

СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
РАСТЕНИЙ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*Стрессовый белок БХШ 310:
характеристика и функции в
растительной клетке*

**А.В. Колесниченко,
О.И. Грабельных,
Т.П. Побежимова,
В.В. Колесниченко,
В.К. Войников**

Иркутск, 2004

УДК 581.1
ББК 28.57
К 60

Печатается по решению Ученого совета Сибирского Института
Физиологии и Биохимии Растений СО РАН

Ответственный редактор
д.б.н., профессор В.К. Войников

Рецензенты:

д.б.н.
д.б.н.
д.б.н.

А.В. Колесниченко, О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова,
В.В. Колесниченко, В.К. Войников

К60 Стрессовый белок БХШ 310: характеристика и функции в растительной клетке / (Отв. ред. В.К. Войников); СО РАН. Сибирский Институт Физиологии и Биохимии Растений (СИФИБР). – Иркутск: Арт-Пресс, 2004. – 225 с.

ISBN 5-98000-005-4

В монографии представлены результаты многолетних исследований одного из стрессовых белков растений – белка холодового шока с молекулярной массой 310 килodalтон. Приведены данные по распространению его в растениях, внутриклеточной локализации и охарактеризованы отдельные пулы данного белка. Особое внимание уделено влиянию данного белка на параметры энергетической активности митохондрий и процессы перекисного окисления липидов. Показана термогенная роль данного белка в митохондриях растений. Предложен механизм функционирования данного белка, заключающийся в шунтировании дыхательной цепи митохондрий во время низкотемпературного стресса.

Книга предназначена для специалистов в области физиологии и биохимии растений, а также студентов биологических специальностей высших учебных заведений. Монография подготовлена при поддержке Фонда содействия отечественной науке, грантов РФФИ 01-04-48953 и 03-04-48151 и молодежного гранта СО РАН (проект № 78).

ISBN 5-98000-005-4

ББК 28.57

Содержание	
1	ВВЕДЕНИЕ..... 7
2	БЕЛКИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА РАСТЕНИЙ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ..... 11
3	ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА НА ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ СПЕКТРЫ НАТИВНЫХ БЕЛКОВ ОЗИМЫХ РЖИ И ПШЕНИЦЫ .17
4	ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК АНТИГЕНА С ОЭП 0.30 23
4.1	ИЗУЧЕНИЕ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В СОДЕРЖАНИИ АНТИГЕНА С ОЭП 0.30 У НЕЗАКАЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ..... 23
4.2	ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК АНТИГЕНА С ОЭП 0.35 ИЗ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ РЖИ. 24
5	ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА НА СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА С МОЛ. МАССОЙ 310 КДА У ОЗИМЫХ ЗЛАКОВ 28
5.1	ВЛИЯНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ НА СОДЕРЖАНИЕ БХШ 310 32
5.2	ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БХШ 310 ВО ВРЕМЯ ЗАКАЛИВАНИЯ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ К ХОЛОДУ 33
5.3	СОДЕРЖАНИЕ СТРЕССОВОГО БЕЛКА 310 КДА В НЕОХЛАЖДЕННЫХ ПРОРОСТКАХ КОНТРАСТНЫХ ПО ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТИ ГЕНОТИПОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ. 36
5.4	ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ СИНТЕЗ БЕЛКА С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 310 КДА 37
6	ВЛИЯНИЕ БХШ 310 НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ..... 40
6.1	ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА НА ПЕРЕХОД МИТОХОНДРИЙ ЗЛАКОВ И ДВУДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ В НИЗКОЭНЕРГЕТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ 43
7	ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ, ИММУНОХИМИЧЕСКИ РОДСТВЕННЫХ БХШ 310, У ОДНОДОЛЬНЫХ И ДВУДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ 48

7.1	Идентификация и определение характеристик белков, иммунохимически родственных БХШ 310 среди цитоплазматических белков ряда культурных и дикорастущих злаков	49
7.2	Идентификация и определение характеристик белков, иммунохимически родственных БХШ 310 среди цитоплазматических белков двудольных растений	53
8	БЕЛКИ, ИММУНОХИМИЧЕСКИ РОДСТВЕННЫЕ СТРЕССОВОМУ БЕЛКУ 310 КДА И ЕГО СУБЪЕДИНИЦАМ, В МИТОХОНДРИЯХ ЗЛАКОВ	56
8.1	Поиск нативных белков, иммунохимически родственных БХШ 310, в митохондриях злаков	56
8.2	Характеристика белков, иммунохимически родственных БХШ 310, в субклеточных фракциях проростков озимой ржи	59
8.3	Влияние холодового шока на содержание и характеристики белков семейства БХШ 310 в субклеточных фракциях проростков озимой ржи	65
8.4	Изучение локализации полипептидов, иммунохимически родственных субъекдиницам стрессового белка 310 КДА, в субмитохондриальных фракциях озимой пшеницы	69
8.4.1	<i>Получение и определение чистоты мембранных фракций и матрикса митохондрий озимой пшеницы</i>	<i>69</i>
8.4.2	<i>Локализация полипептидов, иммунохимически родственных БХШ 310, в субмитохондриальных фракциях озимой пшеницы</i>	<i>71</i>
9	СРАВНЕНИЕ БХШ 310 С ДРУГИМИ ИЗВЕСТНЫМИ СТРЕССОВЫМИ РАСТИТЕЛЬНЫМИ БЕЛКАМИ: С МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ РАЗОБЩАЮЩИМ БЕЛКОМ РUMР И С ДЕГИДРИНАМИ	74
10	МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БХШ 310	76
10.1	Ассоциация БХШ 310 с митохондриями озимой пшеницы при инкубации IN VITRO	77
10.2	Сравнение влияния конститутивно синтезируемой и стрессовой формы БХШ 310 на митохондрии IN VITRO	80

11	ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВОГО БЕЛКА БХШ 310 НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ.....	84
12	МЕХАНИЗМ РАЗОБЩАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ БХШ 310 ОТЛИЧАЕТСЯ ОТ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ИЗВЕСТНЫХ РАЗОБЩАЮЩИХ БЕЛКОВ	88
12.1	Влияние БХШ 310 на функционирование различных комплексов дыхательной цепи митохондрий озимой пшеницы	88
12.2	Влияние БХШ 310 на функционирование альтернативной цитохромоксидазы.....	98
12.3	Влияние БСА, связывающего свободные жирные кислоты и ингибирующего активность УСР-подобных разобщающих белков, на активность БХШ 310.....	102
12.4	Влияние иммунохимически родственных БХШ 310 белков ряда злаков на энергетическую активность митохондрий озимой пшеницы	111
13	ВЛИЯНИЕ ПРЕЦИПИТАЦИИ ЭНДОГЕННОГО БХШ 310 АНТИСЫВОРОТКОЙ ПРОТИВ ЭТОГО БЕЛКА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ.....	115
13.1	Влияние преципитации эндогенного БХШ 310 антисывороткой против этого белка на энергетическую активность митохондрий, изолированных из стрессированных проростков	115
13.2	Влияние преципитации эндогенного БХШ 310 антисывороткой против этого белка на энергетическую активность митохондрий, изолированных из нестрессированных проростков	118
14	ВЛИЯНИЕ БХШ 310 И АНТИСЫВОРОТКИ ПРОТИВ БХШ 310 НА ГЕНЕРАЦИЮ ТЕПЛА МИТОХОНДРИЯМИ И ПРОРОСТКАМИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ	124
15	ВЛИЯНИЕ БХШ 310 НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ	130
15.1	Влияние сыворотки против БХШ 310 и неиммунной сыворотки на спонтанное ПОЛ в изолированных митохондриях озимой пшеницы	135

15.2	Динамика влияния БХШ 310 и антисыворотки против БХШ 310 на ПОЛ в изолированных митохондриях озимой пшеницы..	137
15.3	Влияние БХШ 310 на ПОЛ в эмульсии линолевой кислоты	141
15.4	Влияние БХШ 310 на различные системы перекисного окисления липидов в митохондриях озимой пшеницы.....	142
15.5	Влияние БХШ 310 на ПОЛ в митохондриях при функционировании различных комплексов дыхательной цепи изолированных растительных митохондрий.....	152
15.6	Влияние низкотемпературного стресса, активации и ингибирования известных разобщающих растительных систем на ПОЛ в проростках озимой пшеницы	162
16	УСТАНОВЛЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ БХШ 310 И МЕСТОНАХОЖДЕНИЯ ДАННОГО БЕЛКА В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЕРЕНОСЧИКОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ РАСТИТЕЛЬНЫХ МИТОХОНДРИЙ.....	167
17	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	182
18	ЛИТЕРАТУРА	196

1 ВВЕДЕНИЕ

Механизмы, обеспечивающие способность растений переносить различные, часто очень суровые, природные условия, уже давно привлекают внимание ученых. Можно утверждать, что физиология растений как наука развивалась именно из попыток ученых понять реакцию растения на изменение внешних факторов (Усманов и др., 2001). С развитием науки в XX веке исследователи, изучавшие физиологию ответа растения на стресс, получили в свое распоряжение ряд биохимических и биофизических методик, позволивших им совершить прорыв в данной области. Одной из таких методик было выделение функционально активных интактных клеточных органелл, давшая исследователям возможность изучать реакцию организма на стресс на субклеточном уровне. Другой методикой, совершившей настоящую революцию в изучении белков, стал денатурирующий электрофорез (электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия), позволивший исследователям разделить клеточные белки, охарактеризовать их по молекулярной массе, а, следовательно, и по размеру, и визуализировать изменения в составе клеточных белков под влиянием внешних и внутренних факторов. Сочетание электрофореза с иммунохимическими методами исследования белков (иммуноблоттинг) позволило выделять классы родственных белков, имеющих одинаковые антигенные детерминанты.

С применением всех этих методов за прошедшие годы было установлено, что адаптация растений к неблагоприятным низкотемпературным условиям обеспечивается на клеточном уровне многочисленными физиологическими и биохимическими механизмами. Многие из них к настоящему времени уже достаточно хорошо изучены. К ним относятся изменения в метаболизме липидов и фосфолипидов и накопление сахаров, которые позволяют избежать смертельного для растительной клетки образования

внутриклеточного льда, облегчают отток воды из клетки и предотвращают повреждение клеточных мембран.

Наконец, применение электрофоретических методов исследования позволило установить, что одним из механизмов адаптации растений к неблагоприятной температуре является так называемый «ответ на температурный стресс», обеспечивающий синтез ряда стрессовых белков в ответ на изменение температуры (Lindquist, 1986). К настоящему времени уже достаточно хорошо изучены изменения экспрессии генов в ответ на повышение температуры, приводящие к индукции синтеза белков теплового шока. Установлено, что в ответ на резкое повышение температуры среды происходит глобальная перестройка метаболизма клетки, включающая в себя замедление или прекращение синтеза обычных клеточных белков и индукцию синтеза белков, получивших название белки теплового шока (БТШ) или стрессовые белки. Синтез многих видов БТШ происходит и в ответ на другие стрессы, такие как аноксия, обработка этанолом, солями тяжелых металлов и др. (Nover et al., 1984). Индукция синтеза БТШ коррелирует с развитием устойчивости к более жесткому стрессу. БТШ синтезируются как в прокариотической, так и эукариотической клетке и являются одними из самых консервативных из известных белков (Lindquist, 1986). Исследование механизмов, контролирующих экспрессию генов БТШ, дало важную модель изучения регуляции экспрессии генов (Rougvie, Lis, 1988). В то же время синтез стрессовых белков под действием гипотермии по сравнению с другими стрессами все еще гораздо менее изучен. Только в последнее десятилетие получены данные, свидетельствующие о том, что воздействие низкотемпературного стресса вызывает в растениях синтез специфических, стрессовых, белков, по аналогии с белками теплового шока названных белками холодового шока (Guu, 1990). В настоящее время установлено, что синтез этих белков играет важную роль в приобретении растением устойчивости к действию неблагоприятного температурного фактора. В то

же время о структуре и функциях этих стрессовых белков известно значительно меньше, чем о структуре и функциях белков теплового шока.

К настоящему времени, кроме ряда ферментов, чувствительных к действию низкотемпературного стресса и изменяющих свои активности и характеристики во время него, выделено несколько групп белков низкотемпературного стресса со специфическими функциями (Колесниченко и др., 2000б, Колесниченко, Войников, 2003). Во-первых, это молекулярные шапероны и дегидрины, защищающие во время низкотемпературного стресса макромолекулы и мембраны растительной клетки от повреждений, связанных с происходящим обезвоживанием и термоденатурацией макромолекул (Close, 1996). Во-вторых, в последние годы у ряда высокоморозостойких растений открыта и изучена группа антифризных белков, выделяемых растительной клеткой в апопласт и межклеточное пространство (Griffith et al., 1993). Антифризные белки, синтезирующиеся во время низкотемпературного стресса, позволяют растению предотвращать образование крупных кристаллов льда при замерзании внеклеточной воды в растении и повреждение ими мембран клеток (Griffith et al., 1992). Наконец, недавно установлено, что у растений имеется механизм защиты от низкотемпературного стресса, связанный с разобщением окисления и фосфорилирования в митохондриях и, как следствие этого, термогенезом, который, как считалось до недавнего времени, существует только у теплокровных животных (Скулачев, 1989). В последние годы в митохондриях растений открыт ряд белков, гомологичных разобщающим белкам животных (Vercesi et al., 1995; Laloi et al., 1997; Jezek et al., 1998).

В то же время необходимо отметить, что все эти результаты получены в основном при помощи изучения клеточных белков методом денатурирующего электрофореза, не дающего информации о составе мультисубъединичных

комплексов нативных белков клетки. В то же время большинство нативных белков функционируют в клетке растения именно как мультисубъединичные комплексы. В связи с этим особый интерес представляло изучение изменений, происходящих под действием низкотемпературного стресса в составе нативных белков растений.

Необходимо отметить, что данная работа была начата в начале восьмидесятых годов, когда в литературе практически отсутствовали данные о составе стрессовых белков растений, еще не были выявлены их основные классы и установлены их функции. Таким образом, перед авторами данной монографии стоял ряд задач – изучить изменения в спектрах белков растений, происходящих под действием кратковременного низкотемпературного стресса, выделить один из белков, изменения в содержании которого наиболее значительны для изученных видов растений, установить его функции в клетке и механизм его функционирования. Решению этих задач и посвящена данная работа.

Авторы благодарят весь коллектив лаборатории физиологической генетики СИФИБР СО РАН, а особенно А.И. Антипину, Н.А. Королеву, О.Н. Сумину и В.В. Турчанинову, принимавших непосредственное участие в выполнении некоторых разделов этой работы, а также д.б.н. Ю.М. Константинова, проф. А. Vercesi и проф. I.M. Møller и анонимных рецензентов из журналов *Planta*, *J. Therm. Biology* и *J. Plant Physiology* за ценные замечания и идеи, высказанные при обсуждении этой работы.

Монография подготовлена при поддержке гранта Фонда содействия отечественной науке, грантов РФФИ 01-04-48953 и 03-04-48151 и молодежного гранта СО РАН (проект № 78).

2 БЕЛКИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА РАСТЕНИЙ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Адаптация растений к неблагоприятным низкотемпературным условиям обеспечивается многочисленными биохимическими механизмами. Многие из этих механизмов к настоящему времени достаточно хорошо изучены. К ним относятся изменения в метаболизме липидов и фосфолипидов (Касперска-Палач, 1983; de la Roche et al., 1972; Grenier, Willemot, 1974; Willemot, 1975), повышение ненасыщенности жирных кислот (Grenier et al., 1972; de la Roche et al., 1972; Smolenska, Kuiper, 1977; Kunclova et al., 1995; Los et al., 1997; Sakamoto et al., 1997), накопление сахаров (Туманов, 1979; Касперска-Палач, 1983; Дорофеев, 1998; Пешкова, Дорофеев, 1998; Savitch et al., 1997; Strand et al., 1997; Svenning et al., 1997; Hoshino et al., 1999) и водорастворимых белков (Родченко, 1985; Kasperska-Palacz et al., 1977a,b), что позволяет избежать смертельного для растительной клетки (Самыгин, 1969, 1974) образования внутриклеточного льда, облегчает отток воды и предотвращает повреждение клеточных мембран (Murata, Los, 1997).

Следует отметить, что у всех этих механизмов имеется одна общая черта: вовлечение во все эти механизмы белков-ферментов. Действительно, в случае метаболизма жирных кислот, например, это различные фосфолипазы и десатуразы (Los et al., 1997; Sakamoto et al., 1997), в процессе накопления сахаров участвуют сахарозосинтетазы (Crespi et al., 1991; Guy et al., 1992b). Вовлечение белков-ферментов в процессы адаптации растений к холоду связано с изменением их активности и синтеза (Акимова, Родченко, 1976; Crespi et al., 1991; Guy et al., 1992a,b), что в свою очередь связано с изменением экспрессии соответствующих генов (Crespi et al., 1991; Guy et al., 1992a).

Наконец, изменение под действием низкой температуры экспрессии генов вызывает ингибирование синтеза значительного количества экспрессирующихся в нормальных

температурных условиях конститутивных белков (Карасев, и др., 1992) и в то же время резкое усиление синтеза ряда стрессовых белков (Abromeit et al., 1992; Houde et al., 1992; Crosatti et al., 1994). В последние годы различными исследователями (Houde et al., 1995; Gilmor et al., 1996; Griffith et al., 1997) установлено, что синтез этих белков играет важную роль в приобретении растением устойчивости к действию неблагоприятного температурного фактора путем включения различных защитных механизмов растительной клетки.

Одной из функций белков, синтезирующихся в растениях при гипотермии, в частности, при действии отрицательных температур, является препятствование процессу льдообразования (Graumann, Marahiel, 1998; Atici, Nalbantoglu, 2003). Хотя, в основном, снижение температуры начала льдообразования происходит за счет накопления в растительной клетке сахаров (Касперска-Палач, 1983), при гипотермии происходит и синтез специфических белков, непосредственно влияющих на температуру начала льдообразования и рост ледяных кристаллов. В частности, в листьях озимой ржи наблюдается синтез белка, продуцируемого эндогенно и выделяющегося в вакуоли и межклеточное пространство, который значительно изменяет картину роста ледяных кристаллов и понижает температуру замерзания раствора (Griffith et al., 1992). Синтез значительного количества апопластных белков с молекулярными массами от 15 до 109 кДа наблюдается в процессе повышения морозоустойчивости озимой ржи (Griffith et al., 1993). Иммунолокализация этих белков показала, что они накапливаются на межклеточной поверхности клеточных стенках мезофилла, в опектиненных районах, во вторичных клеточных стенках ксилемных сосудов и в эпидермальных клеточных стенках. Поскольку антифризные белки ржи локализованы в местах, где возможен их контакт со льдом, они могут выполнять функцию барьера на пути распространения льда или подавлять рекристаллизацию льда.

Антифризные белки были также обнаружены в других видах трибы *Triticeae*, но не у морозоустойчивых двудольных растений (Antikainen, Griffith, 1997). Было также установлено, что у озимой пшеницы накопление антифризных белков и развитие холодоустойчивости регулируются пятой хромосомой (Hon et al., 1995; Griffith et al., 1997). При помощи электрофореза с ДДС-Na с последующим иммуноблоттингом была определена локализация двух апопластных антифризных белков с молекулярными массами 32 и 35 кДа в листьях акклиматизированных к холоду растений (PihakaskiMaunsbach et al., 1996). Изучение локализации антифризных белков показало также, что, хотя белки с молекулярными массами 32, 35, и 25 кДа присутствуют в неадаптированных к холоду растениях, они отличаются по локализации и не обладают антифризной активностью, что позволяет сделать вывод, что при низкой температуре синтезируются другие изоформы данных белков (Antikainen et al., 1996).

Другой важной и достаточно глубоко изучаемой в настоящее время функцией белков, синтезирующихся в растении во время низкотемпературного стресса, является предохранение макромолекул от повреждения при обезвоживании клетки. Первоначально шапероны были открыты как класс белков, участвующих в процессе формирования трехмерной структуры других полипептидов, но сами по себе не являющихся компонентами конечной функциональной структуры этих полипептидов (Gatenby, Viitanen, 1994). Впоследствии было обнаружено, что шапероны с молекулярными массами 60 кДа, 70 кДа и 90 кДа являются стрессовыми белками, синтезирующимися под действием высокотемпературного стресса. Хотя в абсолютном большинстве своем данные о синтезе и функциональной активности шаперонов относятся к этому случаю, имеются данные и о том, что некоторые белки, обладающие шапероновой активностью, синтезируются во время гипотермии и адаптации растений к низким температурам.

Данные, указывающие на то, что белки, обладающие шапероновой активностью (Hendrick, Hartl, 1993), принимают участие в процессе закаливания (Labhilili et al., 1995), были получены при исследовании регуляции синтеза белков BiP и БТШ 70 во время холодового закаливания шпината (Anderson, et al., 1993). Значительные изменения под действием холодовой акклиматизации были обнаружены при изучении экспрессии дегидринов у яровых и озимых зерновых культур (Fu et al., 1994). Было установлено, что содержание дегидриновых транскриптов возрастает с сентября по ноябрь, причем их содержание у яровых культур возрастает меньше, чем у озимых. После низкотемпературной закалки растений в полевых условиях к ноябрю в растениях накапливается высокий уровень транскриптов дегидрина, при этом растения развивают очень высокую морозостойкость ($LT_{50} = -30^{\circ}\text{C}$) (Robertson et al., 1994). Увеличение уровня синтеза дегидрина с молекулярной массой 50 кДа во время холодовой акклиматизации было отмечено у пшеницы (Houde et al., 1992). Также было установлено, что некоторые из полипептидов, появляющиеся под действием закаливания у других культур (в частности, полипептид с молекулярной массой 60 кДа), также относятся к семейству белков дегидринов (Agora et al., 1993).

