – V. 122. – P. 199–204.

188. Rurek M. Biogenesis of mitochondria in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) curds subjected to temperature stress and recovery involves regulation of

the complexome, respiratory chain activity, organellar translation and ultrastructure / M. Rurek, A. M. Woyda-Ploszczyca, W. Jarmuszkiewicz // Biochim. Biophys. Acta. – 2015. – V. 1847. – P. 399–417.

189. Rurek M. Plant mitochondria under a variety of temperature stress conditions / M. Rurek // Mitochondrion. – 2014. – V. 19. – P. 289–294.

190. Sabar M. Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis / M. Sabar, J. Balk, C. J. Leaver // Plant J. – 2005. – V. 44, № 5. – P. 893–901.

191. Sanyal A. Heat shock protein HSP60 can alleviate the phenotype of mitochondrial RNA-deficient temperature-sensitive mna2 pet mutants / A. Sanyal, A. Harington, C. J. Herbert [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1995. – V. 246. – P. 56–64.

192. Savitch L. V. Feedback-limited photosynthesis and regulation of sucrose-starch accumulation during cold acclimation and low-temperature stress in a spring and winter wheat / L. V. Savitch, G. R. Gray, N. P. A. Huner // Planta. – 1997. – V. 201, № 1. – P. 18–26.

193. Sazanov L. A. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus* / L. A.Sazanov, P. Hinchliffe // Science. – 2006. – V. 311, № 5766. – P. 1430–1436.

194. Schafer E. Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I_1+III_2+IV_1 from bovine heart mitochondria / E. Schafer, N. A. Dencher, J. Vonck, D. N. Parcej // Biochemistry. – 2007. – V. 46. – P. 12579–12585.

195. Schagger H. Respiratory chain supercomplexes / H. Schagger // IUBMB Life. – 2001. – V. 52, № 3–5. – P. 119–128.

196. Schagger H. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria / H. Schagger // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – V. 1555, № 1–3. – P. 154–159.

197. Schagger H. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria / H. Schagger, K. Pfeiffer // EMBO J. – 2000. – V. 19, № 8. – P. 1777–1783.

198. Schlame M. Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism / M. Schlame, M. Ren // FEBS Lett. – 2006. – V. 580, № 23. – P. 5450–5455.

199. Schulte U. A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetics and biogenesis / U. Schulte, M. Arrerretz, H. Schneider [et al.] // Nature. – 1989. – V. 339. – P. 147–149.

200. Sharpley M. S. Interactions between phospholipids and NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine mitochondria / M. S. Sharpley, R. J. Shannon, F. Draghi, J. Hirst // Biochemistry. – 2006. – V. 45. – P. 241–248.

201. Shi K. Flexible change and cooperation between mitochondrial electron transport and cytosolic glycolysis as the basis for chilling tolerance in tomato plants / K. Shi, L. J. Fu, S. Zhang [et al.] // Planta. – 2013. – V. 237. – P. 589–601.

202. Smith C. Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress / C. Smith, M. Barthet, V. Melino [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2011. – V. 52, № 7. – P. 1222–1237.

203. Stewart C. R. Seedling growth, mitochondrial characteristics, and alternative respiratory capacity of corn genotypes differing in cold tolerance / C. R. Stewart, B. A. Martin, L. Reding, S. Cerwick // Plant Physiol. – 1990. – V. 92, № 3. – P. 761–766.

204. Strand A. Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates / A. Strand, V. Hurry, P. Gustafsson, P. Gardestrom // Plant J. – 1997. – V. 12, № 3. – P. 605–614.

205. Strauss M. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane / M. Strauss, G. Hofhaus, R. R. Schroder,W. Kuhlbrandt // EMBO J. – 2008. – V. 27. – P. 1154–1160.

206. Strogolova V. Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc_1-

cytochrome *c* oxidase supercomplex / V. Strogolova, A. Furness, M. Robb-McGrath [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2012. – V. 32. – P. 1363–1373.

207. Stroh A. Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans* / A. Stroh, O. Anderka, K. Pfeiffer [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279. – P. 5000–5007.