Другое семейство белков, ассоциированное с развитием морозоустойчивости, было обнаружено у пшеницы (Houde et al., 1995). Данное семейство белков специфично для злаков и их содержание регулируется низкой температурой. Антитела, полученные против белка 50 кДа (WCS120), реагируют по крайней мере с пятью членами данного семейства (Houde et al., 1995). Используя эти антитела, было определено клеточное содержание и локализация данного семейства белков в акклиматизированных к холоду всходах пшеницы. Вестерн-блоттинг субклеточных частиц показал наличие всех членов семейства в цитозоле и очищенных ядерных частицах, при этом они не были обнаружены в клеточных стенках или других органеллах. Эти результаты показывают, что данное семейство

белков вовлечено в общий механизм защиты растворимых частиц клетки. Их присутствие в нуклеоплазме также позволяет предполагать, что одной из их возможных функций является предохранение процессов транскрипции. Высокая гидрофильность, высокое содержание данных белков и устойчивость этих белков при кипячении позволяют предлагать, что они могут обеспечивать особую микросреду, необходимую для выживания клетки в чувствительной зоне сосудистого перехода во время замораживающего стресса (Houde et al., 1995). Более того, установлено, что накопление белков семейства WCS, кодирующего группу белков с молекулярными массами от 12 до 200 кДа, прямо коррелирует с появлением устойчивости к замерзанию (Sarhan et al., 1997).

Как считается в настоящее время, ДНК и РНК - шаперонами являются и известные в настоящее время семейства ДНК- и РНК- связывающих белков холодового шока, изученные у млекопитающих (Danno et al., 1997; Nishiyama et al., 1997; Cullen et al., 1997) и бактерий (ChapotChartier et al., 1997; Franco et al., 1997; Li et al., 1997). В частности показано, что CspA связывается с РНК в качестве шаперона (Jiang et al., 1997). При этом CspA не связывается специфически с определенными последовательностями РНК, а связывается с любой РНК размером больше 74 нуклеотидов и предотвращает образование вторичной структуры РНК при низкой температуре, что может быть необходимо для эффективной трансляции мРНК при низкой температуре и регулировать транскрипцию (Jiang et al., 1997; Graumann et al., 1997).

С другой стороны, при исследовании бактериальных белков холодового шока установлено, что многие из них являются ДНК- и РНК- связывающими белками с регуляторными функциями. В частности, такими белками являются CspA из *E. coli* (Jiang et al., 1997), CspB, CspC и CspD из *B. subtilis* (Graumann, Marahiel, 1996, 1997), содержащие связывающий нуклеиновые кислоты мотив, известный как “домен холодового шока” (CSD). К настоящему времени

известно и исследовано также довольно большое количество РНК-связывающих стрессовых белков, в частности, RbpA1 у *Anabaena* (Sato, Wada, 1996; Sato, Maruyama, 1997) и HVGRP3 у ячменя (Molina et al., 1997). Таким образом, все больше подтверждений получает та точка зрения, что ДНК- и РНК-связывающие белки холодового шока являются многофункциональными и участвуют как в транскрипционных, так и в посттранскрипционных событиях, регулируя экспрессию генов (Ladomery, 1997).

Подводя итоги, можно сделать вывод, что, несмотря на довольно значительные успехи, достигнутые при изучении белков низкотемпературного стресса растений, в литературе имеется явно недостаточное число данных об изменении во время низкотемпературного стресса содержания нативных мультисубъединичных белков. Особый интерес представляет изучение этих изменений у озимых культурных злаков, имеющих первостепенное хозяйственное значение, в связи с возможностью установления функций, выполняемых нативными стрессовыми белками во время действия низкой температуры и возможностью установления некоторых механизмов, связанных с высокой устойчивостью к действию низких температур некоторых озимых злаков. Необходимо также отметить, что у злаков обнаружен ряд специфических механизмов, отсутствующих у двудольных растений. При этом следует отметить, что в изучении влияния низкотемпературного стресса на состав и относительное содержание белков растений не применялись иммунохимические методы, позволяющие достаточно полно характеризовать изменения, происходящие во время низкотемпературного стресса в спектрах нативных белков растений. В связи с этим первой задачей нашего исследования было изучение изменений, происходящих в содержании нативных белков озимых злаков – озимой ржи и озимой пшеницы.

3 ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА НА ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ СПЕКТРЫ НАТИВНЫХ БЕЛКОВ ОЗИМЫХ РЖИ И ПШЕНИЦЫ

Поскольку действие низких температур и, в частности, холодовой шок, вызывает значительные изменения в содержании общего белка (Беличенко, Грязина, 1980; Колоша, Костенко, 1976; Петрова, 1984) и в спектрах синтезируемых в растениях полипептидов (Барашкова, 1971, 1979; Войников, Корытов, 1991; Карасев и др., 1991; 1993; Новожилова и др., 1994; Авхадиева и др., 1993, 1995; Гималов и др., 1991б, 1996; Weidner, Heuel, 1979; Weidner et al., 1982; Robertson et al., 1988, 1994; Houde et al., 1992), на первом этапе исследований была предпринята попытка выявить качественные изменения в составе нативных белков - антигенов озимой ржи сорта Чулпан и холодостойкой озимой пшеницы сорта Альбидум 24 после часовой гипотермии (-4°C). Это сравнение проводилось методом двойной иммунодиффузии в агарозном геле по системе «квадратов» Абелева (Абелев, 1969).

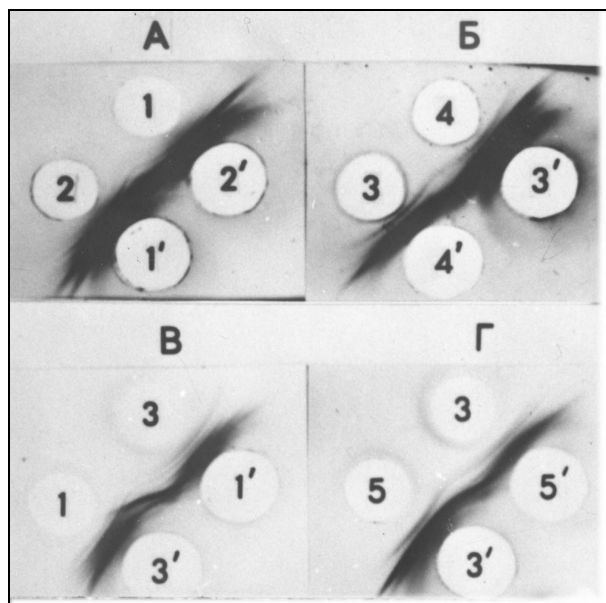


Рис. 1. Двойная иммунодиффузия в агарозном геле.

Белки: 1- рожь контроль; 2- рожь -4°C ; 3- пшеница «Альбидум» контроль; 4- пшеница «Альбидум» -4°C ; 5- пшеница «Скала»

Сыворотки на белки: 1'- рожь контроль; 2'- рожь -4°C ; 3'- пшеница «Альбидум» контроль; 4'- пшеница «Альбидум» -4°C ; 5'- пшеница «Скала»

Полученные результаты показали, что весь набор нативных белков-антигенов стрессированных растений преципитируется в перекрестной реакции с антителами на белки «контрольных» растений, не подвергнутых действию холодового шока как у ржи, так и у пшеницы (рис. 1 А, Б).

Специфической реакции между белками-антигенами стрессированных растений и сывороткой на эти белки, указывающей на качественные изменения в спектре нативных белков стрессированных растений по сравнению с «контрольными» растениями, обнаружено не было.

При помощи иммунохимического метода, позволяющего сравнивать нативные белки - двойной иммунодиффузии в агарозном геле по системе «квадратов» Абелева - не было выявлено также значительных качественных различий при сравнении белков неохлажденных растений озимой ржи, озимой и яровой пшеницы (рис. 1 В, Г). Была установлена лишь неполная идентичность одного из антигенов у озимой ржи и пшеницы, вызывающая «шпору» при образовании дуги преципитации. По-видимому, это явление наблюдается вследствие наличия дополнительной антигенной детерминанты у одного из белков (рис. 1 В). При иммуноэлектрофорезе в агарозе по Грабар и Уильямс с модификациями (Марков, Хавкин, 1981) этот антиген имел относительную электрофоретическую подвижность (ОЭП) 0.30 у пшеницы и 0.35 у ржи (рис. 2). Поскольку площадь пиков преципитации на иммуноэлектрофореграммах пропорциональна количеству антиген-антитело (Остерман, 1983), то возможна количественная оценка и сравнение уровней содержания антигенов при использовании одной и той же стандартизованной антисыворотки и стандартных условий электрофореза. Размеры и интенсивность пиков преципитации позволили выявить существенные различия в содержании антигенов с ОЭП 0.24 и 0.30 у охлажденных и неохлажденных растений озимой ржи и пшеницы (рис. 2). В частности, охлаждение растений привело к значительному увеличению площадей пиков преципитации антигенов ОЭП 0.35 у озимой ржи и 0.30 у пшеницы (увеличение на 59% и 54%, соответственно). Одновременно произошло уменьшение площади пиков преципитации антигена 0.24 на 20% у ржи и на 14% у пшеницы. У пшеницы под воздействием низкой

температуры резко уменьшилось так же содержание антигена ОЭП 0,57 на 42%.

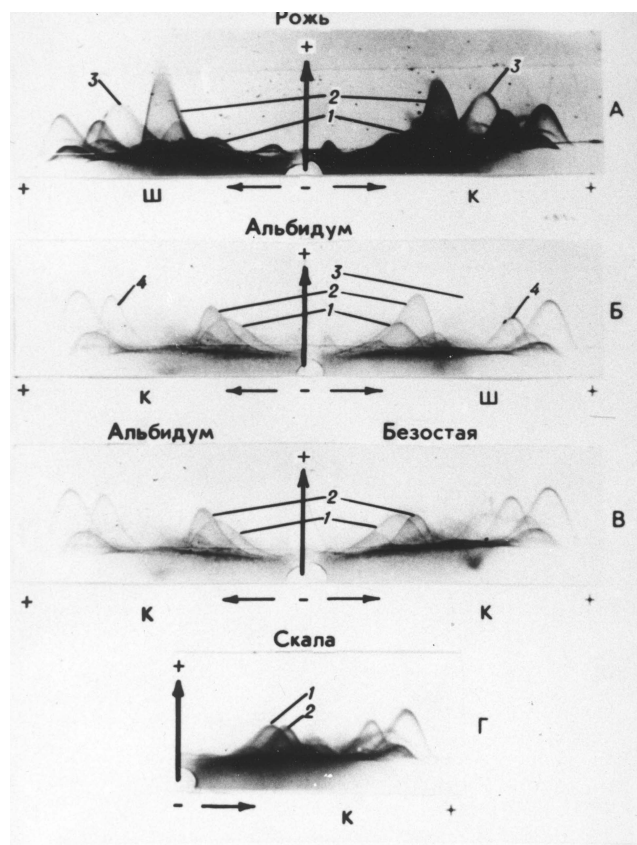


Рис. 2. Двумерный иммуноэлектрофорез по Грабар и Уильямс «контрольных» (К) и «шоковых» (Ш) белков ржи (А) и пшениц (Б, В, Г). В геле содержится градиент антител на антигены «контрольных» проростков пшеницы сорта «Альбидум-24».

Цифрами обозначены антигены с ОЭП 0.24 (1), 0.30/0.35 (2) и 0.57 (3).

В дальнейшем, при изучении содержания антигенов с ОЭП 0.30 и 0.24 у малохолодоустойчивого сорта Безостая 1 и высокохолодоустойчивого сорта Альбидум 114 методом перекрестного иммуноэлектрофореза (Мишарин и др., 1990) и у ряда различающихся по холодоустойчивости генотипов озимой пшеницы методом двойной иммунодиффузии через барьер (Колесниченко, 1988; Колесниченко и др., 1990) было установлено, что отношение содержания конститутивно синтезирующихся антигенов с ОЭП 0.30 и 0.24 у «контрольных» трехсуточных проростков, выращенных при 26°C, хорошо коррелирует со степенью морозоустойчивости сорта. У более холодоустойчивых сортов содержание антигена с ОЭП 0.30 было выше, а содержание антигена с ОЭП 0.24 - ниже, чем у менее холодоустойчивых сортов. Данный факт позволил разработать метод определения морозоустойчивости сортов и линий озимой пшеницы и получить на него авторское свидетельство на изобретение (Колесниченко и др., 1990).

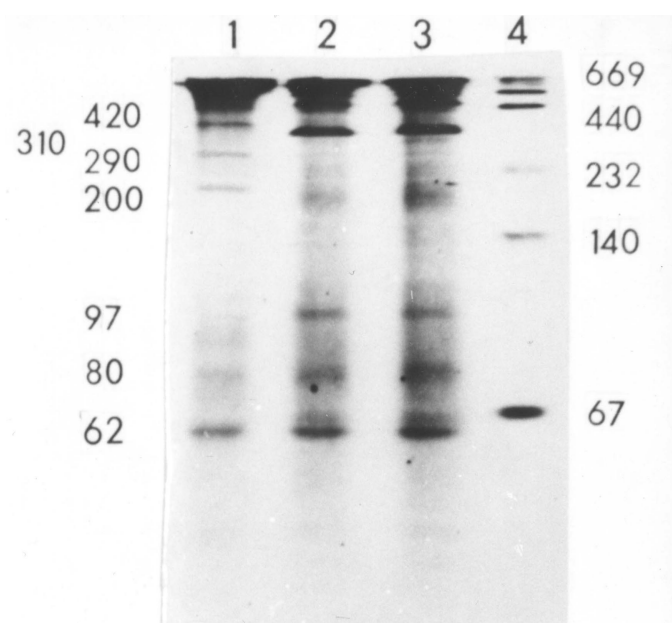


Рис. 3. Электрофоретические спектры нативных белков одномесячных растений озимой пшеницы (1), трехсуточных «контрольных» проростков озимой ржи (2) и трехсуточных проростков озимой ржи, подвергнутых низкотемпературному стрессу (-1°C , 1 час) (3). 4 – белки-маркеры.

Кажущееся противоречие полученных результатов об отсутствии новых антигенных детерминант в составе нативных белков злаков с имеющимися в литературе данными о синтезе во время низкотемпературного стресса новых полипептидов (Браун, 1983; Кравец, 1996 и многие другие работы) может быть, по всей видимости, объяснено либо тем, что у вновь синтезируемых под действием низкой температуры полипептидов имеются те же антигенные детерминанты, что и у синтезируемых конститутивно полипептидов, либо тем, что, несмотря на отличия в первичной и вторичной структурах вновь синтезируемых полипептидов от синтезирующихся в клетке конститутивно, третичная и четвертичная структуры нативных белков, определяющие их антигенные детерминанты, сохраняются неизменными.

В связи с тем, что при электрофорезе в агарозе относительная электрофоретическая подвижность белков зависит, в основном, не от их молекулярной массы, а от заряда белковой макромолекулы, иммуноэлектрофорез в агарозе не позволяет установить молекулярную массу исследуемого белка. В то же время это можно сделать путем электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле (ПААГ), в частности, при использовании электрофореза в

градиенте пористости геля по Андерсон, Борг и Микаэльсон (Anderson et al., 1972). При сравнении электрофоретических спектров нативных белков трехсуточных «контрольных» проростков озимой ржи, трехсуточных проростков, подвергнутых в течение одного часа холодовому шоку (-1°C), и одномесячных растений озимой ржи были выявлены значительные различия между белковыми спектрами трехсуточных проростков и одномесячных растений озимой ржи. В частности, у одномесячных растений озимой ржи практически полностью отсутствовали в спектре нативных белков белки с молекулярными массами 310 кДа, 180 кДа, 97 кДа и сильно снижалось содержание белка с молекулярной массой около 80 кДа по сравнению с трехсуточными проростками (рис. 3).

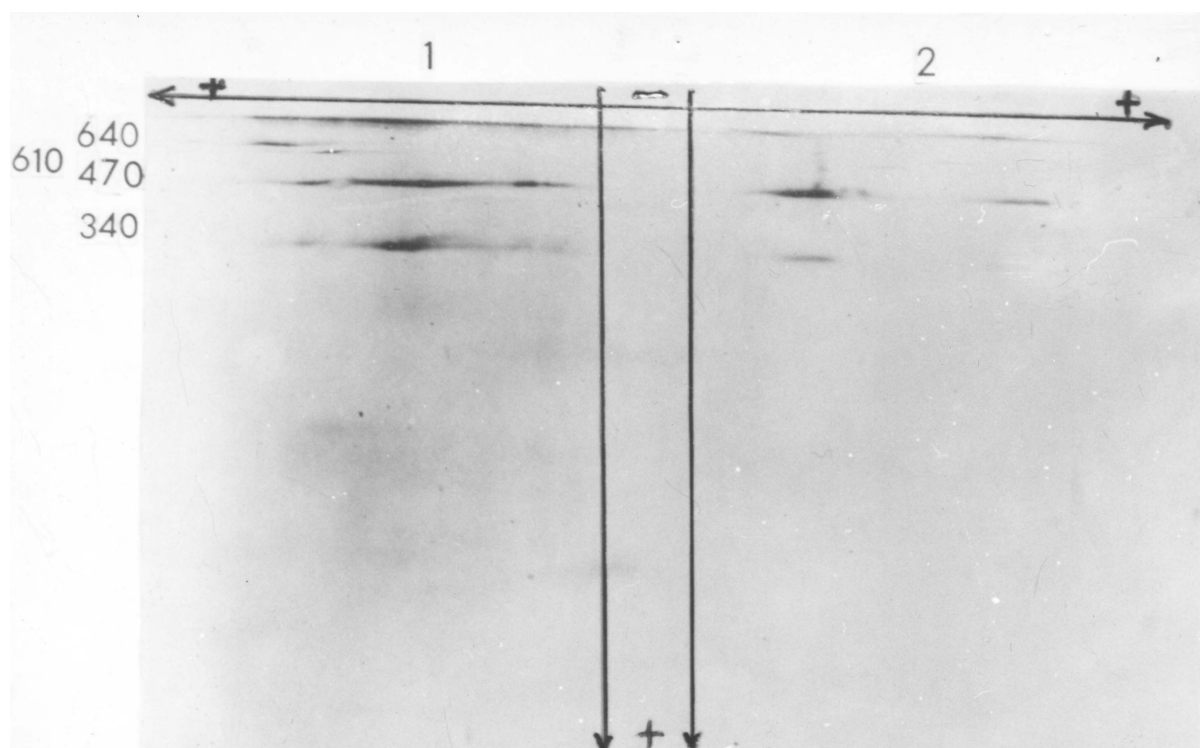


Рис. 4. Двумерное электрофоретическое разделение нативных белков «контрольных» и «стрессированных» проростков озимой ржи (первое направление – электрофорез в агарозе, второе направление – электрофорез в градиенте ПААГ.

- 1- стрессированные (-1°C , 1 час) проростки;
- 2- «контрольные» проростки.

В то же время у одномесячных растений на значительно более высоком уровне было содержание белков с

молекулярными массами 420 кДа, 290 кДа и 200 кДа. Между белками «контрольных» и стрессированных трехсуточных проростков также наблюдались некоторые различия. В частности, под действием гипотермии увеличивалось содержание белков с молекулярными массами около 310 кДа, 180-190 кДа, 80 кДа и 62 кДа (рис. 3).

При сравнении двумерных электрофоретических спектров белков «контрольных» трехсуточных проростков и белков трехсуточных проростков, подвергнутых действию низкотемпературного стресса -1°C в течение 1 часа, при котором в первой мере электрофореза разделение проводили в геле агарозы, а разделение во второй мере проводили в градиенте пористости полиакриламидного геля, было отмечено увеличение содержания белков с молекулярными массами 610 кДа (ОЭП 0.47) и 310 кДа (ОЭП 0.30) в белках стрессированных растений. Однако в то же время увеличивалось содержание и ряда других белков с ОЭП около 0.30 (рис. 4). Таким образом, двумерный иммуноэлектрофорез не позволил с достаточной уверенностью определить молекулярную массу антигена с ОЭП 0.30.

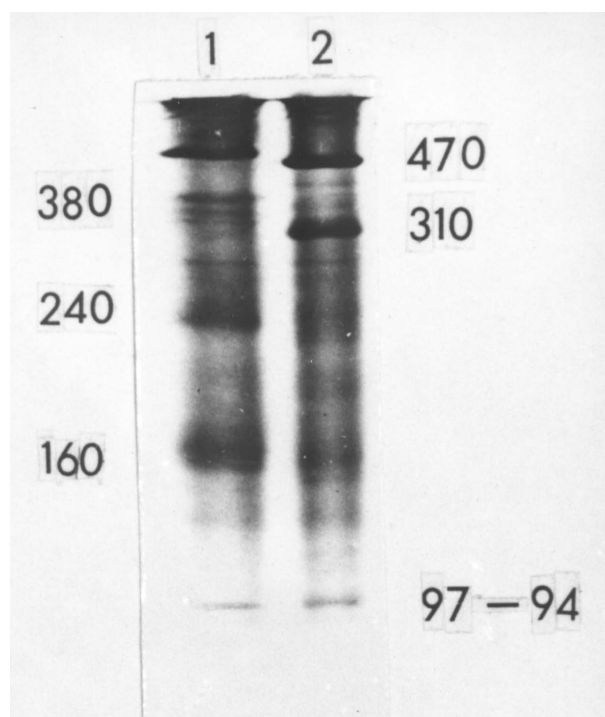


Рис. 5. Электрофоретические спектры нативных белков озимой пшеницы (1) и озимой ржи (2). Цифрами указаны мол. массы белков (кДа).

Интересные данные были получены при сравнении электрофоретических спектров нативных белков трехсуточных проростков озимой ржи (сорт Чулпан) и озимой пшеницы (сорт Альбидум 114). На фотографии видно, что спектры белков трехсуточных проростков озимой ржи и пшеницы сильно различаются (рис. 5). Если у озимой ржи в спектре нативных белков имеются мощные полосы белков с молекулярными массами 470 кДа, 310 кДа, 160 кДа, 97 кДа и 94 кДа, то у пшеницы в спектре преобладали белки с молекулярными массами 490 кДа, 280 кДа, 240 кДа, 160 кДа, 97 кДа и 94 кДа. При этом в спектре полоса белка с молекулярной массой 160 кДа была значительно более сильно выражена у озимой пшеницы, а белка с молекулярной массой 97 кДа - у озимой ржи. Эти данные представляют определенный интерес в связи с тем, что, как было отмечено выше, при использовании иммунохимических методов больших различий между белками трехсуточных проростков озимых ржи и пшеницы отмечено не было. Единственным возможным объяснением этому факту является то, что, несмотря на различия в молекулярных массах, нативные белки пшеницы и ржи составлены из иммунохимически родственных субъединиц и имеют одинаковые антигенные детерминанты.

4 ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК АНТИГЕНА С ОЭП 0.30

4.1 Изучение возрастных изменений в содержании антигена с ОЭП 0.30 у незакаленных растений озимой пшеницы

Как известно, многие стрессовые белки (в частности, белки LEA – дегидрины, молекулярные шапероны и др.) синтезируются на определенных этапах развития растения конститутивно. В связи с этим представляло определенный интерес изучение возрастных особенностей синтеза антигенов озимой ржи с ОЭП 0.35 и озимой пшеницы с ОЭП 0.30. При помощи иммунохимических методов было установлено, что содержание этих антигенов, относительно высокое у

трехсуточных проростков озимой ржи и озимой пшеницы, снижается с возрастом и у одномесячных незакаленных растений падает до очень низкого, практически нулевого уровня (рис. 6). Это обстоятельство позволило разработать тест для определения наличия антигена с ОЭП 0.35 (у пшеницы - 0.30) при фракционировании белков пшеницы и ржи, когда белки, разделенные электрофорезом в агарозе, проявляли одновременно сывороткой на белки трехсуточных проростков и сывороткой на белки одномесячных растений пшеницы. О наличии этого антигена в данной фракции судили по образованию дуги преципитации в зоне с ОЭП 0.35 с первой сывороткой и одновременному отсутствию дуги преципитации в этой зоне подвижности со второй сывороткой.

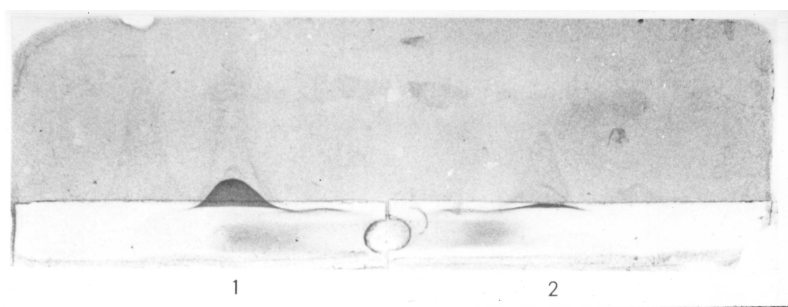


Рис. 6.

Иммуноэлектрофореграмма суммарного белка трехсуточных проростков (1) и одномесячных незакаленных растений (2) озимой ржи.

В гель внесена сыворотка на антиген с ОЭП 0.30.

В дальнейшем этот тест на наличие во фракции антигена с ОЭП 0.35 был использован при выделении данного антигена в иммунохимически чистом виде.

4.2 Выделение, очистка и определение характеристик антигена с ОЭП 0.35 из проростков озимой ржи.

Полученные при помощи электрофореза в градиенте ПААГ данные все же не позволяли с полной уверенностью установить молекулярную массу антигена с ОЭП 0.30. Для того, чтобы однозначно быть в этом уверенным, необходимо было выделить этот белок в иммунохимически чистом виде и затем определить его молекулярную массу при помощи электрофореза.

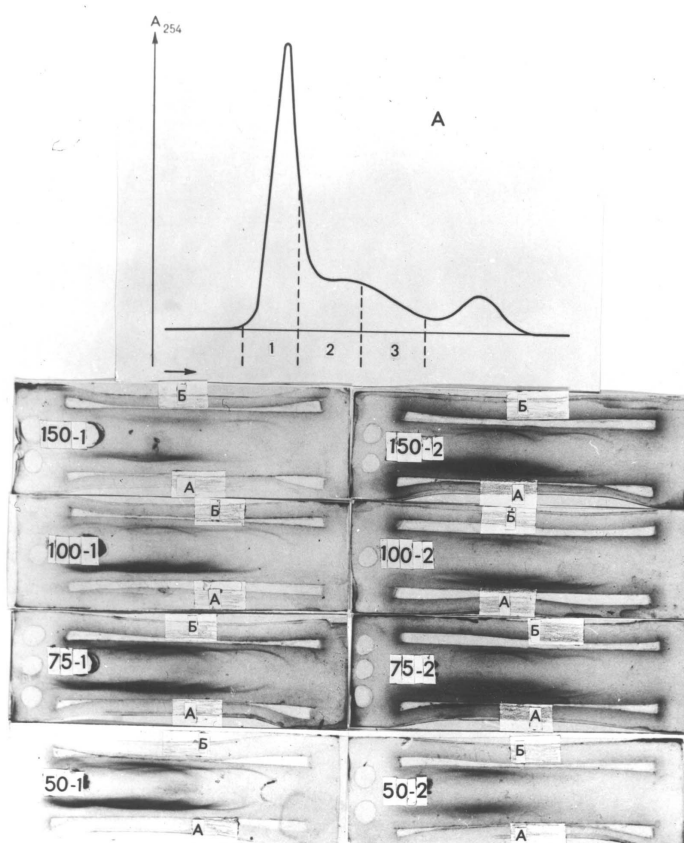


Рис. 7. Иммуноэлектро-foreграммы фракций белка проростков озимой ржи после разделения на колонках с сефадексами G 150, G 100, G 75 и G 50 (элюент – 0.05 М бикарбонат аммония).

А- профиль элюции белка с колонки; **Б**- иммуноэлектро-foreграммы фракций белка:

1- первая выходящая с колонки фракция белка;

2- вторая фракция белка.

Проявление сыворотками на белки:

А- трехсуточных проростков;

Б- одномесячных растений озимой пшеницы.

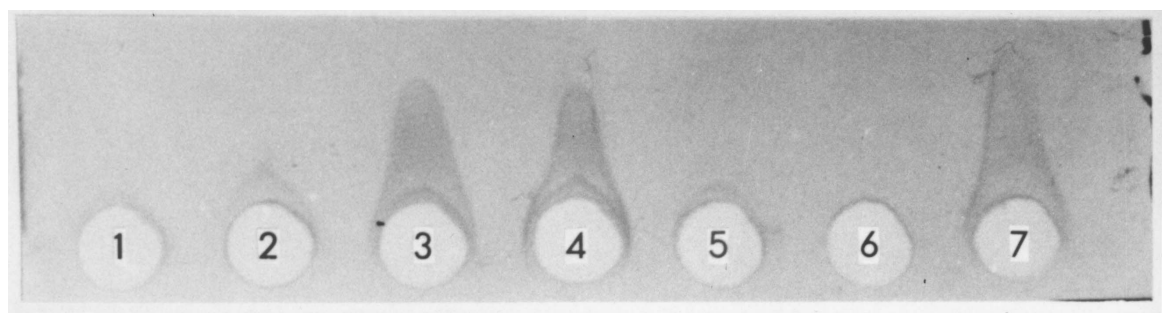


Рис. 8. Фракционирование белков озимой ржи сульфатом аммония.

Белок выделен из трехсуточных проростков озимой ржи и осажден сульфатом аммония различной концентрации. В гель внесена сыворотка на антиген с ОЭП 0.35. Белок окрашен Кумасси R-250. Использован сульфат аммония в следующих концентрациях:

10-20% (1); 20-30% (2); 30-40% (3); 40-50% (4); 50-60% (5); 60-80% (6) насыщения; 7- суммарный белок.

Для этого было проведено фракционирование суммарного растительного белка на колонках с сефадексами различных номеров (G150, G100, G75 и G50) по Остерману (1985) с тем, чтобы, по возможности, выделить фракцию, содержащую

чистый антиген. Однако, хотя при иммуноэлектрофорезе фракций, полученных при разделении суммарного белка на сефадексах G100, G75 и G50 было установлено, что антиген выходит в первом пике, интересующий нас антиген элюировался с колонки одновременно с рядом других белков (рис. 7).

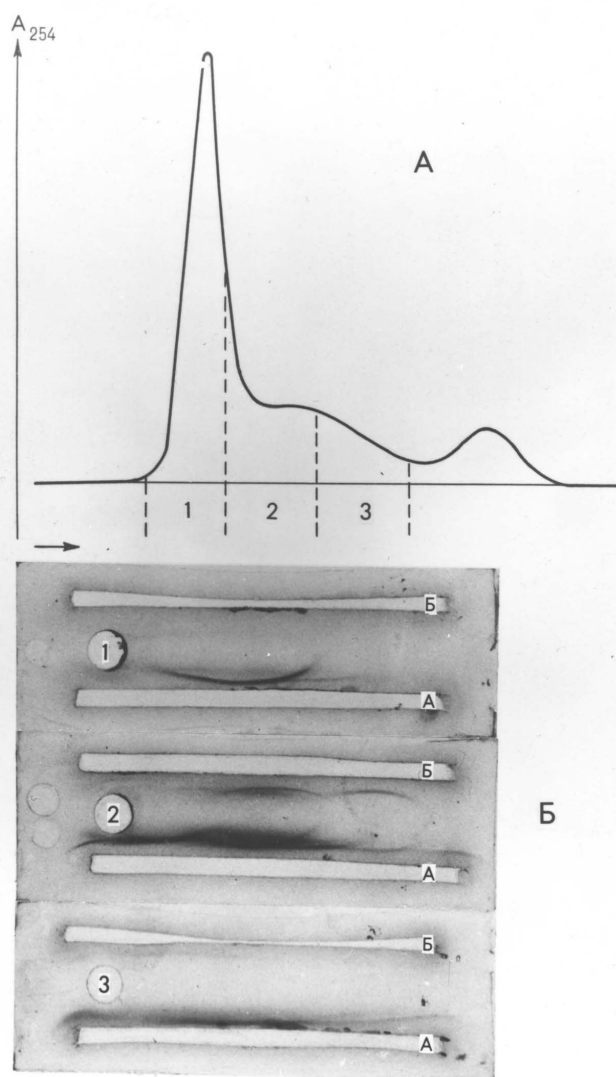


Рис. 9. Выделение в иммунохимически чистом виде антигена с ОЭП 0.35 из проростков озимой ржи. А- Схема отбора фракций при элюировании с колонки с сефадексом G100 фракции 30-50% насыщения сульфатом аммония белка проростков озимой ржи. Б- Иммуноэлектрофореграммы фракций белка проростков озимой ржи. Проявление сыворотками на белки: А- трехсуточных проростков и Б- одномесечных растений озимой пшеницы.

1- фракция 1; 2- фракция 2;
3-фракция 3.

В то же время было установлено, что при фракционном высаливании белков трехсуточных проростков озимой ржи сульфатом аммония антиген с ОЭП 0.35 выпадает в осадок при насыщении раствора сульфатом аммония от 30 до 50% (рис. 8). Однако при этом также преципитирует ряд других белков. При комбинировании этих двух способов частичной

очистки белка, при которой на первой стадии очистки белки трехсуточных проростков озимой ржи фракционировались сульфатом аммония, а на второй стадии очистки фракция белков, выпадающих в осадок при насыщении раствора сульфатом аммония 30-50%, разделялась на колонке с сефадексом G100 на ряд пиков, при помощи теста на наличие во фракции антигена с ОЭП 0.35 было установлено, что интересующий нас антиген выходит в первом пике в иммунохимически чистом виде (рис. 9) (Колесниченко и др., 1996).

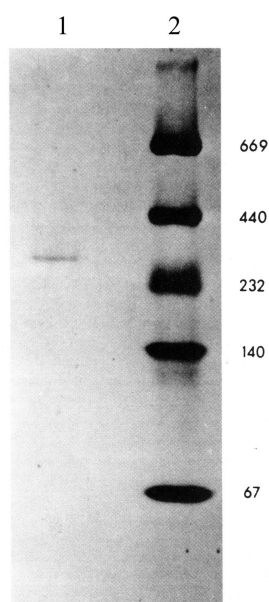


Рис. 10. Электрофореграмма антигена с ОЭП 0.35 из проростков озимой ржи. 1 - анализируемый белок, 2 - маркеры.

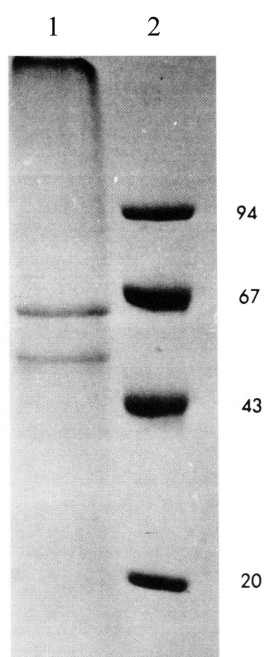


Рис. 11. Электрофореграмма полипептидов антигена с ОЭП 0.35 из проростков озимой ржи. 1 - анализируемый белок, 2 - маркеры.

После препаративной наработки часть белка была использована для установления его молекулярной массы. Электрофорез в ПААГе нативного белка также показал, что белок очищен в достаточной степени (рис. 10), и позволил определить молекулярную массу белка с ОЭП 0.35 из проростков озимой ржи, которая оказалась равной 310 кДа. При электрофорезе в присутствии ДДС-Na в ПААГе (Laemmli, 1970) этого белка было установлено, что он состоит из двух типов субъединиц с молекулярными массами 66 и 56 кДа (рис. 11) (Колесниченко и др., 1996).

Очищенный белок проростков ржи с молекулярной массой 310 кДа был использован для получения специфической поликлональной антисыворотки на стрессовый белок 310 кДа.

5 ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА НА СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА С МОЛ. МАССОЙ 310 КДА У ОЗИМЫХ ЗЛАКОВ

Поскольку была получена сыворотка против стрессового белка с молекулярной массой 310 кДа, а такой иммунохимический метод, как ракет-иммуноэлектрофорез, позволяет достаточно точно сравнить количественное содержание исследуемых антигенов, то было проведено количественное изучение влияния низкотемпературного стресса различной длительности и интенсивности на содержание данного стрессового белка в цитоплазматических водорастворимых белках озимой ржи и озимой пшеницы. Но, прежде всего, требовалось установить, происходит ли в условиях низкотемпературного стресса синтез субъединиц данного стрессового белка *de novo*, или его изменение происходит за счет ассоциации его субъединиц.

Для выяснения того, как влияет часовая гипотермия на синтез *de novo* белка с мол. массой 310 кДа, было проведено определение уровня синтеза этого белка во время гипотермии путем измерения уровня включения радиоактивной метки в растворимые цитоплазматические белки трехсуточных проростков озимой пшеницы сорта «Заларинка».

Введение радиоактивной метки (^{14}C -лейцин) в белки «контрольных» растений (при температуре 20°C) проводили в течение 1 часа, в белки стрессированных (при температуре 2°C) растений проводили в течение полутора часов ввиду того, что, как известно, гипотермия приводит к значительному ингибированию белкового синтеза у озимой пшеницы (Колоша и др., 1978; Карасев и др., 1992). Выделение растительного белка проводили по стандартной схеме. Для каждого варианта опыта определяли концентрацию и радиоактивность белка в растворе.

Выделенный растворимый цитоплазматический белок из трехсуточных «контрольных» и стрессированных растений использовали для определения относительного содержания белка с молекулярной массой 310 кДа и определения уровня включения радиоактивной метки как в «общий» белок, так и в белок 310 кДа.

Сравнение при помощи ракет-иммуноэлектрофореза относительного содержания стрессового белка с молекулярной массой 310 кДа в «контрольных» и стрессированных проростках показало, что 1.5 часовая гипотермия вызывает увеличение содержания этого белка до 140% к контролю (рис. 12) (Колесниченко и др., 1997).

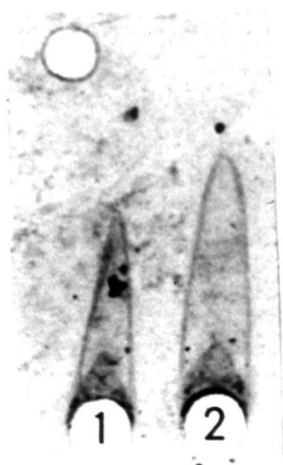


Рис. 12. Ракет-иммуноэлектрофореграмма белков трехсуточных проростков озимой пшеницы, подвергнутых низкотемпературному стрессу.

- 1- «контрольные» проростки,
- 2- «стрессированные» проростки.

Изучение включения метки в белки «контрольных» проростков и проростков, подвергнутых действию гипотермии, проводилось путем измерения включения

радиоактивной метки в водорастворимые растительные белки, преципитировавшие в ходе реакции двойной иммунодиффузии в геле по Ухтерлони (Остерман, 1983) с соответствующей антисывороткой (на общий растительный белок или на белок БХШ 310).

При проведении иммунодиффузии лунка для белка окружалась кольцом лунок с внесенной в них антисывороткой для того, чтобы диффундирующий во все стороны белок мог преципитировать с антителами сыворотки. После окончания реакции преципитации препараты отмывали 0.15 М NaCl и агарозную пластинку с линиями преципитации растворяли в насыщенном растворе KI. Для того, чтобы KI не мешал при подсчете радиоактивности препарата, белок из раствора осаждали ацетоном, переносили на бумажные фильтры и определяли радиоактивность при помощи счетчика RACKBETA 1219 фирмы LKB (Швеция).

Таблица 1

Влияние гипотермии на относительное содержание стрессового белка 310 кДа и включение радиоактивной метки в общий белок трехсуточных проростков озимой пшеницы и белок 310 кДа

Вариант опыта	Включение радиоактивной метки, (%) в:		Относительное содержание стрессового белка 310 кДа, %
	общий белок	белок 310 кДа	
Контроль	100.0 \pm 3.0	100.0 \pm 5.5	100 \pm 1
Гипотермия: 2 ⁰ C; 1,5 часа	115.7 \pm 6.8	164.5 \pm 9.9	140 \pm 8

Поскольку в процессе подготовки общего растительного белка для иммунизации и получения сыворотки имелась стадия очистки белка на колонке с сефадексом G25, а также поскольку низкомолекулярные растительные белки обладают слабой иммуногенностью, в «общей» сыворотке не было антител на белки с молекулярными массами ниже 20 кДа. Этим объясняется тот факт, что не весь внесенный в лунку

радиоактивный белок преципитировал с «общей» антисывороткой.

При изучении преципитации радиоактивно меченого белка было установлено, что общая сыворотка осаждает 59.5% внесенных в лунку распадов в варианте 20°C, 1 час и 68.8% внесенных распадов в варианте 2°C, 1.5 часа. При реакции с «узкой» сывороткой на белок с молекулярной массой 310 кДа в ходе реакции преципитации осаждалось 27.1% внесенных распадов в варианте 20°C, 1 час и 51.5% внесенных распадов в варианте 2°C, 1.5 часа. Таким образом, включение радиоактивной метки в белок с молекулярной массой 310 кДа по отношению к включению метки в белки, осажденные «общей» сывороткой, составляло 45.6% для «контрольных» проростков и 74.9% для проростков, подвергнутых низкотемпературному шоку (2°C, 1.5 часа). Если же за 100% принять включение радиоактивной метки в белок с молекулярной массой 310 кДа в «контрольных» проростках, то включение в него радиоактивной метки во время холодового шока (2°C, 1.5 часа) возрастало на 64.5%, в то время как включение метки в «общий» растительный белок (включая белок с молекулярной массой 310 кДа) в случае холодового шока возрастало лишь на 15.7% (табл.1).