208. Stupnikova I. Pea seed mitochondria are endowed with a remarkable tolerance to extreme physiological temperatures / I. Stupnikova, A. Benamar, D. Tolleter [et al.] // Plant Physiol. – 2006. – V. 140. – P. 326–335.

209. Suga M. Distinguishing between Cl^- and O_2^{2-} as the bridging element between Fe^{3+} and Cu^{2+} in resting-oxidized cytochrome *c* oxidase / M. Suga, N. Yano, K. Muramoto [et al.] // Acta Cryst. – 2011. – V. 67. – P. 742–744.

210. Sugie A. Overexpression of wheat alternative oxidase gene Waox1a alters respiration capacity and response to reactive oxygen species under low temperature in transgenic arabidopsis / A. Sugie, N. Naydenov, N. Mizuno [et al.] // Gen. Genet. Syst. – 2006. – V. 81. – P. 349–354.

211. Sun F. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein Complex II / F. Sun, X. Huo, Y. Zhai [et al.] // Cell. – 2005. – V. 121, № 7. – P. 1043–1057.

212. Sunderhaus S. Carbonic anhydrase subunits form a matrix exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants / S. Sunderhaus, N. V Dudkina, L. Jansch [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – V. 281. – P. 6482–6488.

213. Sunderhaus S. Two-Dimensional Blue Native/Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the characterization of mitochondrial protein complexes and supercomplexes / S. Sunderhaus, H. Eubel, H. P. Braun // Methods Mol. Biol. – 2007. – V. 372. – P. 315–324.

214. Svensson A. S. Cold stress decreases the capacity for respiratory NADH oxidation in potato leaves / A. S. Svensson, F. I. Johansson, I. M. Moller, A. G. Rasmusson // FEBS Lett. – 2002. – V. 517. – P. 79–82.

215. Takumi S. Characterization of two non-homoeologous nuclear genes encoding mitochondrial alternative oxidase in common wheat / S. Takumi, M. Tomioka, K. Ito [et al.] // Gen. Genet. Syst. – 2002. – V. 77. – P. 81–88.

216. Taylor N. L. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome / N. L. Taylor, J. L. Heazlewood, D. A. Day, A. H. Millar // Mol. Cell. Proteomics. – 2005. – V. 4. – P. 1122–1133.

217. Theiss A. L. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease / A. L. Theiss, S. V. Sitaraman // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – V. 1813, № 6. – P. 1137–1143.

218. Timmons T. M. Protein blotting and immunodetection / T. M. Timmons, B. S. Dunbar // Methods Enzymol. – 1990. – V. 182. – P. 679–701.

219. Ugalde C. Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency / C. Ugalde, R. J. Janssen, L. P. van den Heuvel [et al.] // Hum. Mol. Genet. – 2004. – V. 13. – P. 659–667.

220. Umbach A. L. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzime activity / A. L. Umbach, J. N. Siedow // Plant Physiol. – 1993. – V. 103. – P. 845–854.

221. Vagujfalvi A. Frost hardiness depending on carbohydrate changes during cold acclimation in wheat / A. Vagujfalvi, I. Kerepesi, G. Galiba [et al.] // Plant Science. – 1999. – V. 144. – P. 85–92.

222. Vanlerberghe G. C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants / G. C. Vanlerberghe // Int. Mol. Sci. – 2013. – V. 14. – P. 6805–6847.

223. Vempati U. D. Lack of cytochrome *c* in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV / U. D. Vempati, X. Han, C. T. Moraes // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284. – P. 4383–4391.

224. Vercesi A. E. PUMPing Plants / A. E. Vercesi, L. S. Martins, M. A. P. Silva [et al.] // Nature. – 1995. – V. 375. – P. 24.

225. Vercesi A. E. The discovery of an uncoupling mitochondrial protein in plants / A. E. Vercesi // Biosci. Rep. 2001. – V. 21, № 2. – P. 195–200.

226. Vukotic M. Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex / M. Vukotic, S. Oeljeklaus, S. Wiese [et al.] // Cell Metab. – 2012. – V. 15, № 3. – P. 336–347.

227. Wang J. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature / J. Wang, N. Rajakulendran, S. Amirsadeghi, C. Vanlerberghe // Physiol. Plant. – 2011. – V. 142. – P. 339–351.