Полученные результаты позволяют сделать несколько выводов. Во-первых, несмотря на снижение под действием гипотермии уровня синтеза большинства белков, увеличение относительного содержания белка с молекулярной массой 310 кДа и иммунохимически родственных ему белков под действием кратковременного низкотемпературного стресса («холодового шока») происходит за счет индукции его синтеза. Во-вторых, поскольку включение радиоактивной метки в этот белок несколько превышает увеличение его относительного содержания в клетке, можно предположить, что во время действия «холодового шока» часть белка распадается, что, вероятно, связано с выполнением им каких-то (возможно, протекторных) функций в растительной клетке. В-третьих,

можно сделать вывод, что данный белок является стрессовым, принадлежит к группе белков с высоким уровнем индукции синтеза (Войников, Корытов, 1993) и его можно назвать «белок холодового шока с молекулярной массой 310 кДа» (БХШ 310).

5.1 Влияние интенсивности кратковременной гипотермии на содержание БХШ 310

Хотя ранее при помощи двумерного иммуноэлектрофореза и было установлено, что кратковременная гипотермия вызывает увеличение содержания антигена с ОЭП 0.30 у озимой пшеницы, влияние интенсивности кратковременного низкотемпературного стресса на изменение содержания этого антигена не было установлено. Для выяснения этого вопроса было проведено сравнение его содержания в трехсуточных проростках озимой ржи, подвергнутых действию температур 3, 0, -3 и -10°C в течение одного часа и в «контрольных» проростках, выращенных при 26°C, не подвергнутых воздействию гипотермии. Сравнение относительного содержания белка БХШ 310 проводили при помощи ракет-иммуноэлектрофореза (рис. 13).

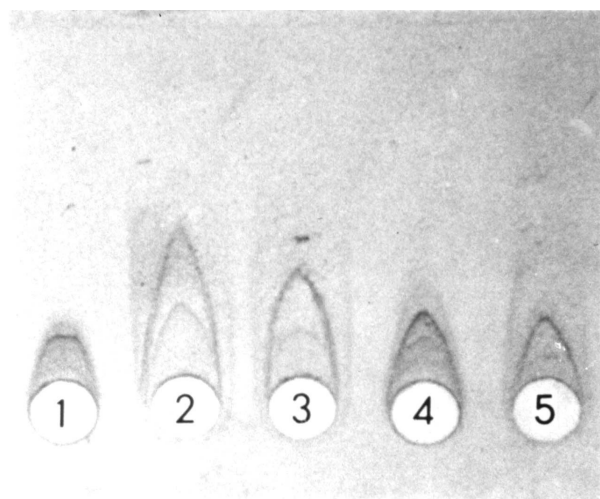


Рис. 13. Ракет-иммуноэлектрофореграммы белков трехсуточных проростков озимой пшеницы, подвергнутых низкотемпературному стрессу различной интенсивности. В гель внесена сыворотка на БХШ 310. Белок окрашен Кумасси R-250.

1 - контроль (26°C), 2 - 3°C, 3 - 0°C, 4 - -3°C, 5 - -10°C.

Время низкотемпературного воздействия – 1 час.

В результате исследования было установлено, что низкотемпературный стресс вызывает увеличение содержания этого белка во всех вариантах опыта (табл. 2) (Колесниченко и др., 1996). Наибольшее увеличение содержания белка БХШ 310 наблюдалось при температуре 3°C, что, возможно, связано с тем, что этот белок принимает участие в процессах,

связанных с закаливанием растения. В то же время увеличение содержания БХШ 310 наблюдалось вплоть до -10°C . Учитывая то, что при такой низкой температуре синтез белков *de novo* практически отсутствует, увеличение содержания белка, возможно, происходит во время падения температуры, когда температура проростков была выше или около 0°C .

5.2 Изменение содержания БХШ 310 во время закаливания проростков озимой пшеницы к холоду

При изучении влияния кратковременной гипотермии на содержание БХШ 310 было высказано предположение, что БХШ 310 может принимать участие в процессах закаливания растений озимой пшеницы к холоду, поэтому особый интерес представляло изучение динамики изменения содержания данного белка в проростках озимой пшеницы во время холодового закаливания. При помощи рокет-иммуноэлектрофореза было проведено сравнение его содержания в трехсуточных проростках высокоморозоустойчивой озимой пшеницы сорта «Иркутская озимая», подвергнутых действию температуры 4°C в течение одного, трех, пяти, семи часов и одних, трех, пяти и семи суток и в «контрольных» проростках, выращенных при 26°C и не подвергнутых воздействию гипотермии (рис. 14). В результате исследования было установлено, что закаливание низкой положительной температурой трехсуточных проростков морозоустойчивого сорта озимой пшеницы «Иркутская озимая» вызывает увеличение содержания этого белка через один час закали, затем падение его содержания в течение первых суток закали и, начиная с третьих суток закаливания, значительный рост его содержания (табл. 3).

Увеличение содержания БХШ 310 в течение первого часа закали объясняется, как показано в предыдущей главе, индукцией синтеза *de novo* данного стрессового белка под действием «холодового шока». Падение содержания этого белка в течение первых суток закаливания, по-видимому,

объясняется распадом белковых макромолекул, в то время как синтез белка *de novo* так же падает и находится на низком уровне. Значительная повторная индукция синтеза белка происходит только к третьим суткам закаливания, когда содержание БХШ 310 начинает резко возрастать и достигает 142% к пятым суткам и 148% к седьмым суткам закаливания (табл. 3).

Таблица 2

Влияние температуры на относительное содержание (%) БХШ 310 в проростках озимой ржи

Вариант опыта	Относительное содержание БХШ 310, %
26 ⁰ С	100 ± 1.0
3 ⁰ С, 1 час	155 ± 2.0
0 ⁰ С, 1 час	135 ± 2.0
-3 ⁰ С, 1 час	115 ± 1.5
-10 ⁰ С, 1 час	107 ± 1.5

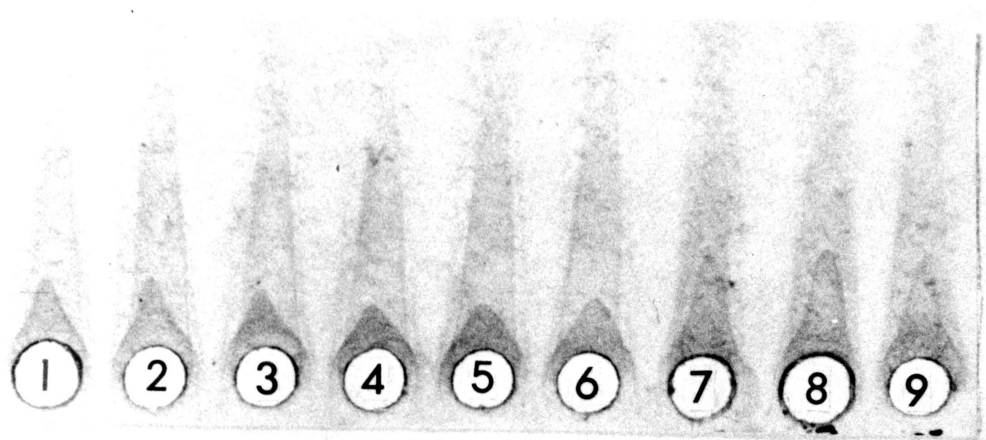


Рис. 14. Рокет-иммуноэлектрофореграммы белков проростков озимой пшеницы, подвергнутых холодовому закаливанию при 4⁰С в течение различных промежутков времени. В гель внесена сыворотка на БХШ 310. Белок окрашен Кумасси R-250.

1 - контроль (26⁰С), 2 - 1 час, 3 - 3 часа, 4 - 5 часов, 5 - 7 часов, 6 - 1 сутки, 7 - 3 суток, 8 - 5 суток, 9 - 7 суток.

Картина индукции синтеза этого стрессового белка при низкотемпературном воздействии согласуется с данными, имеющимися в литературе (Войников, Корытов, 1991, 1993;

Sarhan, Chevrier, 1985). Ранее было показано, что гипотермия вызывает в клетках озимой пшеницы образование двух типов стрессовых белков: с высокой и низкой индукцией синтеза. Белки с высокой индукцией синтеза можно обнаружить в самые первые моменты действия неблагоприятной температуры. Стрессовые белки с низкой индукцией синтеза появляются в клетках озимой пшеницы при достаточно долгом действии низкой температуры, причем с образованием последних хорошо коррелирует степень морозоустойчивости пшеницы (Войников, Кобытов, 1993). По-видимому, исследуемый белок у озимой пшеницы относится к белкам, имеющим два максимума индукции синтеза, и для повторной индукции его синтеза и накопления в клетках озимой пшеницы требуется действие низкой температуры в течение нескольких суток. Наличие двух пиков индукции синтеза белка с молекулярной массой 310 кДа позволяет также предположить, что данный белок при кратковременной гипотермии («холодовом шоке») и при длительной гипотермии (в процессе закаливания) выполняет различающиеся функции.

Таблица 3

Влияние закаливания при 4⁰С на относительное содержание (%) антигена с молекулярной массой 310 кДа в проростках озимой пшеницы

Время закаливания	Относительное содержание антигена, %
0 часов (контроль)	100 ± 1.0
1 час	110 ± 2.0
3 часа	97 ± 2.0
5 часов	87 ± 1.5
7 часов	85 ± 1.5
1 сутки	92 ± 1.0
3 суток	135 ± 1.0
5 суток	142 ± 1.5
7 суток	148 ± 1.5

5.3 Содержание стрессового белка 310 кДа в неохлажденных проростках контрастных по холодоустойчивости генотипов озимой пшеницы.

Полученная антисыворотка против белка с мол. массой 310 кДа была использована для изучения содержания этого белка методом ракет-иммуноэлектрофореза в нестрессированных (выращенных при 26°C) трехсуточных проростках ряда генотипов озимой пшеницы, контрастных по холодоустойчивости. Для сравнения использовали особо высокоморозоустойчивые генотипы озимой пшеницы (линии 11, 8) и сорт «Иркутская озимая», успешно перезимовывающие в крайне суровых для этой культуры условиях Иркутской области, и генотип 460 Г, обладающий низкой морозоустойчивостью. Было установлено, что относительное содержание белка с мол. массой 310 кДа у высокоустойчивых генотипов в 1.25 - 1.6 раза превосходит его содержание у малоустойчивого генотипа (рис. 15; табл. 4) (Колесниченко и др., 1990).

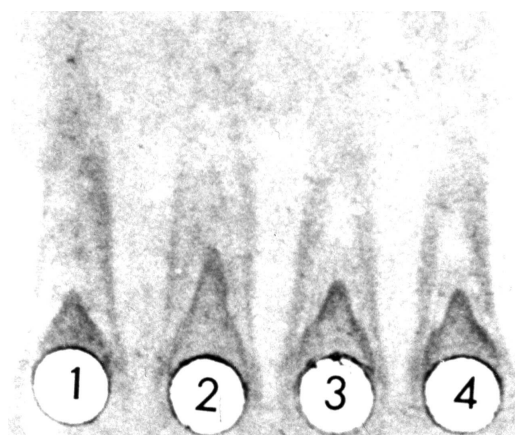


Рис.15. Ракет-иммуноэлектрофореграммы белков трехсуточных проростков различающихся по зимостойкости генотипов озимой пшеницы. В гель внесена сыворотка на антиген с ОЭП 0.35. Белок окрашен Кумасси R-250.
1 - генотип 460Г; 2 - линия 8;
3 - «Иркутская озимая»; 4 - линия 11.

Картина экспрессии белка с молекулярной массой 310 кДа имеет аналогии с картинами экспрессии многих белков теплового шока (БТШ). Известно, что многие БТШ синтезируются в клетке конститутивно. Такие данные имеются для белков семейств БТШ70 и БТШ90 (Landry et al., 1982; Vierling, 1991). Имеются мутанты дрожжей *S. cerevisiae*, конститутивно синтезирующие белки теплового шока при «нормальной» температуре и характеризующиеся повышенной устойчивостью к тепловому шоку (Iida, Yahara, 1984).

Таблица 4

Относительное содержание (%) антигена ОЭП 0.30 в проростках озимой пшеницы, контрастных по холодоустойчивости

Генотипы	Относительное содержание антигена, %
460 Г*	100±1.0
11**	138±1.5
Иркутская озимая**	125±1.0
8**	160±2.0

* При перезимовке в условиях Иркутской области вымерзает.

** Высокоустойчивы. Успешно переносят перезимовку в условиях Иркутской области.

Таким образом, по аналогии с картиной конститутивного синтеза белков теплового шока и учитывая то, что при кратковременной гипотермии содержание белка 310 кДа резко возрастает, можно утверждать, что степень экспрессии этого антигена в «контрольных» нестрессированных проростках влияет на холодоустойчивость данного генотипа озимой пшеницы.

5.4 Локализация генов, регулирующих синтез белка с молекулярной массой 310 кДа

Проведенное ранее (Войников и др., 1987) изучение линий озимой пшеницы с межсортовым замещением хромосом, при котором все пары хромосом D-генома, а также некоторые хромосомы A и B-геномов озимой пшеницы Безостая 1 были замещены на соответствующие пары хромосом высокоморозоустойчивой пшеницы сорта Альбидум 114, показало, что только две хромосомы (1D и 6D) генома пшеницы Альбидум 114 контролируют энергетическую активность митохондрий при гипотермии и переход митохондрий в низкоэнергетическое состояние, а также уровень морозоустойчивости растения. Промораживание растительного материала проводили в следующем режиме: в стадии кущения температуру в камере, в которой

выращивались растения, снижали со скоростью 1 град/час до минимума (-17°C); при минимальной температуре растения выдерживали в течение 24 часов, а затем температуру поднимали со скоростью 1 град/час до 5°C. Растения выдерживали 1 сутки при +5°C, а затем отращивали одну неделю при комнатной температуре. При анализе данных, полученных при подсчете выживших растений, было установлено, что, если выживаемость линий с замещенными 1А (66.97% \pm 1.42%) и 6А (69.38% \pm 1.49%) хромосомами близка к выживаемости пшеницы сорта Безостая 1 (71.00% \pm 2.58%), то выживаемость линий с замещенными 1D (80.72% \pm 2.08%) и 6D (78.17% \pm 1.42%) хромосомами значительно выше выживаемости сорта Безостая 1 и вплотную приближалась к уровню выживаемости пшеницы сорта Альбидум 114 (82.29% \pm 1.90%) (табл. 5). Выживаемость линий с замещением других хромосом была на уровне пшеницы сорта Безостая 1 или даже ниже (Войников и др., 1998).

Таблица 5

Содержание белка 310 кДа в растениях и морозоустойчивость линий озимой пшеницы сорта Безостая 1 с межсортовым замещением хромосом от пшеницы Альбидум 114

Вариант	Относительное содержание белка 310 кДа, %	Выживаемость при температуре -17°C, %
Безостая 1	100 \pm 1.0	71.00 \pm 2.58
Альбидум 114	154 \pm 2.0	82.29 \pm 1.90
1D	138 \pm 2.0	80.72 \pm 2.08
6D	130 \pm 2.0	78.17 \pm 1.42
1A	93 \pm 1.5	66.97 \pm 1.42
6A	100 \pm 1.5	69.38 \pm 1.49

Поскольку было обнаружено, что добавление к инкубируемым *in vitro* митохондриям озимой пшеницы очищенного белка с молекулярной массой 310 кДа, выделенного из проростков озимой ржи, вызывает переход митохондрий в низкоэнергетическое состояние, было выдвинуто предположение, что именно 1-я и 6-я хромосомы D-генома мягкой пшеницы несут информацию об этом белке.

Для проверки этого предположения было проведено сравнение относительного содержания этого белка в трехсуточных проростках пшеницы Альбидум 114 и четырех линий пшеницы Безостая 1, в которых были замещены пары хромосом 1D, 6D, 1A и 6A, соответственно (рис. 16). В ходе эксперимента было установлено, что замещение хромосом пшеницы сорта Безостая 1 на хромосомы А-генома пшеницы сорта Альбидум 114 не вызывает изменения уровня экспрессии генов, кодирующих данный белок (при замене хромосомы 6A), или даже вызывает незначительное снижение уровня его экспрессии (при замене хромосомы 1A). В то же время введение в геном пшеницы сорта Безостая 1 6-ой хромосомы из D-генома пшеницы сорта Альбидум 114 вызвало увеличение уровня содержания интересующего нас белка до 130% к уровню его содержания у Безостой 1, а введение в геном Безостой 1 1D-хромосомы пшеницы Альбидум 114 вызвало увеличение содержания белка 310 кДа до 138% к уровню его содержания у Безостой 1. Ранее было установлено, что уровень содержания этого белка у пшеницы сорта Альбидум 114 составляет 154% по отношению к его содержанию у Безостой 1 (табл. 5) (Войников и др., 1998).

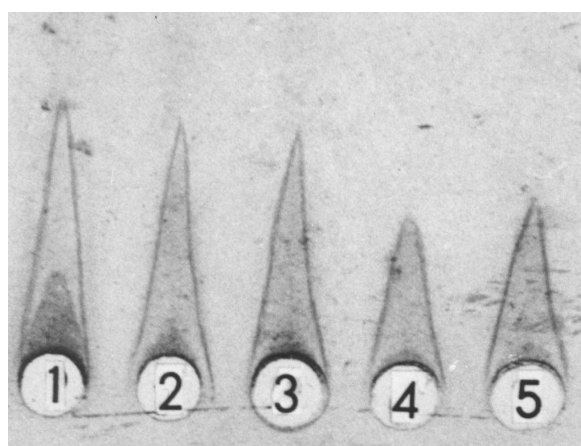


Рис. 16 Рокет-иммуноэлектрофореграммы белков проростков озимой пшеницы сорта Альбидум 114 (1) и белков линий озимой пшеницы сорта Безостая 1 с замещением пар хромосом от пшеницы сорта Альбидум 114 (2-5). В гель внесена сыворотка на БХШ 310. Белок окрашен Кумасси R-250.

Белки: пшеница Альбидум 114 (1); линии с замещенными хромосомами 1D (2); 6D (3); 1A (4) и 6A (5).

Следует отметить, что и относительное содержание белка 310 кДа, и уровень морозостойкости линий пшеницы сорта

Безостая 1 с замещенными хромосомами 1D и 6D ниже, чем у пшеницы сорта Альбидум 114. То же можно сказать и о степени эффекта изменения активности митохондрий при их переходе в низкоэнергетическое состояние. Объясняется это по всей видимости тем, что в клетках замещенных линий хромосомы 1D и 6D пшеницы Альбидум 114 оказались в иной генотипической среде и экспрессия их генов изменилась.

Таким образом, на основании полученных результатов можно с достаточной степенью уверенности сделать вывод, что гены, кодирующие белок с молекулярной массой 310 кДа, локализованы в 1-ой и 6-ой хромосомах D-генома озимой пшеницы, причем 1D хромосома в большей степени ответственна за степень экспрессии данного белка в клетке.

6 Влияние БХШ 310 на функционирование митохондрий в условиях гипотермии

Как было установлено ранее, в ответную реакцию на гипотермию вовлекаются клеточные органеллы, в том числе митохондрии (Войников, 1987). В частности установлено, что кратковременное охлаждение проростков морозоустойчивых озимых злаков приводит к термогенезу за счет перехода митохондрий в низкоэнергетическое состояние, характеризующееся снижением сопряженности окисления и фосфорилирования и увеличением нефосфорилирующего дыхания (Войников, 1987). При этом показано, что переход митохондрий в низкоэнергетическое состояние находится под генетическим контролем (Leenders et al., 1974) и предполагается, что при гипотермии в растительных клетках синтезируются стрессовые белки, индуцирующие этот переход в митохондриях (Войников, 1987). Для проверки предположения, не является ли стрессовый белок БХШ 310 посредником, индуцирующим этот переход, были проведены эксперименты по инкубации митохондрий *in vitro* в условиях гипотермии в присутствии в среде инкубации стрессового белка БХШ 310.

В ходе этих экспериментов митохондрии выделяли из срезанных побегов озимой пшеницы с помощью дифференциального центрифугирования по ранее описанному методу (Войников и др., 1991) и использовали для двух целей: для экстракции из них белков и для анализа энергетической активности.

Для очистки органелл митохондриальный осадок, полученный с помощью дифференциального центрифугирования, ресуспендировали в среде следующего состава: сахароза (250 мМ), KH_2PO_4 (18 мМ), pH 7.4. Очистку проводили с помощью перколла (21%).

Из очищенных митохондрий экстрагировали белки и растворяли их в 3 мМ фосфатном буфере, содержащем 0.15 М NaCl и использовали для анализа методом двойной иммунодиффузии в геле по Ухтерлони (Остерман, 1983). При реакции антисыворотки на БХШ 310 с митохондриальными белками (легкорастворимыми белками матрикса) образовывалась четкая линия преципитации, говорящая о наличии этого антигена в белках митохондрий (рис. 17).

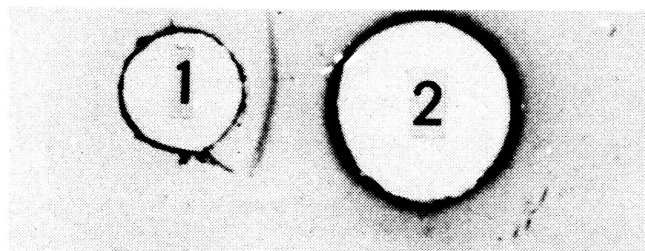


Рис. 17. Двойная иммунодиффузия в 1% агарозном геле сыворотки против БХШ 310 и белков митохондрий озимой пшеницы.

1- белки митохондрий, 2- сыворотка против БХШ 310.

Результаты, полученные в эксперименте по двойной иммунодиффузии, послужили основанием для изучения влияния белка с молекулярной массой 310 кДа на энергетическую активность изолированных митохондрий при гипотермии. Для этой цели митохондриальный осадок ресуспендировали в среде следующего состава: MOPS-КОН буфер (20 мМ, pH 7.4), сахароза (0.3 М), KH_2PO_4 (18 мМ), БСА (0.05%), АТФ (4 мМ), АДФ (4 мМ), малат (10 мМ), глутамат (1

мМ). Полученную суспензию митохондрий делили на три части, в первую из которых добавляли выделенный стрессовый белок (1 мг белка на 3 мг митохондриального белка), во вторую - такое же количество БСА, в третью часть не делали никаких добавок. Полученные три типа митохондриальной суспензии инкубировали при 0°C в течение 90 минут и использовали для анализа энергетической активности, которую регистрировали полярографически с помощью платинового электрода закрытого типа (Estabrook, 1967). Реакционная среда содержала сахарозу (300 мМ), MOPS-КОН буфер (20 мМ, pH 7.4), KH_2PO_4 (18 мМ), MgCl_2 (1 мМ). В качестве субстрата окисления использовали малат (10 мМ) в присутствии глутамата (1 мМ). В ходе эксперимента установлено, что инкубация *in vitro* хорошо сопряженных митохондрий пшеницы со стрессовым белком в условиях гипотермии (0°C) в течение 90 минут индуцирует в органеллах переход в низкоэнергетическое состояние.

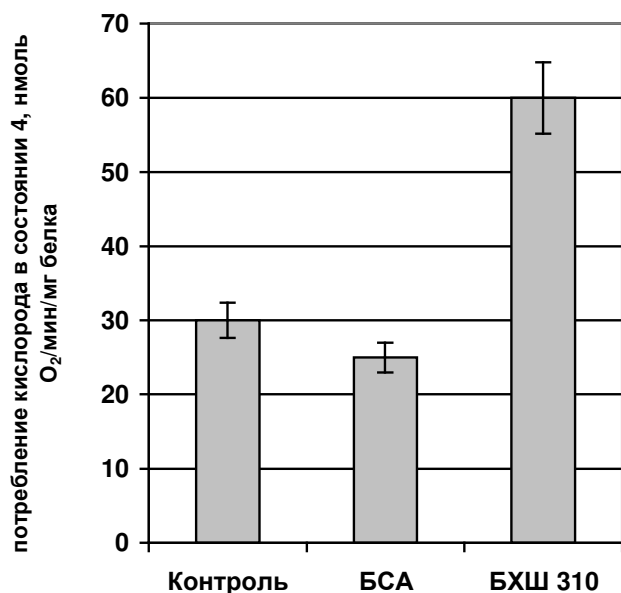


Рис. 18. Нефосфорилирующее дыхание (состояние 4) митохондрий озимой пшеницы после их инкубации *in vitro* с БХШ 310 озимой ржи в условиях гипотермии (0°C) в течение 90 мин. Контроль – контрольные митохондрии; БСА – с добавлением БСА (1 мг на 3 мг митохондриального белка); БХШ 310 – с добавлением БХШ 310 (1 мг на 3 мг митохондриального белка).

Результаты экспериментов показывают, что в присутствии этого белка в митохондриях увеличивалось нефосфорилирующее (состояние 4) дыхание (рис. 18) и на 20% снижался дыхательный контроль по Чансу-Вильямсу, что

свидетельствует о снижении сопряженности окисления и фосфорилирования. Бычий сывороточный альбумин, использованный в эксперименте в качестве дополнительного контроля, в этих же условиях не вызывал переход митохондрий в низкоэнергетическое состояние (рис. 18) (Побежимова и др., 1996).

Таким образом, поскольку показано, что белок с молекулярной массой 310 кДа является стрессовым и его количество в проростках морозоустойчивых озимых злаков возрастает при кратковременной гипотермии, а также поскольку этот белок обнаружен в растительных митохондриях и установлено, что при гипотермии он вызывает переход органелл в низкоэнергетическое состояние, что, как было показано в работе (Войников, 1987), приводит к термогенезу и генетически контролируется, то обосновано предположение, что белок с молекулярной массой 310 кДа является посредником, с помощью которого осуществляется генетический контроль за термогенезом митохондрий морозоустойчивых озимых злаков в условиях кратковременной гипотермии.

6.1 Влияние низкотемпературного стресса на переход митохондрий злаков и двудольных растений в низкоэнергетическое состояние

Ранее было установлено, что под действием низкотемпературного стресса митохондрии морозоустойчивых сортов озимой пшеницы переходят в низкоэнергетическое состояние, характеризующееся разобщением окисления и фосфорилирования (Войников, 1987). Однако не было установлено, насколько широко этот механизм распространен среди разных таксономических групп растений. Для выяснения этого вопроса было проведено изучение влияния низкотемпературного стресса на энергетическую активность митохондрий ряда как холодостойких, так и теплолюбивых растений.

Для этого была проведена серия экспериментов с целью установить, переходят ли во время низкотемпературного

стресса в низкоэнергетическое состояние митохондрии проростков злаков - озимой ржи, озимой пшеницы, кукурузы и двудольных растений – гороха, тыквы и подсолнечника. Продолжительность низкотемпературного стресса в этих экспериментах составляла 1 час для всех исследованных видов. Интенсивность стресса подбиралась экспериментально и составляла -2°C для наиболее морозостойкой озимой ржи, -1°C для озимой пшеницы, гороха, тыквы и подсолнечника и 0°C для кукурузы. В ходе экспериментов было установлено, что более низкие температуры вызывали резкое снижение фосфорилирующего дыхания, по-видимому, вследствие ингибирования адениннуклеотидтранслоказы. Для устранения разобщающего действия свободных жирных кислот во все среды для выделения митохондрий добавлялся 0.1% бычий сывороточный альбумин.

Изолированные митохондрии всех исследованных видов, выделенные из нестрессированных проростков, имели высокую степень сопряжения окисления и фосфорилирования (табл. 6, 7). Коэффициент дыхательного контроля составлял от 3.34 у озимой ржи до 4.08 у гороха и 4.57 у тыквы. Отношение АДФ:О у всех исследованных видов было также высоко.

Результаты экспериментов показали, что охлаждение проростков всех исследованных видов злаков, включая теплолюбивую кукурузу, вызвало значительные изменения в энергетической активности изолированных из них митохондрий (табл. 6). У митохондрий всех видов злаков было отмечено незначительное увеличение скорости фосфорилирующего (состояние 3) дыхания, значительный подъем скорости нефосфорилирующего (состояние 4) дыхания, уменьшением коэффициента дыхательного контроля и отношения АДФ:О. Таким образом, митохондрии всех исследованных видов злаков, включая теплолюбивую кукурузу, во время низкотемпературного стресса переходят в низкоэнергетическое состояние. Наибольшее снижение

сопряжения окисления и фосфорилирования было отмечено у стрессированных митохондрий озимой ржи и пшеницы. Уменьшение сопряженности у митохондрий этих злаков происходило за счет увеличения скорости нефосфорилирующего дыхания (табл. 6). У митохондрий озимой ржи, выделенных из стрессированных растений, увеличение скорости нефосфорилирующего дыхания составило 60.7% по отношению к контролю, а уменьшение коэффициента дыхательного контроля – 24%. Уменьшение отношения АДФ:О у митохондрий озимой ржи, выделенных из стрессированных растений, составляло 27% от контрольных митохондрий. Весьма значительны эти показатели были и у митохондрий озимой пшеницы. Увеличение скорости нефосфорилирующего дыхания у них составило 68.5% по отношению к контролю, а уменьшение коэффициента дыхательного контроля – 35.5%. В то же время отношение АДФ:О у пшеницы снижалось только на 3%. Увеличение скорости нефосфорилирующего дыхания у митохондрий стрессированных проростков кукурузы было самым незначительным и составляло около 20%, а уменьшение коэффициента дыхательного контроля – около 11% .

В то же время при изучении влияния низкотемпературного стресса на проростки двудольных растений было установлено, что изменения параметров сопряженности окисления митохондрий в результате низкотемпературного стресса не происходят (табл. 7). Низкотемпературный стресс не вызвал у исследованных видов двудольных растений, включая холодостойкий горох, ни увеличения скорости нефосфорилирующего дыхания, ни уменьшения коэффициента дыхательного контроля (рис. 19). Отношение АДФ:О во время холодового стресса у исследованных видов двудольных растений также не менялось. В связи с этим можно предположить, что холодостойкость гороха во время кратковременного низкотемпературного стресса обеспечивается механизмами, отличными от механизмов, существующих у злаков.

Таблица 6

Параметры энергетической активности митохондрий контрольных и стрессированных проростков ряда видов злаков. Субстрат окисления: 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата. $M \pm m$, $n=6$.

Вариант опыта	Скорость поглощения кислорода, нмоль O ₂ /мин/мг белка		ДК	АДФ:О
	Состояние 3	Состояние 4		
Озимая рожь				
контроль	93,7±7,9	27,9±2,7	3,34±0,04	2,97±0,01
-2 ⁰ С, 1 ч	110,5±6,6	44,8±2,8	2,47±0,03	2,17±0,10
Озимая пшеница				
контроль	98,0±4,3	24,8±1,7	3,97±0,09	2,90±0,13
-1 ⁰ С, 1 ч	106,8±6,0	41,7±1,4	2,56±0,09	2,82±0,04
Кукуруза				
контроль	104,5±4,4	27,8±1,5	3,76±0,12	2,71±0,05
0 ⁰ С, 1ч	111,8±4,9	33,5±1,6	3,35±0,02	2,46±0,07

Таблица 7

Параметры энергетической активности митохондрий контрольных и стрессированных проростков ряда видов двудольных растений. Субстрат окисления: 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата. $M \pm m$, $n=6$

Вариант опыта	Скорость поглощения кислорода, нмоль O ₂ /мин/мг белка		ДК	АДФ:О
	Состояние 3	Состояние 4		
Горох				
контроль	82,1±4,5	20,1±1,1	4,08±0,01	2,59±0,01
-1 ⁰ С, 1 ч	80,6±1,4	19,9±1,1	4,05±0,07	2,57±0,14
Тыква				
контроль	82,4±3,4	17,8±1,1	4,57±0,29	3,03±0,05
-1 ⁰ С, 1 ч	81,6±1,4	17,3±0,6	4,73±0,12	2,82±0,04
Подсолнечник				
контроль	75,7±6,1	23,4±2,6	3,33±0,08	2,41±0,15
-1 ⁰ С, 1 ч	76,0±7,0	22,6±1,5	3,36±0,30	2,39±0,08

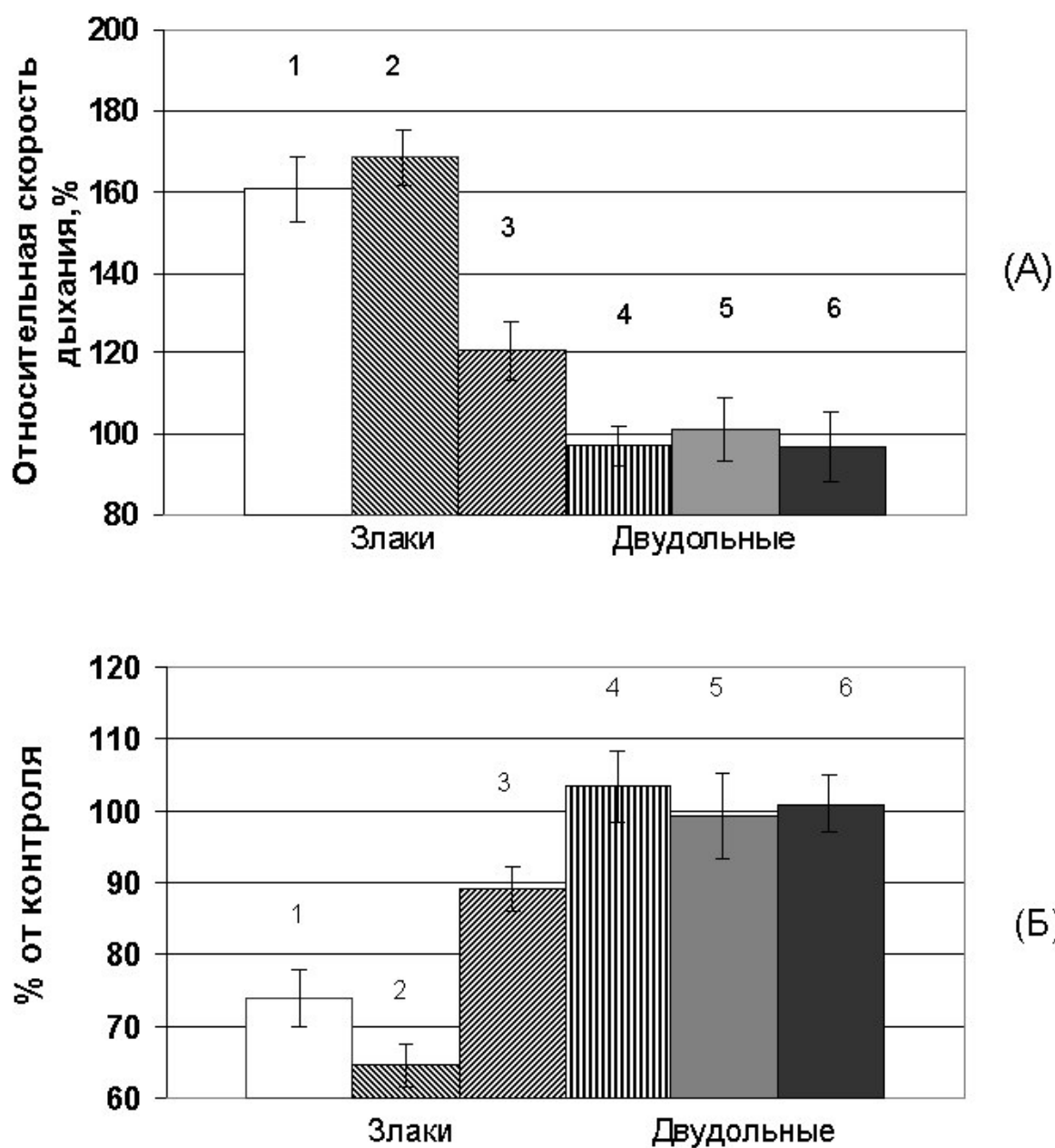


Рис. 19. Изменение относительных скоростей дыхания в состоянии 4 (А) и величины дыхательного контроля (Б) митохондрий во время низкотемпературного стресса (1 час). Стрессирующая температура: озимая рожь (1) - -2°C ; озимая пшеница (2) - -1°C ; горох (5), подсолнечник (6) - -1°C ; кукуруза (3), тыква (4) - 0°C . Субстрат окисления: 10 мМ малат+10 мМ глутамат. За 100 % приняты дыхательные параметры неохлажденных митохондрий. $M \pm m$, $n=6$.

7 ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ, ИММУНОХИМИЧЕСКИ РОДСТВЕННЫХ БХШ 310, У ОДНОДОЛЬНЫХ И ДВУДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ

Поскольку при помощи двумерного иммуноэлектрофореза иммунохимически родственные БХШ 310 белки были обнаружены не только у озимой ржи (Колесниченко и др., 1996), но и в цитоплазматических белках озимой пшеницы (Мишарин и др., 1997), и, как показано выше, у всех исследованных злаков наблюдался переход очищенных от жирных кислот митохондрий в низкоэнергетическое состояние, необходимо было установить, присутствуют ли в цитоплазматических и митохондриальных белках злаков БХШ 310 и иммунохимически родственные ему белки.

В то же время, поскольку переход в низкоэнергетическое состояние не был отмечен у очищенных от жирных кислот митохондрий изученных видов двудольных растений (Grabelnuch et al., 2001c), представляло определенный интерес установить, имеются ли субъединицы БХШ 310 в спектрах полипептидов представителей двудольных растений, или у них имеются другие иммунохимически родственные субъединицам БХШ 310 полипептиды. Для поиска иммунохимически родственных БХШ 310 белков при помощи вестерн-блоттинга были выбраны как холодостойкие, так и теплолюбивые виды растений. В этих экспериментах поиск в полипептидных спектрах контрольных и стрессированных проростков гороха, тыквы и подсолнечника белков, иммунохимически родственных субъединицам БХШ 310 был проведен при помощи ДДС-На электрофореза с последующим вестерн-блоттингом с поликлональными антителами против БХШ 310.

7.1 Идентификация и определение характеристик белков, иммунохимически родственных БХШ 310 среди цитоплазматических белков ряда культурных и дикорастущих злаков

В ходе этих экспериментов, прежде всего, было необходимо решить вопрос, уникален ли стрессовый белок БХШ 310 в спектрах белков злаков, или он является представителем семейства иммунохимически родственных белков, различающихся у растений с различной устойчивостью к низким температурам. Для решения этого вопроса был предпринят поиск белков, иммунохимически родственных БХШ 310, среди нативных белков ряда культурных и дикорастущих злаков с различной холодостойкостью – высокоустойчивых пырейника и озимой ржи, среднеустойчивой озимой пшеницы и неустойчивой к действию низкой температуры кукурузы. Для идентификации и определения характеристик белков, иммунохимически родственных БХШ 310 среди цитоплазматических белков ряда культурных и дикорастущих злаков был применен электрофорез нативных белков со сдвигом заряда с последующим вестерн-блоттингом с поликлональными антителами на БХШ 310 (Kolesnichenko et al., 1999; Колесниченко и др., 2000a).

Нативный электрофорез белков озимой ржи (*Secale cereale* L.), озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), кукурузы (*Zea mays* L.) и пырейника (*Elymus sibiricus* L.) показал значительные различия в составе нативных белков исследованных видов. Прежде всего, в спектре нативных белков кукурузы имеются значительные отличия от спектров нативных белков представителей родов трибы *Triticeae* в высокомолекулярной области (рис. 20). В спектре кукурузы содержание белков с молекулярными массами выше 300 кДа меньше, чем у других сравниваемых видов. В то же время у кукурузы имеется четкая линия с молекулярной массой около 230 кДа, практически отсутствующая у остальных видов.

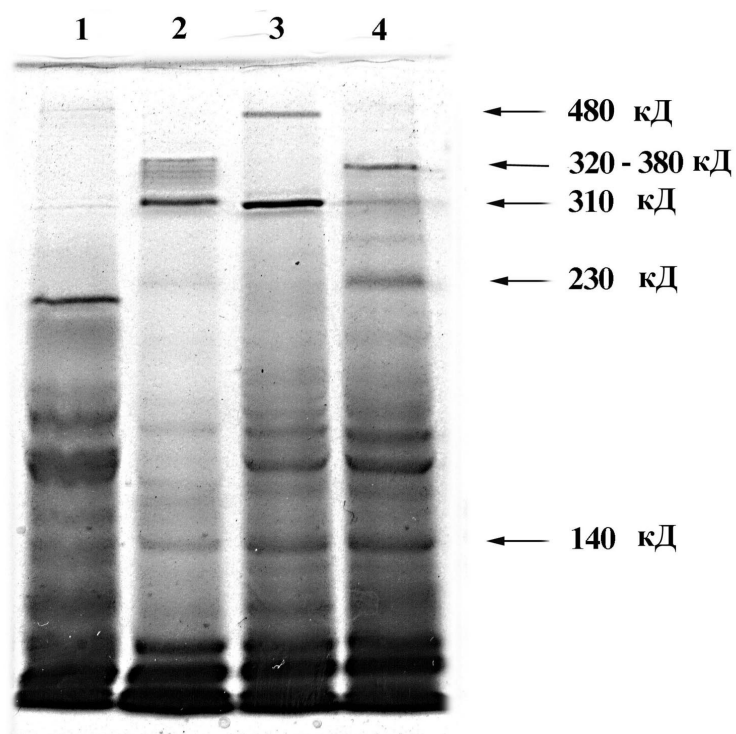


Рис. 20. Электрофорез нативных цитоплазматических белков кукурузы (1), пырейника (2), озимой ржи (3) и озимой пшеницы (4). Гель окрашен Кумасси R-250.

Спектр белков пырейника содержит меньше белков в области 150 - 300 кДа, чем спектры пшеницы и ржи. У пырейника содержание белков с молекулярными массами около 230 и 110 - 140 кДа значительно ниже, чем у ржи и пшеницы. В то же время в области 380 - 320 кДа у пырейника имеются пять четких линий белков, практически отсутствующих у ржи. У пшеницы в некотором количестве в этой области имеется только один белок с молекулярной массой около 360 кДа (рис. 20). Спектры белков ржи и пшеницы в области ниже 200 кДа очень близки, однако у пшеницы практически отсутствует линия белка с молекулярной массой 310 кДа, присутствующая в спектрах ржи и пырейника. В то же время белок с молекулярной массой около 230 кДа имеется в значительных количествах только в спектрах пырейника и пшеницы (рис. 20).