228. Weishaupt A. Selective removal of subunit VIb increases the activity of cytochrome c oxidase / A. Weishaupt, B. Kadenbach // Biochemistry. – 1992. – V. 46. – P. 11477–11481.

229. Welchen E. Biogenesis and supramolecular organization of the oxidative phosphorylation system in plants / E. Welchen, J. Klodmann, H.-P. Braun // In F. Kempken, ed. Plant Mitochondria. New York: Springer, 2011. – P. 327–355.

230. Welin B. V. Characterization and differential expression of dhn/lea/rab-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana* / B. V. Welin, A. Olson, M. Nylander, E. T. Palva // Plant Mol. Biol. – 1994. – V. 26. – P. 131–144.

231. Winge D. R. Sealing the mitochondrial respirasome / D. R.Winge // Mol. Cell Biol. – 2012. – V. 32. – P. 2647–2652.

232. Wittig I. Electrophoretic methods to isolate protein complexes from mitochondria / I. Wittig, H. Schagger // Methods in cell biology – 2007. – V. 80. – P. 723–741.

233. Wittig I. Structural organization of mitochondrial ATP synthase / I. Wittig, H. Schagger // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – V. 1777. – P. 592–598.

234. Yankovskaya V. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation / V. Yankovskaya, R. Horsefield, S. Tornroth [et al.] // Science – 2003. – V. 299. – P. 700–704.

235. Zhang M. Cardiolipin is essential for organi-zation of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria / M. Zhang, E. Mileykovskaya, W. Dowhan // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280, № 33. – P. 29403–29408.

236. Zhang M. Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane / M. Zhang, E. Mileykovskaya, W. Dowhan // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277, № 46. – P. 43553–43556

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)

Состав суперкомплексов системы OXPHOS у разных живых организмов

Организм		$I+III_2$	III_2+IV_{1-2}	$I+III_2+IV_{1-4}$	V_2	$I+III_2+V(V_2)$	$II+III_2+IV$	$I+NDA+III_2+IV$	$АФ+III_2+IV$	$Va(b)+АФ$
РАСТЕНИЯ	*Arabidopsis thaliana* (Eube et al., 2003; Klodmann et al., 2011)	+			+					
	Hordeum vulgare (Eubel et al., 2003)	+								
	Phaseolus vulgaris (Eubel et al., 2003)	+								
	Solanum tuberosum (Bultema et al., 2009)	+	+	+	+					
	Spinacia oleracea (Krause et al., 2004)									
	Nicotiana sylvestris (Pineau et al., 2005)	+								

Организм		$I+III_2$	III_2+IV_{1-2}	$I+III_2+IV_{1-4}$	V_2	$I+III_2+V(V_2)$	$II+III_2+IV$	$I+NDA+III_2+IV$	$АФ+III_2+IV$	$Va(b)+АФ$
РАСТЕНИЯ	*Helianthus annuus* (Sabar et al.,2005)			+						
	Zea mays (Peters et al., 2008)	+			+					
	Asparagus officinalis (Dudkina et al., 2006)	+	+							
	Phyllostachys edulis (Chien et al., 2011)	+			+	+				
	Pisum sativum L		+	+	+		+	+	+	+
ВОДОРОСЛИ	*Chlamydomonas reinhardtii* (Chaban et al., 2014)				+					
	Polytomella spp. (Dudkina et al., 2005a)	+			+					
ГРИБЫ	*Sacharamyces cerevisiae* (Arnold et al., 1998, Schagger, Pfeiffer 2000)		+		+					

Продолжение приложения А

Организм		$I+III_2$	III_2+IV_{1-2}	$I+III_2+IV_{1-4}$	V_2	$I+III_2+V(V_2)$	$II+III_2+IV$	$I+NDA+III_2+IV$	$АФ+III_2+IV$	$Va(b)+АФ$
ГРИБЫ	*Yarrowia lipolytica* (Chabanet al., 2014)	+	+	+	+					
	Podospora anserine (Chabanet al., 2014)	+	+	+	+					
	Neurospora crassa (Chabanet al., 2014)		+	+	+					
ПРОСТЕЙШИЕ	*Tetrahymena thermophila* (Balabaskaran Nina et al., 2010)	+			+					
	Plasmodium falciparum (Chabanet al., 2014)				+					
ЖИВОТНЫЕ	*Bos taurus* (Schagger, Pfeiffer, 2000)	+	+	+	+					
	Mouse (Acin-Perez et al., 2008)	+	+	+	+		+			