При помощи вестерн-блоттинга с поликлональными антителами на БХШ 310 из озимой ржи среди белков исследованных видов растений был проведен поиск иммунохимически родственных БХШ 310 белков. Вестерн-блоттинг нативных белков озимой ржи показал, что, кроме

собственно белка с молекулярной массой 310 кДа, в спектре имеется ряд относительно низкомолекулярных иммунохимически родственных ему белков с молекулярными массами 110 - 140 кДа, а также белок с молекулярной массой около 230 кДа (рис. 21) (Kolesnichenko et al., 1999; Колесниченко и др., 2000а).

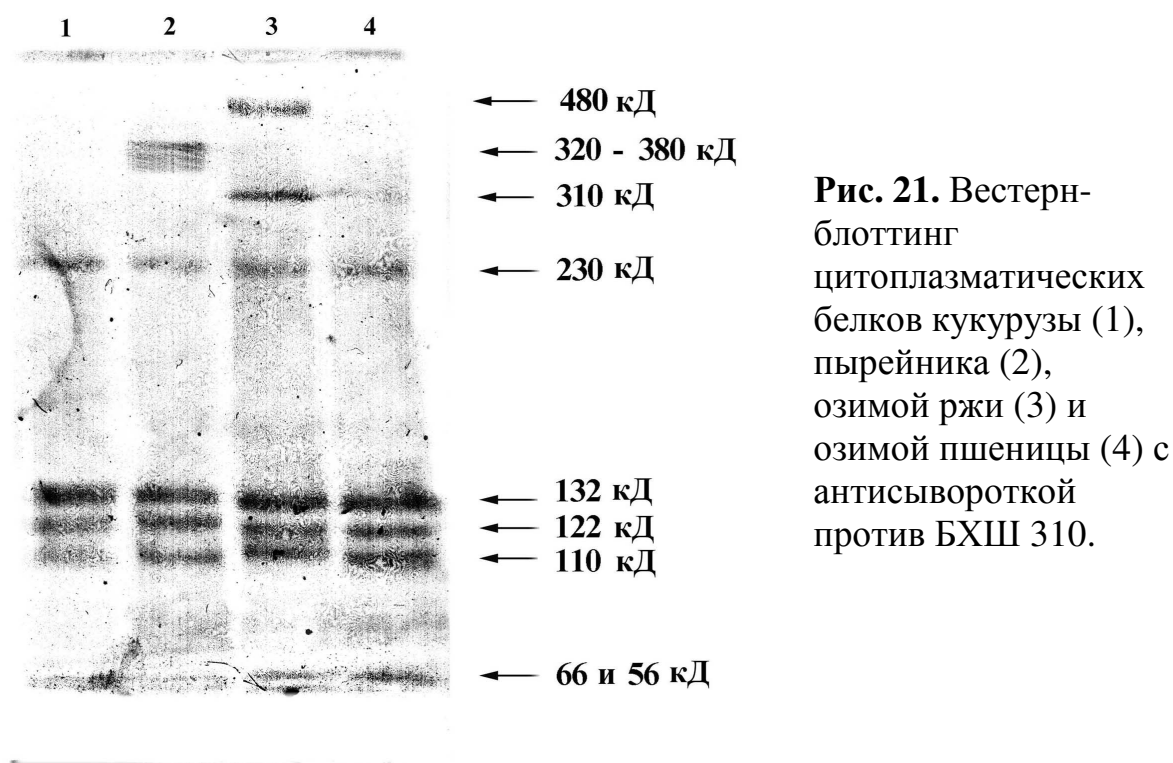


Рис. 21. Вестерн-блоттинг цитоплазматических белков кукурузы (1), пырейника (2), озимой ржи (3) и озимой пшеницы (4) с антисывороткой против БХШ 310.

Белки с молекулярными массами 110 - 140 кДа были обнаружены при помощи вестерн-блоттинга среди нативных белков всех исследованных видов растений, так же, как и белок с молекулярной массой около 230 кДа (рис. 21). Белки с молекулярными массами около 480 и 310 кДа в значительном количестве были обнаружены только у озимой ржи. У пырейника при помощи вестерн-блоттинга обнаруживался также ряд белков с молекулярными массами 380 - 320 кДа, отсутствующих в спектрах белков других сравниваемых видов (рис. 21).

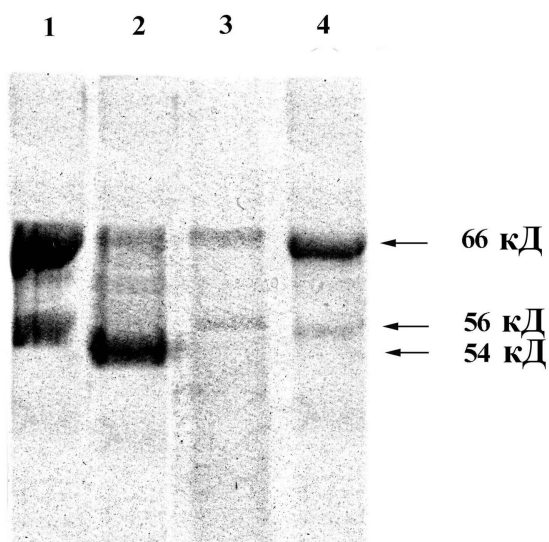


Рис. 22. Электрофорез субъединиц иммунохимически родственных БХШ 310 нативных белков кукурузы (1) пырейника (2) озимой ржи (3) и озимой пшеницы (4), полученных при помощи аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованной сывороткой против БХШ 310.

Для выяснения субъединичного состава иммунохимически родственных БХШ 310 белков, обнаруженных в белках исследованных видов, при помощи аффинной хроматографии на колонке с антителами к БХШ 310 были получены препараты иммунохимически родственных БХШ 310 белков из кукурузы, пырейника, озимой ржи и пшеницы. Электрофорез в ПААГ с ДДС-На показал, что субъединичный состав иммунохимически родственных БХШ 310 белков у всех исследованных видов растений практически одинаков - все родственные белки состоят из двух типов субъединиц с молекулярными массами 66 и 56 кДа (рис. 22). Только у пырейника субъединица с меньшей молекулярной массой имеет несколько отличную от субъединиц кукурузы, ржи и пшеницы молекулярную массу - 54 кДа. В то же время содержание субъединиц относительно друг друга у исследованных видов значительно отличается (рис. 22). Если у кукурузы, озимой ржи и озимой пшеницы содержание субъединицы с молекулярной массой 66 кДа преобладает над содержанием субъединицы 56 кДа, то у пырейника наблюдается обратная картина - количественное преобладание в спектре белков субъединицы с молекулярной массой 54 кДа.

Таким образом, у исследованных злаков обнаружено целое семейство иммунохимически родственных БХШ 310 нативных белков. На основании полученных результатов можно также сделать вывод, что все выявляемые у исследованных видов при помощи вестерн-блоттинга иммунохимически родственные БХШ 310 белки состоят из различных комбинаций двух типов субъединиц, причем только у высокоустойчивых к низким температурам пырейника и озимой ржи в спектрах нативных белков присутствуют высокомолекулярные родственные БХШ 310 белки с молекулярными массами 310 кДа и выше. Этот факт позволяет высказать предположение о связи наличия в спектрах именно высокомолекулярных иммунохимически родственных БХШ 310 белков с высокой устойчивостью данных видов к действию низких температур (Колесниченко и др., 2000а).

7.2 Идентификация и определение характеристик белков, иммунохимически родственных БХШ 310 среди цитоплазматических белков двудольных растений

Поскольку при помощи Na-ДДС электрофореза было установлено, что все нативные иммунохимически родственные БХШ 310 белки у злаков состоят только из двух типов субъединиц, представляло определенный интерес установить, имеются ли субъединицы БХШ 310 в спектрах полипептидов представителей двудольных растений, или у них имеются другие иммунохимически родственные субъединицам БХШ 310 полипептиды. Для поиска иммунохимически родственных БХШ 310 белков при помощи вестерн-блоттинга были выбраны как холодостойкие, так и теплолюбивые виды растений. В этих экспериментах поиск в полипептидных спектрах гороха, тыквы и подсолнечника белков, иммунохимически родственных субъединицам БХШ 310, был проведен при помощи ДДС-Na электрофореза с последующим вестерн-блоттингом с поликлональными антителами против БХШ 310.

Результаты экспериментов свидетельствуют, что у исследованных представителей класса двудольных в спектрах полипептидов присутствовали дополнительные полипептиды как с большей мол. массой (100, 85, 70 кДа), так и с меньшей мол. массой (45, 36 – 29 и около 20 кДа) (рис. 23). При этом в спектрах исследованных представителей видов двудольных растений наблюдались значительные различия как в количестве полос иммунохимически родственных БХШ 310 полипептидов, так и в их относительном содержании (рис. 23).

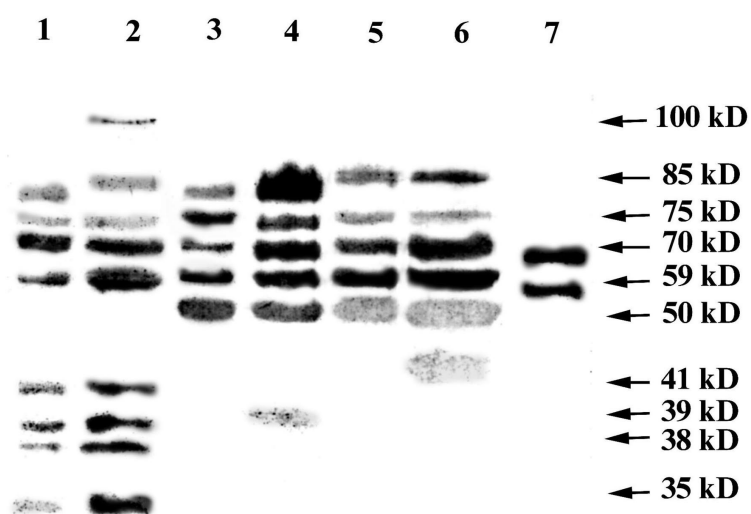


Рис. 23. Вестерн-блоттинг цитоплазматических полипептидов контрольных (1) и стрессированных (-1°C , 1 час) (2) проростков гороха, контрольных (3) и стрессированных (0°C , 1 час) (4) проростков тыквы, контрольных (5) и стрессированных (-1°C , 1 час) (6) проростков подсолнечника и субъединиц БХШ 310 озимой ржи (7) с поликлональными антителами к БХШ 310.

Отсутствие перехода в низкоэнергетическое состояние очищенных от свободных жирных кислот митохондрий двудольных растений, по-видимому, может быть связано с отличием субъединичного состава иммунохимически родственных БХШ 310 белков, поскольку в их спектрах не было обнаружено полипептидов, идентичных субъединицам БХШ 310 (рис. 23). Действительно, у гороха были обнаружены иммунохимически родственные БХШ 310 полипептиды с мол. массами 100, 85, 70, 59, 41, 39, 38 и 35 кДа, у тыквы полипептиды с мол. массами 80, 75, 70, 59 и 50 кДа и у

подсолнечника полипептиды с мол. массами 85, 70, 59 и 50 кДа. Хотя ряд из этих обнаруженных полипептидов, в частности, белки 100 и 59 кДа у гороха, 85, 70 и 59 кДа у тыквы и 85 и 59 кДа у подсолнечника, и индуцировались холодовым шоком и, следовательно, являлись холодовыми стрессовыми белками, отсутствие изменений митохондриальной активности у этих видов растений позволяет сделать вывод, что эти связанные с низкотемпературным стрессом полипептиды у двудольных растений выполняют функции, отличные от функций БХШ 310 у злаков.

Переход митохондрий злаков в низкоэнергетическое состояние хорошо коррелирует с наличием в спектрах белков растений стрессового белка БХШ 310. Митохондрии озимой ржи и пшеницы показывают ярко выраженный ответ на действие низкотемпературного стресса. В то же время у этих видов отмечено присутствие БХШ 310 в цитоплазматических белках (Kolesnichenko et al., 1999; Колесниченко и др., 2000a). Ответ митохондрий кукурузы на низкотемпературный стресс гораздо более слаб, а при анализе иммунохимически родственных БХШ 310 белков установлено, что в цитоплазме кукурузы отсутствует БХШ 310, а имеются только родственные ему нативные белки с меньшими молекулярными массами (Kolesnichenko et al., 1999; Колесниченко и др., 2000a). При этом показано, что белки семейства БХШ 310 у всех исследованных нами злаков состоят из двух типов субъединиц с молекулярными массами 56 и 66 кДа. В то же время при изучении спектров белков гороха, было обнаружено, что в его спектре присутствуют полипептиды, иммунохимически родственные субъединицам БХШ 310, с отличными молекулярными массами (рис. 23). В связи с этим можно предположить, что переход митохондрий озимых злаков во время низкотемпературного стресса в низкоэнергетическое состояние вызывается действием стрессового разобщающего белка БХШ 310.

Таким образом, полученные результаты показывают, что у злаков существует специфический механизм ответа митохондрий на низкотемпературный стресс. В то же время этот механизм отсутствует у гороха. Полученные результаты позволяют также говорить об особом состоянии митохондрий злаков во время низкотемпературного стресса, вызываемом действием стрессового белка БХШ 310.

8 БЕЛКИ, ИММУНОХИМИЧЕСКИ РОДСТВЕННЫЕ СТРЕССОВОМУ БЕЛКУ 310 КДА И ЕГО СУБЪЕДИНИЦАМ, В МИТОХОНДРИЯХ ЗЛАКОВ

8.1 Поиск нативных белков, иммунохимически родственных БХШ 310, в митохондриях злаков

Поскольку при изучении нативных цитоплазматических белков ряда злаков был установлен значительный полиморфизм в содержании высокомолекулярных белков семейства БХШ 310 и в то же время установлено, что данный белок оказывает специфическое влияние на митохондрии озимой пшеницы – разобщение окисления и фосфорилирования – а также выявляется в митохондриях озимой пшеницы при помощи иммунодиффузии, следующим шагом в его исследовании был поиск БХШ 310 и иммунохимически родственных ему белков в спектрах нативных митохондриальных белков пырейника, озимой ржи, озимой пшеницы и кукурузы (Kolesnichenko et al., 2000b).

Нативный электрофорез митохондриальных белков ржи (*Secale cereale* L.), пшеницы (*Triticum aestivum* L.,), кукурузы (*Zea mays* L.) и пырейника (*Elymus sibiricus* L.) показал значительные различия в составе нативных митохондриальных белков исследованных видов (рис. 24). Прежде всего, в спектре нативных митохондриальных белков кукурузы имеются значительные отличия от спектров нативных белков представителей родов трибы *Triticeae* в высокомолекулярной области (рис. 24). В спектре кукурузы содержание белков с молекулярными массами выше 230 кДа меньше, чем у других сравниваемых видов. Спектр

митохондриальных белков пырейника содержит меньше белков в области 150 - 300 кДа, чем спектры кукурузы, пшеницы и ржи. В то же время в митохондриях пырейника в значительных количествах содержится белок с молекулярной массой 310 кДа. Спектры митохондриальных белков ржи и пшеницы похожи, однако у пшеницы относительно несколько ниже содержание белков в области 200 - 300 кДа. В то же время в области 320 - 380 кДа у пшеницы в спектре митохондриальных белков наблюдается ярко выраженная полоса, отсутствующая у других исследованных видов (рис. 24).

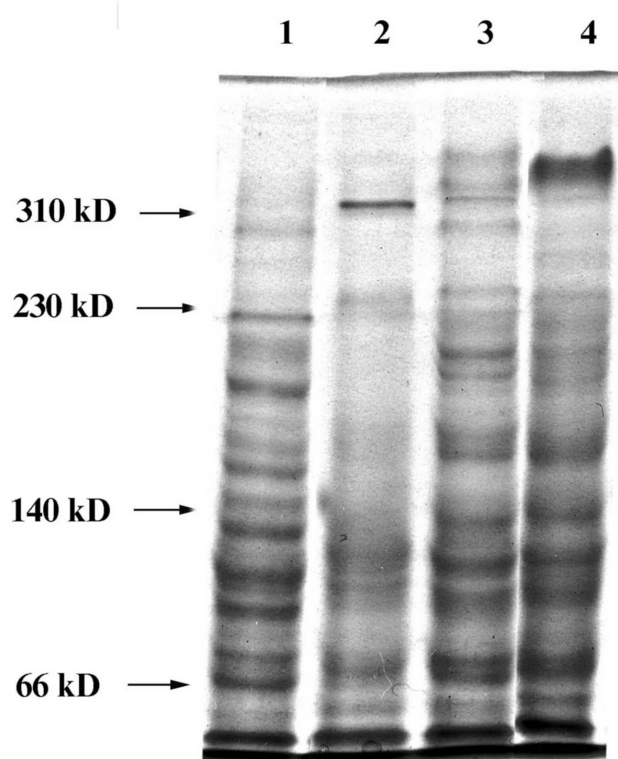


Рис. 24. Нативный электрофорез митохондриальных белков кукурузы (1), пырейника (2), озимой ржи (3) и озимой пшеницы (4). Гель окрашен Кумасси R-250.

При помощи вестерн-блоттинга с поликлональными антителами на БХШ 310 из озимой ржи, среди митохондриальных белков исследованных видов растений был проведен поиск иммунохимически родственных БХШ 310 белков (рис. 25). Вестерн-блоттинг митохондриальных нативных белков всех исследованных злаков показал, что, кроме собственно белка с молекулярной массой 310 кДа, присутствующего в разных количествах у всех исследованных видов, в спектрах кукурузы, ржи и пшеницы в значительном

количестве имеется белок с молекулярной массой около 230 кДа. Данный белок обнаруживался и в спектре пырейника, но в крайне незначительных количествах. Кроме этих белков, в спектрах всех исследованных видов был обнаружен ряд относительно низкомолекулярных иммунохимически родственных БХШ 310 белков с молекулярными массами около 140 кДа, а также белки с молекулярными массами 66 и 56 кДа - субъединицы БХШ 310 (рис. 25) (Kolesnichenko et al., 2000b).

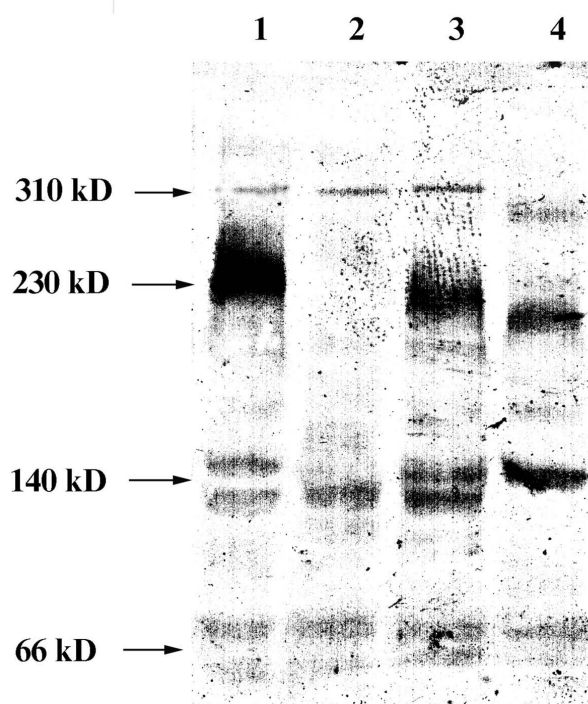


Рис. 25. Вестерн-блоттинг нативных митохондриальных белков кукурузы (1), пырейника (2), озимой ржи (3) и озимой пшеницы (4) с антителами против БХШ 310.

Белки с молекулярными массами около 140 кДа были обнаружены при помощи вестерн-блоттинга среди нативных митохондриальных белков всех исследованных видов растений, хотя и в разном наборе - если у кукурузы и ржи присутствовали все белки, то у пырейника - только более низкомолекулярные, а у пшеницы - более высокомолекулярные. Содержание белка с молекулярной массой 310 кДа было наибольшим у озимой ржи и пырейника, меньшим у пшеницы. Наиболее низким, хотя и определяемым при помощи вестерн-блоттинга, было содержание данного белка в митохондриальных белках кукурузы (рис. 25).

При сравнении спектров митохондриальных и цитоплазматических иммунохимически родственных БХШ 310 белков обнаруживается, что, если в спектрах цитоплазматических белков исследованных видов, особенно в высокомолекулярной области, наблюдается значительный полиморфизм (рис. 21), то, как отмечено выше, спектры митохондриальных иммунохимически родственных БХШ 310 белков значительно более консервативны - у всех исследованных видов состав иммунохимически родственных БХШ 310 белков практически одинаков. Различия наблюдаются только в количественном содержании данных белков. Этот факт позволяет связать отмеченный выше переход митохондрий кукурузы во время низкотемпературного стресса в низкоэнергетическое состояние с разобщающей активностью БХШ 310.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что у всех исследованных видов при помощи вестерн-блоттинга в митохондриальных белках обнаруживаются как БХШ 310, так и иммунохимически родственные ему белки, причем у наиболее холодоустойчивых озимой ржи и пырейника содержание БХШ 310 в митохондриальных белках наиболее велико. Этот факт позволяет высказать предположение о связи уровня содержания данного белка с более высокой устойчивостью этих видов к действию низких температур.