Продолжение приложения А

Организм		$I+III_2$	III_2+IV_{1-2}	$I+III_2+IV_{1-4}$	V_2	$I+III_2+V(V_2)$	$II+III_2+IV$	$I+NDA+III_2+IV$	$АФ+III_2+IV$	$Va(b)+АФ$
ЖИВОТНЫЕ	*Homo sapiens* (Chaban et al., 2014)	+	+	+	+					

Примечание: знаком «+» обозначено наличие соответствующего суперкомплекса у вида. Обозначения: $I+III_2$, III_2+IV_{1-2}, $I+III_2+IV_{1-4}$, V_2, $I+III_2+V(V_2)$, $II+III_2+IV$, $I+NDA+III_2+IV$ – соответствующие суперкомплексы системы окислительного фосфорилирования; $АФ+III_2+IV$ – дыхательный суперкомплекс $NDA+NDB+III_2+IV$; $Va(b)+АФ$ – суперкомплекс $Va(b)+$ $NDA+NDB+AOX$. Зеленым цветом выделены результаты данного исследования.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(справочное)

Относительные молекулярные массы дыхательных комплексов в разных организмах

	ОРГАНИЗМ	ФОРМА	МАССА	ИСТОЧНИК
КОМПЛЕКС I	*Arabidopsis thaliana*	**I**	1000 кДа	Heazlewood et al., 2003; Sunderhaus et al., 2007
	Oryza sativa	**I**	1000 кДа	Heazlewood et al., 2003
	Solanum tuberosum	**I**	1000 кДа	Eubel et al., 2003
	Hordeum vulgare	**I**	1000 кДа	Eubel et al., 2003
	Phaseolus vulgaris	**I**	1000 кДа	Eubel et al., 2003
	Bos taurus	**I**	900 кДа	Pilkington et al., 1993
		I	1000 кДа	Wittig, Schagger, 2007
	Termus thermophilus	**I**	523 кДа	Efremov et al., 2010
	Pisum sativum L.	**I**	1000-1300 кДа	Данное исследование
КОМПЛЕКС II	*Arabidopsis thaliana*	**II**	100–180 кДа	Eubel et al., 2003; Huang et al., 2010
		II	120 кДа	Sunderhaus et al., 2007
	Solanum tuberosum	**II**	150 кДа	Eubel et al., 2003
	Phaseolus vulgaris	**II**	150 кДа	Eubel et al., 2003
	Mouse	**II**	140–180 кДа	Huang et al., 2010
	Oryza sativa	**II**	100 кДа	Huang et al., 2010
	Bos taurus	**II**	130 кДа	Wittig, Schagger, 2007
	Pisum sativum L.	**II**	220 кДа	Данное исследование
КОМПЛЕКС III	*Arabidopsis thaliana*	**III_2**	480 кДа	Eubel et al., 2003; Sunderhaus et al., 2007
		III_2	500 кДа	Welchen et al., 2011
	Bos taurus	**III_2**	490 кДа	Wittig, Schagger, 2007
	Pisum sativum L.	**III_2**	500 кДа	Данное исследование
КОМПЛЕКС IV	*Solanum tuberosum*	**IVa** **IVb**	230 (350) кДа 160 (280) кДа	Jansch et al., 1996 (Eubel et al., 2004)
	Sacharamyces cerevisiae	**IV**	400 кДа	Chen et al., 2012

	ОРГАНИЗМ	ФОРМА	МАССА	ИСТОЧНИК
КОМПЛЕКС IV	*Arabidopsis thaliana*	**IVa** **IVb**	300 (350) кДа 220 (280) кДа	Eubel et al., 2003 (Millar et al., 2004a)
		IV	250 кДа	Sunderhaus et al., 2007
	Phaseolus vulgaris	**IVa** **IVb**	350 кДа 270 кДа	Eubel et al., 2004
	Hordeum vulgare	**IVb**	220 (280) кДа	Eubel et al., 2003 (Millar et al., 2004a)
	Bos taurus	**IV**	200 кДа	Wittig, Schagger, 2007
	Pisum sativum L.	**IVa** **IVb** **IVc**	480 кДа 430 кДа 340 кДа	Данное исследование
КОМПЛЕКС V	*Solanum tuberosum*	**V_2**	1600 кДа	Chaban et al., 2014
	Polytomella spp.	**V**	600 кДа	Dudkina et al., 2011, Eubel et al., 2004
	Chlamydomonas reinhardtii	**V_2**	1600 кДа	Chaban et al., 2014
	Arabidopsis thaliana	**V_2**	1100 кДа	Eubel et al., 2004
		V	580 кДа	Eubel et al., 2003
		V	600 кДа	Sunderhaus et al., 2007
	Solanum tuberosum	**V_2**	1100 кДа	Eubel et al., 2004
		V	600 кДа	Jansch et al., 1996
	Hordeum vulgare	**V_2**	1100 кДа	Eubel et al., 2004
	Sacharamyces cerevisiae	**V_2** **V**	1000 кДа 500 кДа	Arnold et al., 1998
	Bos taurus	**V_2** **V**	1400 кДа 700 кДа	Wittig, Schagger, 2007
	Pisum sativum L.	**V_2** **Va** **Vb**	1600 кДа 780 кДа 700 кДа	Данное исследование

Примечание: Обозначения: I, II, III_2, IVa, IVb, IVc, Va, Vb, V_2 – комплексы системы окислительного фосфорилирования I, II, III_2, IVa, IVb, IVc, Va, Vb, V_2 (димер АТФ-синтазы) соответственно.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

(справочное)

Относительное содержание и относительная активность ферментов системы OXPHOS и их ассоциаций в митохондриях контрольных проростков гороха в зонах детекции их активности на геле 1D BNE, %

	Обозначения	Суперкомплекс / комплекс	R_f	Относительное содержание, %	Относительная активность, %
Комплекс I и его ассоциации	**SC**	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,07	**10,9** [7,7;12,7]	**5,5** [4,4;8,1]
	SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,11	**20,3** [19,4; 24,1]	**21** [18,1; 22,3]
	SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,14	**9,5** [7,6; 9,7]	**8,3** [3,1; 8,9]
	SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,17	**8,1** [7,5; 9,7]	**5,6** [4,4; 8,1]
	SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,18	**4,9** [4,2; 5,6]	**3,3** [2,5;3,3]
	SC*	**$I+NDA+III_2+IV$**	R_f 0,2	**39,0** [33,1; 39,8]	**43,8** [39,6; 49,5]
	$\sum SC^I$	**Все ассоциации комплекса I**		**92,1** [88,3; 93,0]	**83,8** [81,6; 92,6]
	I	**КОМПЛЕКС I**	R_f 0,28	**7,9** [7,0; 11,7]	**16,2** [7,4;18,4]
Комплекс II и его ассоциации	**M**	**$(II+III_2+IV_{1–4})_n$**	R_f 0,01	**36,7** [30,0; 42,9]	**8,9** [7,7;10,2]
	II	**КОМПЛЕКС II**	R_f 0,7	**63,3** [57,1; 70,0]	**91,1** [89,8 92,3]
Комплекс IV и его ассоциации	**M**	**$(II+III_2+IV_{1–4})_n$**	R_f 0,01	**11,7** [9,0;12,6]	**7,9** [4,7; 8,1]
	SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,07	**8,7** [6,3; 11,0]	**2,8** [2,4; 3,6]
	SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,11	**16,6** [16,2; 20,3]	**1,7** [0,9; 2,5]
	SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,14	**7,9** [6,2;8,4]	**2,5** [1,2; 4,0]
	SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,17	**6,9** [6,2; 7,9]	**2,7** [1,8; 3,1]
	SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,18	**3,9** [3,4; 4,8]	**0,9** [0,7; 1,4]
	SC**	**$NDA+NDB+III_2+IV$**	R_f 0,33	**6,5** [6,3; 8,0]	**3,0** [2,7; 4,3]
	IVa	**КОМПЛЕКС IVa**	R_f 0,5	**5,0** [4,8; 6,1]	**15,7** [15,1; 16,7]
	IVb	**КОМПЛЕКС IVb**	R_f 0,55	**18,2** [16,3; 19,7]	**47,1** [45,9; 48,1]
	IVc	**КОМПЛЕКС IVc**	R_f 0,63	**13,3** [12,6; 14,5]	**18,0** [11,9; 18,3]
	$\sum SC^{IV}$	**Все ассоциации комплекса IV**		**64,0** [59,9; 66,0]	**19,4** [18,5; 25,2]
	$\sum$ IV	**Все монокомплексы**		**36,0** [34,0; 40,1]	**80,6** [74,8; 81,5]