8.2 Характеристика белков, иммунохимически родственных БХШ 310, в субклеточных фракциях проростков озимой ржи

В связи с тем, что, как отмечено выше, БХШ 310 был обнаружен в значительных количествах в цитоплазме и митохондриях озимой ржи, а также с тем, что было показано увеличение его содержания в озимых злаках во время низкотемпературного стресса, был предпринят поиск родственных ему белков в ряде клеточных фракций озимой ржи. Была также предпринята попытка установить некоторые

характеристики белков данного семейства в изученных субклеточных фракциях.

Нативный электрофорез цитоплазматических, митохондриальных и ядерных белков озимой ржи (*Secale cereale* L.) показал значительные различия в составе нативных белков, что свидетельствует о достаточной степени очистки исследованных клеточных фракций (рис. 26). При помощи вестерн-блоттинга с поликлональными антителами на БХШ 310 среди цитоплазматических, митохондриальных и ядерных белков озимой ржи нами был проведен поиск иммунохимически родственных БХШ 310 белков.

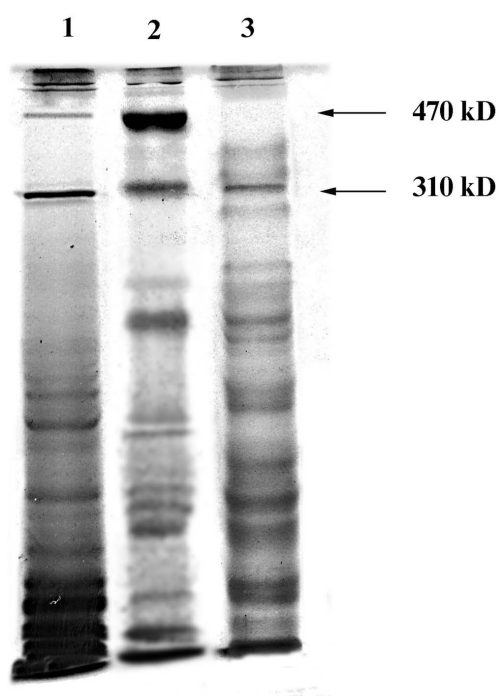


Рис. 26. Нативный электрофорез цитоплазматических (1), ядерных (2) и митохондриальных (3) белков контрольных проростков озимой ржи. Белки окрашены Кумасси-R-250.

Прежде всего, вестерн-блоттинг цитоплазматических нативных белков озимой ржи показал, что в цитоплазме, кроме собственно белка с молекулярной массой 310 кДа, имеется семейство иммунохимически родственных БХШ 310 белков. В данной клеточной фракции присутствуют высокомолекулярный иммунохимически родственный БХШ 310 белок с молекулярной массой около 470 кДа, белок с молекулярной массой около 230 кДа и ряд относительно

низкомолекулярных иммунохимически родственных ему белков с молекулярными массами около 140 кДа (рис. 27).

Спектр нативных митохондриальных белков ржи содержит меньше белков в области выше 150 кДа, чем спектры цитоплазматических и ядерных белков. В митохондриях полностью отсутствует белок с молекулярной массой около 470 кДа. Значительно меньше, чем в цитоплазме и ядрах, белка с молекулярной массой 310 кДа (рис. 26). Вестерн-блоттинг показал, что в данной клеточной фракции, кроме собственно белка с мол. массой 310 кДа, имеются также все иммунохимически родственные БХШ 310 белки с меньшей, чем у БХШ 310, молекулярной массой (рис. 27). В то же время вестерн - блоттинг показал, что белок с мол массой 310 кДа содержится в митохондриях в несколько меньшем количестве, чем в цитоплазме.

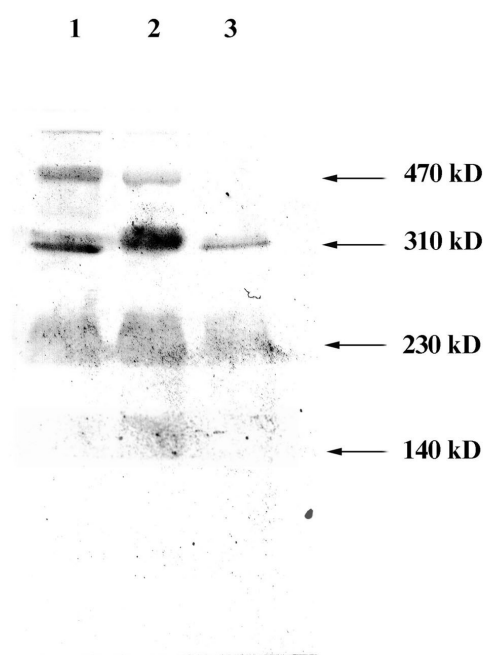


Рис. 27. Вестерн-блоттинг с антисывороткой против БХШ 310 цитоплазматических (1), ядерных (2) и митохондриальных (3) белков контрольных проростков озимой ржи.

Спектр нативных ядерных белков ржи отличается в высокомолекулярной области от цитоплазматических наличием значительного количества белка с мол. массой около 470 кДа, а также тем, что белок, который в цитоплазме имеет молекулярную массу 310 кДа, имеет несколько большую

молекулярную массу - 320 - 330 кДа (рис. 26). Вестерн-блоттинг ядерных нативных белков озимой ржи показал, что в ядрах имеются иммунохимически родственные БХШ 310 высокомолекулярные белки с мол. массами около 470 кДа, около 320 - 330 кДа, белок с мол. массой около 230 кДа и ряд относительно низкомолекулярных иммунохимически родственных ему белков с мол. массами около 140 кДа (рис. 27). При этом было обнаружено, что содержание белка с мол. массой около 320 - 330 кДа в ядерных белках по данным вестерн-блоттинга даже несколько превосходит содержание БХШ 310 в цитоплазме.

Поскольку низкомолекулярные иммунохимически родственные БХШ 310 белки были обнаружены при помощи вестерн-блоттинга среди нативных белков всех исследованных клеточных фракций, наше внимание привлекли белки с молекулярными массами 310 кДа, 320 - 330 кДа и особенно 470 кДа. В ходе проведения экспериментов было установлено, что при хранении выделенного из ядер белкового препарата в течение 12 часов при электрофорезе в спектре нативных белков практически исчезает линия с молекулярной массой около 470 кДа, но при этом усиливается линия белка с молекулярной массой около 320-330 кДа (рис. 28). Данный факт позволил предположить, что при этом происходит отщепление от макромолекулы неизвестного лиганда. Для проверки того, не является ли этот лиганд нуклеиновой кислотой, был проведен электрофорез нативных цитоплазматических, ядерных и митохондриальных белков озимой ржи с последующей окраской геля бромистым этидием, специфически окрашивающим нуклеиновые кислоты (Дрейпер, Скотт, 1991; Sharp et al., 1973). При окраске геля бромистым этидием было установлено, что цитоплазматический белок с мол. массой 310 кДа и ядерные белки с мол. массами 320 - 330 кДа и 470 кДа являются нуклеопротеинами. В то же время в митохондриальной фракции белок с мол. массой 310 кДа не окрашивался бромистым этидием, что свидетельствует о том, что он не

связан с нуклеиновой кислотой (рис. 29). Также не окрашивался бромистым этидием цитоплазматический белок с мол. массой около 470 кДа. Не окрашивались им и более низкомолекулярные, чем БХШ 310, иммунохимически родственные ему белки во всех клеточных фракциях (Kolesnichenko et al., 2000a).

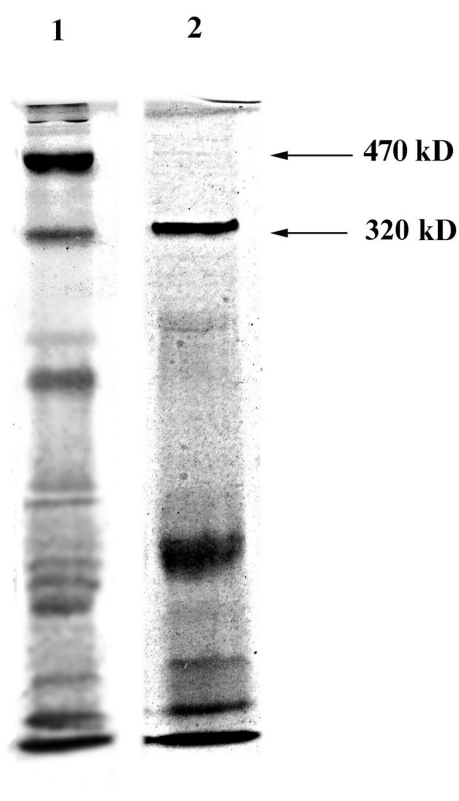


Рис. 28. Спектры нативных ядерных белков контрольных проростков озимой ржи.

- 1- свежевыделенный препарат ядер;
- 2- препарат после хранения в течение 12 часов при 0°C.

Тот факт, что цитоплазматический белок с молекулярной массой 310 кДа и ядерные белки с молекулярными массами 320 - 330 кДа и 470 кДа являются нуклеопротейнами представляет значительный интерес, поскольку, как отмечено выше, в последнее время при исследовании бактериальных белков холодового шока установлено, что многие из них являются ДНК- и РНК- связывающими белками с регуляторными функциями. В настоящее время все больше подтверждений находит точка зрения, что ДНК- и РНК-связывающие белки являются многофункциональными и участвуют как в транскрипционных, так и в посттранскрипционных событиях, регулируя экспрессию генов (Ladomery, 1997).

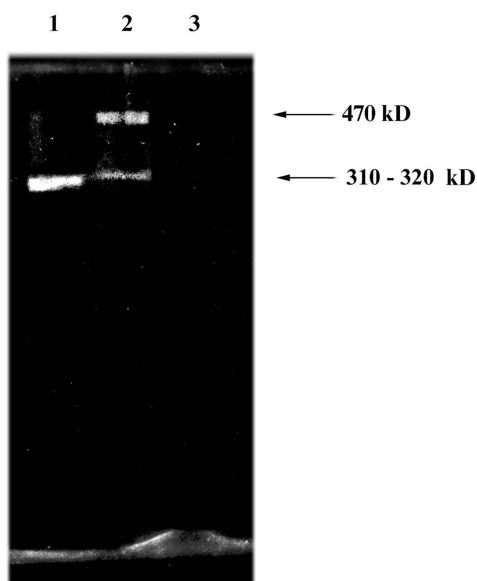


Рис. 29. Нативный электрофорез цитоплазматических (1), ядерных (2) и митохондриальных (3) белков контрольных проростков озимой ржи. Гель окрашен бромистым этидием.

С другой стороны, значительное число исследований, посвященных выяснению локализации дегидринов в клетке при помощи клеточного фракционирования и иммунолокализации, позволило установить, что дегидрины могут локализовываться и в ядре, и в цитоплазме. Более того, похоже на то, что этот класс белков ассоциируется с макромолекулами нуклеопротеинового комплекса в ядре. В настоящий момент наиболее распространена гипотеза, что дегидрины являются факторами, предотвращающими коагуляцию макромолекул, в том числе нуклеиновых кислот, сохраняя их структурное единство во время стрессового воздействия (Close, 1997). В связи с этим можно предположить, что в цитоплазме белок с мол. массой 310 кДа и в ядре белки с молекулярными массами около 320 - 330 кДа и 470 кДа могут выполнять либо регуляторную, либо защитную (шапероновую) функцию по отношению к нуклеиновым кислотам во время гипотермии.

Таким образом, установленный факт, что пулы белка с молекулярной массой 310 кДа в цитоплазме и ядре, с одной стороны, и в митохондриях, с другой стороны, различны по своим характеристикам, позволяет сделать несколько предположений. Во-первых, стрессовый белок с молекулярной

массой 310 кДа в цитоплазме и ядре, по-видимому, выполняет функции, отличные от тех, которые он выполняет в митохондриях. Во-вторых, стрессовый белок с молекулярной массой 310 кДа имеет сайты связывания нуклеиновых кислот. И, в-третьих, то, что митохондриальный белок с молекулярной массой 310 кДа, по-видимому, поступает в митохондриальный матрикс либо в виде субъединиц, либо в виде относительно низкомолекулярных композиций субъединиц. В то же время нельзя отрицать возможность ассоциации цитоплазматического БХШ 310 с внешней мембраной митохондрий.

8.3 Влияние холодового шока на содержание и характеристики белков семейства БХШ 310 в субклеточных фракциях проростков озимой ржи

В связи с отмеченными выше различиями в составе иммунохимически родственных БХШ 310 белков различных клеточных фракций, а также тем, что даже белки с одинаковой молекулярной массой в разных клеточных фракциях имеют разные характеристики, было чрезвычайно интересно установить, какие изменения в составе, характеристике и содержании иммунохимически родственных БХШ 310 белков происходят под действием холодового шока в проростках озимой ржи.

Прежде всего, холодовой шок (-4°C , 1 час) вызывает значительные изменения в спектрах нативных цитоплазматических, ядерных и митохондриальных белков озимой ржи, выявляемые даже при окраске геля Кумасси (рис. 30). В спектре цитоплазматических белков увеличивается содержание белков с молекулярными массами 310 и 470 кДа. В спектре ядерных белков значительно уменьшается содержание белка с молекулярной массой около 470 кДа, но в то же время увеличивается содержание белка с молекулярной массой 320 кДа. В спектре митохондриальных белков под действием холодового шока появляются белки с молекулярными массами 320 и 470 кДа.

Вестерн-блоттинг цитоплазматических, ядерных и митохондриальных белков озимой ржи показал, что под действием холодового шока происходят значительные изменения в составе и содержании иммунохимически родственных БХШ 310 белков (рис. 31). В цитоплазме происходит увеличение содержания высокомолекулярных белков с мол. массами 310 и 470 кДа, и в то же время значительно уменьшается содержание иммунохимически родственных БХШ 310 белков с мол. массами 230 и около 140 кДа. В ядерной фракции уменьшается содержание белка с мол. массой 470 кДа, но увеличивается содержание белка с мол. массой 320 кДа. В митохондриальной фракции вестерн-блоттинг выявил наиболее интересную картину - если при окраске Кумасси в митохондриальной фракции после холодового шока в зоне 300 - 400 кДа выявляются и белок с мол. массой 310 кДа и белок с мол. массой 320 кДа, то вестерн-блоттинг показывает, что из этих двух белков только белок с мол. массой 320 кДа является иммунохимически родственным цитоплазматическому БХШ 310 (рис. 31). В то же время холодовой шок вызывает появление в митохондриальных белках выявляемого при помощи вестерн-блоттинга иммунохимически родственного БХШ-310 белка с молекулярной массой 470 кДа (рис. 31), по данным вестерн-блоттинга отсутствующего в белках контрольных проростков озимой ржи (рис. 27). При этом, по данным вестерн-блоттинга с антителами на БХШ 310, содержание более низкомолекулярных, чем БХШ 310, иммунохимически родственных ему белков резко снижается (рис. 31). Можно предположить, что, кроме индукции синтеза субъединиц БХШ 310 (Колесниченко и др., 1997), под действием холодового шока происходит также ассоциация низкомолекулярных композиций субъединиц в более высокомолекулярные.

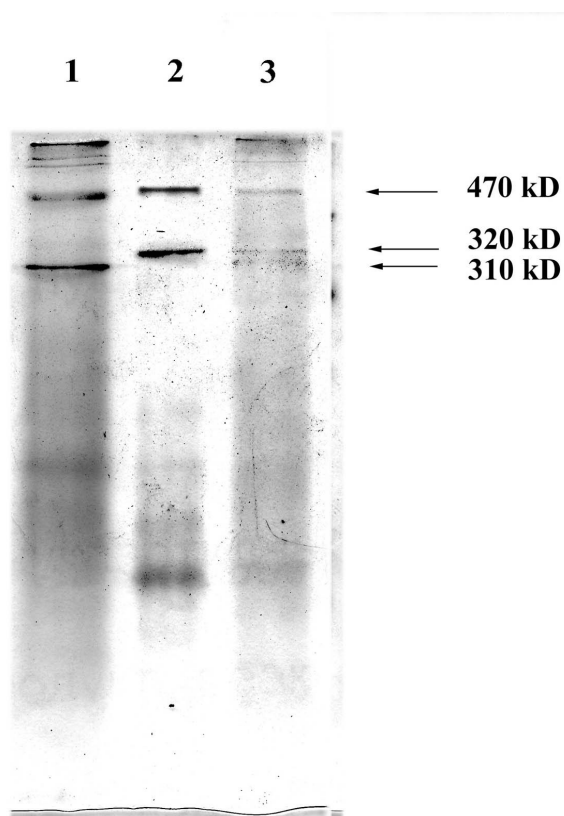


Рис. 30. Нативный электрофорез цитоплазматических (1), ядерных (2) и митохондриальных (3) белков стрессированных (-4°C , 1 час) проростков озимой ржи. Белки окрашены Кумасси-R-250.

Холодовой шок вызывает значительные изменения и в характеристиках иммунохимически родственных БХШ 310 белков. Ядерные белки с молекулярными массами 310 и 470 кДа, в нестрессированных («контрольных») проростках являющиеся нуклеопroteинами (рис. 29), под действием низкотемпературного стресса (-4°C , 1 час) высвобождают связанные с ними нуклеиновые кислоты и при окраске геля бромистым этидием не окрашиваются (рис. 32). Также высвобождает связанные с ним нуклеиновые кислоты цитоплазматический белок с молекулярной массой 310 кДа. В то же время цитоплазматический белок с молекулярной массой 470 кДа, который не окрашивается бромистым этидием у нестрессированных проростков озимой ржи (рис. 29), под действием холодого шока присоединяет нуклеиновые кислоты и окрашивается бромистым этидием (рис. 32). Митохондриальные иммунохимически родственные БХШ 310 белки не окрашиваются бромистым этидием ни у контрольных, ни у стрессированных проростков озимой ржи (рис. 29, рис. 32).

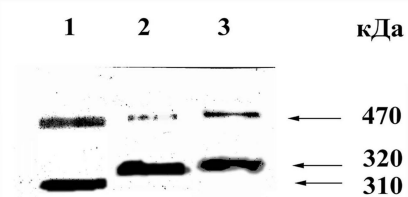


Рис. 31. Вестерн-блоттинг цитоплазматических (1), ядерных (2) и митохондриальных (3) белков стрессированных (-4°C , 1 час) проростков озимой ржи с антителами против БХШ 310.

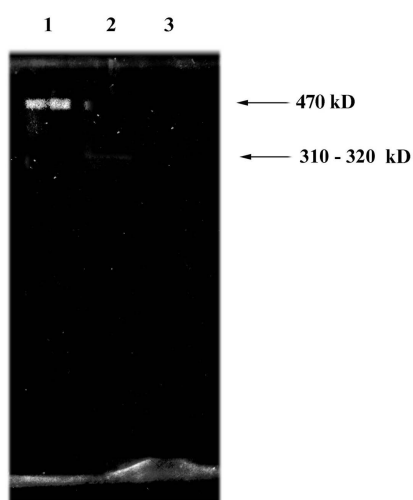


Рис. 32. Нативный электрофорез цитоплазматических (1), ядерных (2) и митохондриальных (3) белков стрессированных (-4°C , 1 час) проростков озимой ржи. Гель окрашен бромистым этидием.

По-видимому, можно предполагать, что комплексы иммунохимически родственных БХШ 310 белков и нуклеиновых кислот с молекулярными массами 320 и 470 кДа в ядре и 310 кДа в цитоплазме, имеющиеся в оптимальных температурных условиях в клетках озимой ржи, под действием холодового шока высвобождают эти связанные с ними нуклеиновые кислоты, что указывает на их регуляторные функции. В то же время то, что цитоплазматический белок с мол. массой 470 кДа, в нестрессированных растениях не являющийся нуклеопротеином, под действием холодового шока присоединяет нуклеиновые кислоты, указывает на возможную защитную функцию данного цитоплазматического белка в растении в условиях низкотемпературного стресса.

8.4 Изучение локализации полипептидов, иммунохимически родственных субъединицам стрессового белка 310 кДа, в субмитохондриальных фракциях озимой пшеницы

Как показано выше, в спектрах нативных белков озимой пшеницы имеются белки, иммунохимически родственные БХШ 310 озимой ржи. С помощью метода иммунодиффузии родственные БХШ 310 белки были обнаружены среди водорастворимых белков митохондрий озимой пшеницы и установлено, что данный белок обладает способностью разобщать окисление и фосфорилирование в митохондриях *in vitro* (Побежимова и др., 1996; Voinikov et al., 1998). С другой стороны, все известные к настоящему моменту UCP-подобные разобщающие белки принадлежат к семейству митохондриальных переносчиков анионов и являются белками внутренней мембраны митохондрий (Jezek et al., 1998). Это позволяет предположить, что в митохондриях злаков могут присутствовать субъединицы БХШ 310 или родственные им полипептиды. В связи с этим, следующим этапом исследований был поиск иммунохимически родственных БХШ 310 полипептидов в субмитохондриальных фракциях озимой пшеницы. Для определения локализации были использованы очищенные по модифицированной методике (Побежимова и др., 2001) в градиенте перколла митохондрии 3-х суточных побегов озимой пшеницы и полученные из них субмитохондриальные фракции.