	Обозначения	Суперкомплекс / комплекс	R_f	Относительное содержание, %	Относительная активность, %
Комплекс V и его ассоциации	**Va***	**Va+NDA+NDB+AOX**	R_f 0,36	**27,8** [20,3; 28,3]	**15,8** [10,4;23,6]
	Vb*	**Vb+NDA+NDB+AOX**	R_f 0,39	**72,2** [71,7; 79,7]	**84,2** [76,4; 89,6]

Примечание: Относительное содержание, % – относительное содержание белка в индивидуальной электрофоретической полосе выражено в процентах от суммарной интенсивности полос, в которых обнаружена активность соответствующего комплекса системы OXPHOS; относительная активность, % – относительная активность дыхательного фермента в каждой электрофоретической полосе выражена в процентах от суммарной интенсивности его активности во всех зонах детекции. Обозначения: M – мегакомплекс $(II+III_2+IV_{1-4})_n$, SC – суперкомплексы $I+III_2+IV_n$, SC* – суперкомплекс $I+NDA+III_2+IV$, SC** – суперкомплекс $NDA+NDB+III_2+IV$, Va(b) – суперкомплекс Va(b)+NDA+NDB+AOX; I, II, III_2, IVa, IVb, IVc, – комплексы системы окислительного фосфорилирования I, II, III_2, IVa, IVb, IVc соответственно; $\sum SC^I$, $\sum SC^{IV}$, $\sum IV$ – сумма значений относительного содержания и активности: всех суперкомплексов, в состав которых входит комплекс I (SC^I); всех суперкомплексов, в состав которых входит комплекс IV (SC^{IV}); всех отдельно расположенных комплексов IV соответственно. n=3-4. Me [25%; 75%].

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

(справочное)

Относительное содержание нативных белков и их ассоциаций в митохондриях контрольных проростков гороха, %

	Суперкомплекс / комплекс	**R_f**	**Относительное содержание, %**
M	**$(II+III_2+IV_{1–4})_n$**	R_f 0,01	**3,2** [2,5; 3,5]
SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,07	**2,4** [1,8; 3,0]
SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,11	**4,4** [4,3; 5,9]
SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,14	**2,2** [1,7; 2,4]
SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,17	**1,8** [1,8; 2,2]
SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,18	**1,1** [0,9; 1,3]
SC*	**$I+NDA+III_2+IV$**	R_f 0,2	**8,6** [7,8; 9,2]
I	**КОМПЛЕКС I**	R_f 0,28	**2,0** [1,6; 2,7]
SC**	**$NDA+NDB+III_2+IV$**	R_f 0,33	**1,9** [1,7; 2,2]
Va*	**Va+NDA+NDB+AOX**	R_f 0,36	**6,6** [5,1; 7,0]
Vb*	**Vb+NDA+NDB+AOX**	R_f 0,39	**18,6** [17,1; 20,2]
III_2	**КОМПЛЕКС III_2**	R_f 0,44	**2,7** [2,3; 3,4]
IVa	**КОМПЛЕКС IVa**	R_f 0,5	**1,5** [1,3; 1,7]
		R_f 0,53	**2,5** [2,0; 2,8]
IVb	**КОМПЛЕКС IVb**	R_f 0,55	**5,3** [4,3; 5,5]
IVc	**КОМПЛЕКС IVc**	R_f 0,63	**3,7** [3,5; 3,9]
II	**КОМПЛЕКС II**	R_f 0,7	**5,4** [4,4; 6,1]
		R_f 0,73	**4,0** [3,5; 4,5]
		R_f 0,75	**3,3** [2,9; 3,7]
		R_f 0,81	**3,1** [2,7; 4,1]
		R_f 0,85	**4,8** [3,8; 5,3]
		R_f 0,9	**4,7** [3,5; 5,0]
		R_f 0,93	**6,8** [6,4;7,1]

Примечание: Относительное содержание, % – относительное содержание белка в каждой электрофоретической полосе выражено как процент интенсивности индивидуальной электрофоретической полосы от суммарной интенсивности всех электрофоретических полос на гелях 1D BNE, окрашенных Кумасси. Значения интенсивности получены на основании данных

денситометрического анализа. Обозначения: M – мегакомплекс $(II+III_2+IV_{1-4})_n$; SC – суперкомплексы $I+III_2+IV_n$; SC* – суперкомплекс $I+NDA+III_2+IV$, SC** – суперкомплекс $NDA+NDB+III_2+IV$; Va(b)* – суперкомплекс Va(b)+NDA+NDB+AOX; I, II, III_2, IVa, IVb, IVc – комплексы системы окислительного фосфорилирования I, II, III_2, IVa, IVb, IVc соответственно. n=3. Me [25%; 75%].

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

(справочное)

Процентное соотношение суперкомплексов и мегакомплексов в митохондриях контрольных проростков гороха

Обозначения	Суперкомплекс / мегакомплекс	R_f	Относительное содержание, %
M	**$(II+III_2+IV_{1–4})_n$**	R_f 0,01	**6,4** [4,9; 6,7]
SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,07	**4,9** [3,5; 5,8]
SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,11	**8,9** [8,6; 11,6]
SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,14	**4,4** [3,3; 4,6]
SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,17	**3,6** [3,5; 4,3]
SC	**$I+III_2+IV_n$**	R_f 0,18	**2,1** [1,9; 2,7]
SC*	**$I+NDA+III_2+IV$**	R_f 0,2	**16,8** [15,7;17,8]
SC**	**$NDA+NDB+III_2+IV$**	R_f 0,33	**3,5** [3,3; 4,5]
Va*	**Va+NDA+NDB+AOX**	R_f 0,36	**13,4** [10,0; 13,9]
Vb*	**Vb+NDA+NDB+AOX**	R_f 0,39	**36,3** [34,4; 39,0]

Примечание: Относительное содержание, % – содержание индивидуальных суперкомплексов и мегакомплексов, выраженное в процентах от суммарной интенсивности всех ассоциаций дыхательных комплексов. Обозначения как в приложении Г. n=3. Me [25%; 75%].

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

(справочное)

Относительная активность комплексов и суперкомплексов системы окислительного фосфорилирования при закаливании и в условиях низкотемпературного стресса

	R_f	Название комплекса / суперкомплекса	Относительная активность, % от контроля			
			Контроль	Жесткий стресс	Закаливание	Мягкий стресс
Комплекс I и его ассоциации	0,07	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**45,8** [а, г, д] [39,6; 56,9]	**61,4** [б, г] [45,3; 73,4]	**69,2** [в, д] [60,1; 83,7]
	0,11	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**81,2** [а] [77,3; 85,1]	**86,7** [б] [67,0; 93,3]	**90,8** [в] [69,1; 100,6]
	0,14	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**58,1** [а] [47,8; 77,5]	**71,1** [б] [52,0; 81,9]	**79,6** [в] [56,7; 91,9]
	0,17	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**84,1** [а] [74,7; 94,8]	**82,3** [б] [69,6; 90,2]	**94,7** [в] [85,5; 98,7]
	0,18	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**90,3** [а] [82,5; 96,9]	**76,1** [б] [66,9; 87,2]	**87,7** [в] [80,1; 94,8]
	0,2	$I+NDA+III_2+IV$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**89,3** [а] [86,2; 95,5]	**92,3** [б] [83,8; 94,7]	**91,4** [в] [85,3; 98,4]
	0,28	I	**100** [а, в] [100; 100]	**196,2** [а, г, д] [152,3; 213,4]	**102,3** [г] [90,1; 122,7]	**113,9** [в, д] [107,6; 129,0]
Комплекс II и его ассоциации	0,01	$(II+III_2+IV_{1–4})_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**76,7** [а, г, д] [60,3; 83,6]	**115,8** [б, г] [107,2; 127,6]	**120,5** [в, д] [111,1; 127,0]
	0,7	II	**100** [а] [100; 100]	**101,6** [а, г, д] [100,5; 110,0]	**98,6** [г] [90,9; 100,2]	**97,2** [д] [88,6; 100,7]
Комплекс IV и его ассоциации	0,01	$(II+III_2+IV_{1–4})_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**76,7** [а, г, д] [70,6; 93,3]	**129,7** [б, г] [107,3; 131,6]	**128,4** [в, д] [100,7; 140,9]
	0,07	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б] [100; 100]	**74,1** [а, г, д] [62,1; 89,2]	**96,9** [б, г, е] [90,0; 98,0]	**103,0** [д, е] [94,0; 111,4]
	0,11	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**82,0** [а, д] [67,6; 97,8]	**77,3** [б, е] [72,2; 87,3]	**93,5** [в, д, е] [81,0; 104,1]
	0,14	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**79,1** [а] [63,2; 92,5]	**82,6** [б] [68,6; 88,4]	**77,6** [в] [74,0; 98,2]
	0,17	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б] [100; 100]	**85,1** [а, д] [65,8; 95,9]	**84,9** [б, е] [80,9; 88,6]	**97,7** [д, е] [90,9; 107,5]
	0,18	$I+III_2+IV_n$	**100** [а, б] [100; 100]	**79,6** [а, д] [71,3; 86,5]	**86,0** [б, е] [85,3; 88,9]	**97,9** [д, е] [87,5; 107,6]
	0,33	$NDA+NDB+III_2+IV$	**100** [а, б, в] [100; 100]	**104,0** [а] [102,6; 128,4]	**106,3** [б] [101,8; 110,0]	**116,7** [в] [111,1; 134,1]
	0,5	IVa	**100** [б, в] [100; 100]	**93,8** [г, д] [87,3; 113,1]	**72,8** [б, г] [70,2; 91,2]	**84,5** [в, д] [81,7; 94,7]
	0,55	IVb	**100** [а, б, в] [100; 100]	**91,2** [а] [88,8; 95,1]	**95,1** [б] [86,0; 100]	**96,5** [в] [89,9; 99,3]
	0,63	IVc	**100** [б, в] [100; 100]	**95,8** [г, д] [88,4; 102,5]	**89,2** [б, г] [72,9; 92,3]	**86,0** [в, д] [76,9; 91,3]

Продолжение приложения Е

Комплекс V и его ассоциации	R_f	Название комплекса / суперкомплекса	Относительная активность, % от контроля			
			Контроль	**Жесткий стресс**	**Закаливание**	**Мягкий стресс**
	0,2	V_2	**100** [а, б] [100; 100]	**77,5** [а, г, д] [73,5; 87,2]	**87,3** [б, г, е] [82,9; 103,3]	**96,2** [д, е] [87,9; 105,6]
	0,36	Va+NDA+NDB+AOX	**100** [а, б] [100; 100]	**72,1** [а, г, д] [68,5; 74,7]	**89,8** [б, г, е] [74,9; 91,9]	**107,9** [д, е] [71,6; 109,2]
	0,39	Vb+NDA+NDB+AOX	**100** [а, б, в] [100; 100]	**79,1** [а, г, д] [61,7; 79,3]	**90,0** [б, г] [89,2; 101,7]	**96,0** [в, д] [86,2; 98,1]

Примечание: в таблице приведены результаты денситометрического анализа активности ферментов в зонах детекции на гелях 1D BNE. Значения отражают суммарную интенсивность окраски продукта реакции в зоне детекции фермента в соответствующем суперкомплексе или комплексе по вариантам, выраженную в процентах от контроля. Контроль принимался за 100%, Me [25%; 75%], n=3-5, а, б, в, г, д, е – различия между контролем и жестким стрессом (а), контролем и закаливанием (б), контролем и мягким стрессом (в), жестким стрессом и закаливанием (г), жестким стрессом и мягким стрессом (д), мягким стрессом и закаливанием (е) статистически значимы ($P \leq 0,05$). Статистическую значимость различий определяли по критерию Краскела-Уоллиса.