8.4.1 Получение и определение чистоты мембранных фракций и матрикса митохондрий озимой пшеницы

Фракции митохондриальных мембран и матрикса были получены из очищенных с помощью перколла и неоднократно промытых митохондрий, изолированных из этиолированных побегов озимой пшеницы. Отделение внешней мембраны осуществляли по методу «сжатие-набухание-сжатие» (Guillot-Salomon et al., 1997). Для этого митохондрии помещали в гипертоническую среду. Затем суспензию «сжатых»

митохондрий быстро вводили в слабо гипотоническую среду, содержащую калий-фосфатный буфер и ЭДТА. Обработка митохондрий фосфатом и ЭДТА приводила к набуханию органелл и разрыву наружной мембраны. Последующее добавление к суспензии набухших митохондрий гипертонической среды вызывало сжатие митопластов (матрикса, ограниченного внутренней мембраной) и позволяло отделить наружную мембрану. Фракции внутренней мембраны и матрикса митохондрий были получены из митопластов, обработанных ультразвуком, при помощи центрифугирования и ультрацентрифугирования (Азарашвили и др., 1997). Чистота полученных субмитохондриальных фракций определялась по активности маркерных ферментов (Moore, Proudlove, 1983) (табл. 8).

Таблица 8

Активность маркерных ферментов в субмитохондриальных фракциях озимой пшеницы. $M \pm m$, $n=6$.

Ферменты- маркеры	Активность ферментов во фракциях митохондрий, нмоль в мин на мг белка		
	Внешняя мембрана	Внутренняя мембрана	Матрикс
Ант.-чувствительная НАДН:цитохром <i>c</i> оксидоредуктаза	не определяли	76 ± 8.33	0
Ант.-нечувствительная НАДН:цитохром <i>c</i> оксидоредуктаза	63 ± 5.1	0	не определяли
Малатдегидрогеназа	не определяли	740 ± 60	3614 ± 113
Фумараза	не определяли	0	910 ± 67

Примечание. Сокращения: Ант.- антимицин А.

Сравнение между активностями антимицин-чувствительной НАДН: цитохром *c* оксидоредуктазы (маркера для внутренней мембраны) и антимицин-нечувствительной НАДН: цитохром *c* оксидоредуктазы (маркер для внешней

мембраны) позволило заключить, что полученные фракции внешней и внутренней мембран митохондрий не имели взаимных загрязнений. В то же время во фракции внутренней мембраны отсутствовала активность фумаразы (маркер для матрикса), что свидетельствует о том, что она не была загрязнена матриксом (табл. 8). Что касается матрикса, то эта фракция не содержала компонентов внутренней мембраны. Об этом свидетельствует отсутствие в матриксе митохондрий активности антимицин-чувствительной НАДН:цитохром с оксидоредуктазы (табл. 8).

8.4.2 Локализация полипептидов, иммунохимически родственных БХШ 310, в субмитохондриальных фракциях озимой пшеницы

При определении локализации белков, иммунохимически родственных субъединицам стрессового белка 310 кДа (БХШ 310), использовали митохондрии побегов озимой пшеницы и полученные из них фракции субмитохондриальных компонентов. Поиск данных белков в митохондриях проводили при помощи ДДС-Na-электрофореза с последующим вестерн - блоттингом с антителами против БХШ 310 из озимой ржи. Результаты экспериментов свидетельствуют, что в неразрушенных органеллах имеется ряд полипептидов, иммунохимически родственных субъединицам БХШ 310. Это полипептиды с мол. массой 60, 55 и 23 кДа (рис. 33). Эти полипептиды, как показали эксперименты с обработкой митохондрий проназой Е, находятся внутри митохондрий (рис. 33) (Побежимова и др., 2001; Kolesnichenko et al., 2000b).

Таким образом, в митохондриях озимой пшеницы среди белков, прочно связанных с органеллами, имеются полипептиды с мол. массой 60, 55 и 23 кДа, иммунохимически родственные субъединицам БХШ 310 озимой ржи.

Рассмотренные выше результаты свидетельствуют, что в митохондриях озимой пшеницы имеются полипептиды, иммунохимически родственные субъединицам БХШ 310

озимой ржи. Причем, как оказалось, они прочно связаны с органеллами. В связи с этим можно предположить, что среди этих белков есть такие, которые локализованы в митохондриальных мембранах. Поэтому в дальнейших исследованиях был проведен сравнительный анализ содержания белков, иммунохимически родственных БХШ 310, в различных фракциях митохондрий: во внутренней и внешней мембранах и матриксе (Побежимова и др., 2001; Kolesnichenko et al., 2000b).

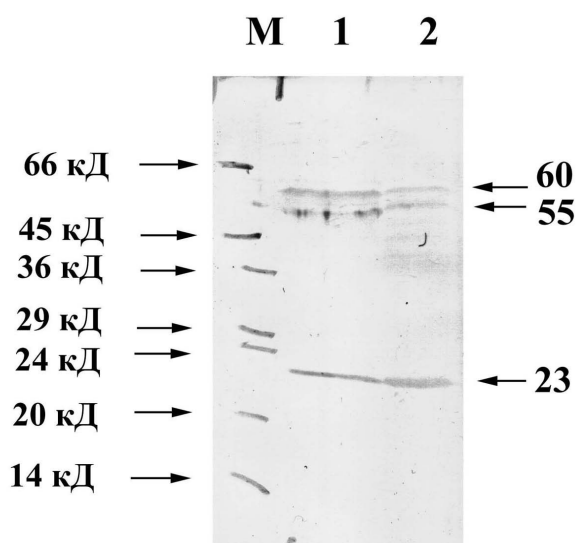


Рис. 33. Вестерн-блоттинг элюированных ДДС-На белков митохондрий озимой пшеницы с антителами против БХШ 310 озимой ржи до (1) и после (2) обработки проназой Е. Слева приведены мол. массы маркеров.

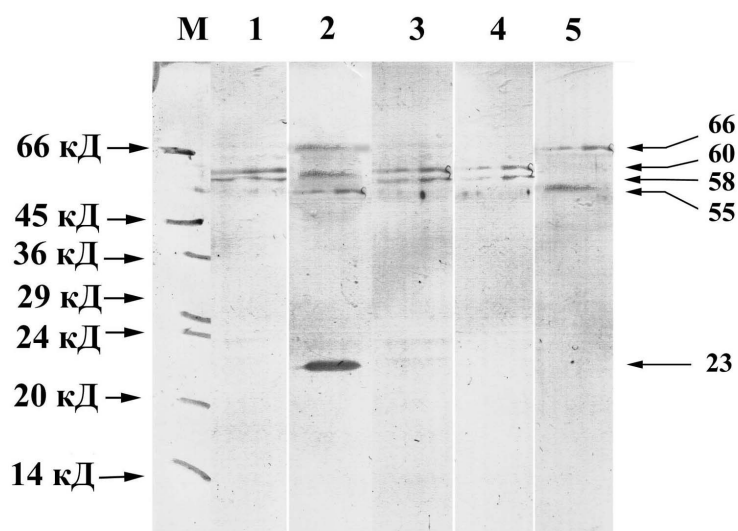


Рис. 34. Вестерн-блоттинг элюированных ДДС-На белков мембранных фракций митохондрий озимой пшеницы с антителами против БХШ 310 озимой ржи.
1- внешняя мембрана;
2- внутренняя мембрана;
3- внутренняя мембрана, обработанная 1М KCl;
4- внутренняя мембрана, обработанная 1% Тритоном X-100;
5- матрикс.
Слева приведены мол. массы маркеров.

Иммуноблоттинг элюированных ДДС-На полипептидов мембранных фракций митохондрий озимой пшеницы с антителами против БХШ 310 озимой ржи показал, что в наружной мембране локализованы белки с мол. массами 60 и 58 кДа, иммунохимически родственные субъединицам БХШ 310 (рис. 34). Во внутренней мембране митохондрий обнаружены полипептиды с мол. массами 66, 60, 55 и 23 кДа (рис. 34). Следует отметить, что белки 60, 55 и 23 кДа по массе соответствуют полипептидам, выявляемым в неразрушенных митохондриях, обработанных проназой Е. При этом полипептид с мол. массой 60 кДа 1М KCl из внутренней мембраны не экстрагировался и был замечен в спектре и после обработки 1% Тритоном X-100 (рис. 34), что свидетельствует о его прочной связи с внутренней мембраной митохондрий. Следует обратить внимание на появление в спектре после обработки 1М KCl полипептида с мол. массой 58 кДа, который не был замечен во фракции необработанных мембран (рис. 34). Можно предположить, этот белок представлен во фракции внутренних мембран в незначительном количестве и выявить его можно только после обогащения им белковой фракции вследствие снятия с мембраны ряда непрочно связанных белков. Что касается белка с мол. массой 23 кДа, то этот белок с мембраной связан непрочно, по-видимому, электростатически (рис. 34). В матриксе митохондрий в незначительном количестве обнаружены полипептиды 66 и 55 кДа (рис. 34). Полученные результаты свидетельствуют, что значительное число полипептидов, иммунохимически родственных субъединицам БХШ 310 озимой ржи, локализовано в митохондриях озимой пшеницы в основном во внутренней мембране.

На основании полученных выше результатов можно заключить, что полипептиды, иммунохимически родственные БХШ 310, представлены в митохондриях озимой пшеницы следующим набором: 66, 60, 58, 55 и 23 кДа. При этом в наружной мембране митохондрий содержатся полипептиды 60 и 58 кДа, во внутренней мембране митохондрий - 66, 60,

55 и 23 кДа. В матриксе митохондрий присутствуют в следовых количествах белки 66 и 55 кДа.

Таким образом, данные, полученные при изучении локализации иммунохимически родственных БХШ 310 полипептидов в субмитохондриальных фракциях вступают в противоречие с данными, полученными при определении нативных митохондриальных белков. При анализе субмитохондриальных фракций (рис. 33, 34) не обнаружено значительных количеств субъединиц БХШ 310, присутствующего в спектрах нативных белков митохондрий (рис. 25). Можно предположить, что этот факт связан с элиминацией данных полипептидов в процессе очистки и неоднократного переосаждения митохондрий. Однако, в этом случае БХШ 310 должен быть не интегральным белком мембраны, а белком, непрочно связанным с наружной мембраной митохондрий, который может диссоциировать в процессе очистки и неоднократного промывания митохондрий.

9 СРАВНЕНИЕ БХШ 310 С ДРУГИМИ ИЗВЕСТНЫМИ СТРЕССОВЫМИ РАСТИТЕЛЬНЫМИ БЕЛКАМИ: С МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ РАЗОБЩАЮЩИМ БЕЛКОМ PUMP И С ДЕГИДРИНАМИ

Электрофорез очищенного при помощи колоночной хроматографии стрессового белка БХШ 310 показал, что он состоит из двух типов субъединиц с молекулярными массами 56 и 66 кДа. В то же время изучение митохондриальных белков при помощи вестерн-блоттинга с антисывороткой против БХШ 310 выявило во внутренней мембране митохондрий лишь иммунохимически родственные субъединицам БХШ 310 белки. Поскольку было установлено, что в растениях имеются такие UCP-подобные разобщающие белки, как PUMP, а молекулярная масса большей субъединицы БХШ 310 близка к молекулярной массе димера PUMP (64 кДа), была предпринята попытка при помощи вестерн-блоттинга установить, не является ли БХШ 310 либо одна из его

субъединиц гомологом PUMP или иммунохимически родственным ему белком.

Анализ белка БХШ 310 при помощи антисыворотки против митохондриального разобщающего белка PUMP, любезно предоставленной сотрудниками лаборатории профессора А. Vercesi (Campinas, Бразилия), показал, что ни одна из субъединиц БХШ 310 не реагировала с антителами против PUMP (рис. 35 А). В связи с этим можно сделать вывод, что субъединицы БХШ 310 не родственны этому митохондриальному разобщающему белку.

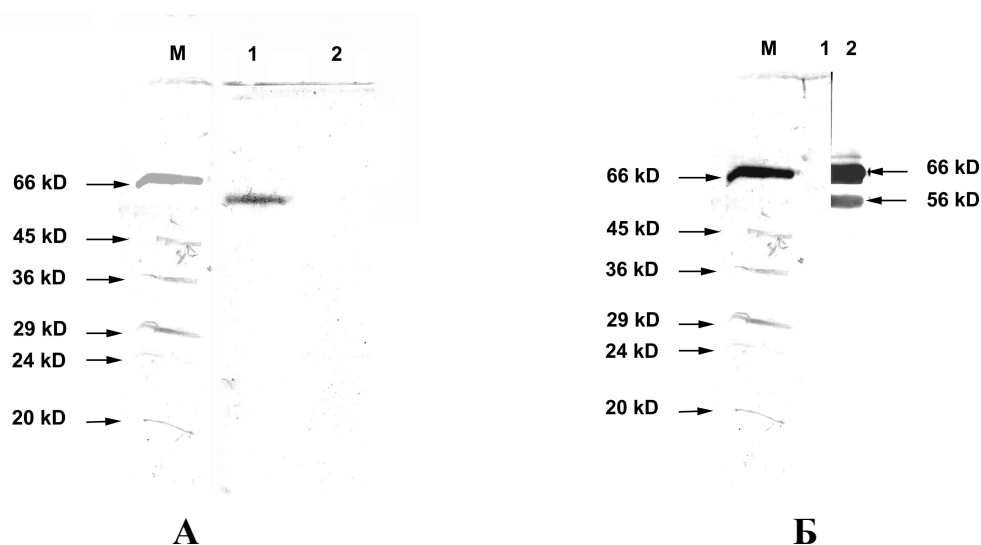


Рис. 35. (А) Вестерн-блоттинг общего митохондриального белка (1) и субъединиц очищенного БХШ 310 (2) с антителами против митохондриального разобщающего белка PUMP; (Б) Вестерн-блоттинг субъединиц очищенного БХШ 310 с антителами против К-сегмента дегидринов (1) и антисывороткой против БХШ 310 (2). М – белки-метчики.

Поскольку БХШ 310 не оказался иммунохимически родственным известным митохондриальным разобщающим растительным белкам, С. Downs (Чарльстон, США) предпринял попытку определения N'-концевой последовательности аминокислот субъединицы БХШ 310 с молекулярной массой 56 кДа. В результате ее была получена следующая N'-концевая последовательность аминокислот – MNTGGAHNSDE в однобуквенном коде. Полученный в результате частичного

сиквенса белка фрагмент полностью совпадал с N'-концом дегидрина с мол. массой 35 кДа, выделенного из *Vigna unguiculata* L. Walp A. Ismail, A. Hall и T. Close (Ismail et al., 1999). В связи с этим была предпринята попытка определить, не является ли субъединица БХШ 310 с молекулярной массой 56 кДа дегидрином или дегидриноподобным белком.

Анализ белка БХШ 310 при помощи антисыворотки против К-сегмента дегидринов, любезно предоставленной доктором Т. Close (Лос-Анжелес, США), показал, что ни одна из субъединиц БХШ 310 не реагировала с антителами против К-сегмента дегидринов (рис. 35Б). В связи с этим можно сделать вывод, что у субъединиц БХШ 310 отсутствует данный сегмент, и субъединица 56 кДа, хотя и имеет N'-конец, совпадающий с N'-концом дегидрина из *Vigna unguiculata* L. Walp, не принадлежит к дегидринам.

10 МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БХШ 310

Известно, что некоторые стрессовые белки оказывают протекторное действие, ассоциируя с митохондриями во время теплового стресса (Войников и др., 1988; Chou et al., 1989). Быстрое разобщающее действие БХШ 310, а также известные случаи ассоциации белков с митохондриями и приведенные выше данные о наличии БХШ 310 в цитоплазме и митохондриях холодостойких злаков позволили предположить, что во время холодового шока происходит ассоциация БХШ 310 с митохондриями. В то же время данные о различии характеристик цитоплазматического БХШ 310 в нестрессированных и стрессированных проростках позволили предполагать различное влияние этих двух форм стрессового белка БХШ 310 на энергетические функции митохондрий. Для выяснения этого вопроса были поставлены эксперименты по изучению ассоциации экзогенного БХШ 310 с митохондриями во время моделирования низкотемпературного стресса и по изучению влияния БХШ 310, выделенного из стрессированных

и нестрессированных растений на энергетические функции изолированных митохондрий.

10.1 Ассоциация БХШ 310 с митохондриями озимой пшеницы при инкубации in vitro

Поскольку ранее было показано, что инкубация интактных изолированных митохондрий озимой пшеницы в течение 30 мин при 0°C с белком холодового шока БХШ 310 в концентрации 0.5 мг БХШ 310 на 1 мг митохондриального белка вызывает значительное увеличение скорости дыхания митохондрий в состоянии 4 (Voinikov et al., 1998), то при изучении ассоциации БХШ 310 с изолированными митохондриями пшеницы было применено такое же соотношение БХШ 310 и митохондриального белка и такая же временная экспозиция. Электрофорез с ДДС-Na с последующим вестерн-блоттингом с поликлональными антителами против БХШ 310 показал, что свежевыделенные из нестрессированных («контрольных») проростков озимой пшеницы очищенные митохондрии содержали только незначительное количество субъединиц БХШ 310 (рис. 36). Электрофорез нативных митохондриальных белков с последующим вестерн-блоттингом показал, что, как и было показано ранее (Kolesnichenko et al., 1999), в митохондриях присутствовал собственно БХШ 310, более низкомолекулярные комбинации его субъединиц и субъединицы этого стрессового белка (рис. 37).

Инкубация этих митохондрий при 0°C в течение 30 мин вызывала лишь незначительное снижение содержания субъединиц БХШ 310, выявляемых электрофорезом с ДДС-Na (рис. 36), но электрофорез нативных белков показал, что при этом БХШ 310 диссоциирует до своих субъединиц (рис. 37). В то же время инкубация этих митохондрий при 0°C в течение 30 мин со стрессовым белком БХШ 310 вызвала сильную ассоциацию этого стрессового белка с митохондриями (рис. 36; рис. 37). Для выяснения вопроса, прочно ли связывается этот белок с митохондриями, или он легко диссоциирует после

окончания холодового воздействия, была проведена инкубация в течение 3 часов митохондрий с ассоциированным с ними БХШ 310 как в присутствии, так и в отсутствии проназы Е в среде инкубации митохондрий. Эксперимент с обработкой митохондрий проназой Е (0.3 мг/мл, 3 ч при 37°C) показал, что эта обработка устраняет субъединицы БХШ 310 из спектра митохондриальных белков (рис. 36) (Kolesnichenko et al., 2000c). Более того, даже простая инкубация этих митохондрий в среде инкубации в течение 3 часов вызвала уменьшение содержания субъединиц БХШ 310 до уровня, характерного для контрольных проростков (рис. 36). Таким образом, на основании этих данных можно предположить, что этот стрессовый белок либо не транспортируется внутрь митохондрий, а локализуется снаружи митохондрий.

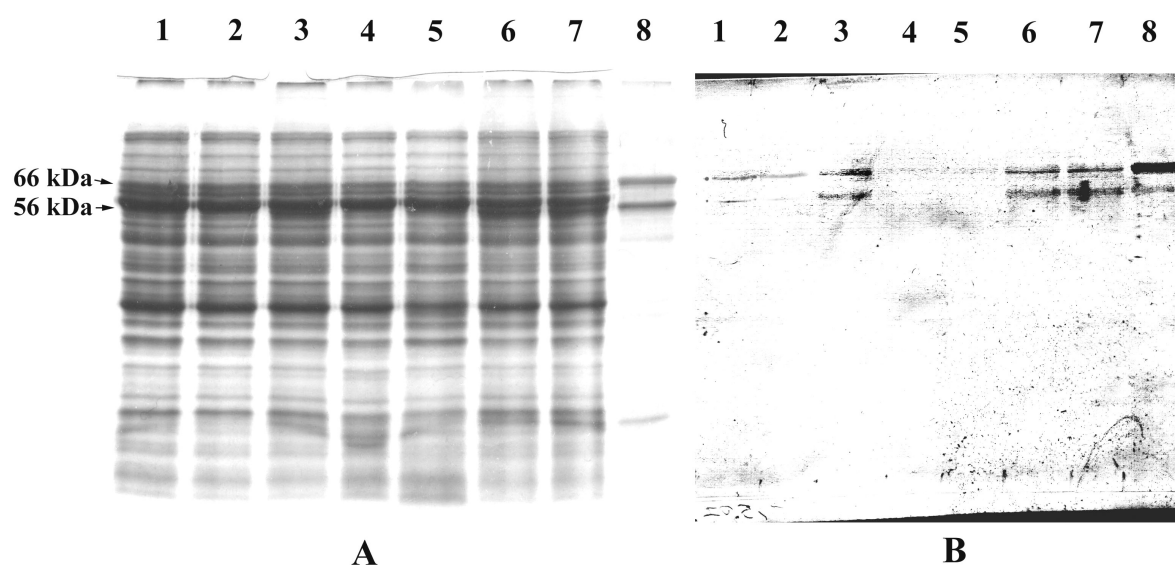


Рис. 36. ДДС-Na-электрофорез митохондриальных белков озимой пшеницы (А) с последующим вестерн-блоттингом с поликлональными антителами против БХШ 310 (В). Митохондрии: контрольные (1); инкубировавшиеся 30 мин при 0°C (2); инкубировавшиеся 30 мин при 0°C с БХШ 310 (3); инкубировавшиеся 3 ч в среде инкубации после инкубации с БХШ 310 (4); инкубировавшиеся 3 ч с проназой Е после инкубации с БХШ 310 (5); инактивированные СССР и инкубировавшиеся 30 мин при 0°C с БХШ 310 (6); инактивированные KCN и инкубировавшиеся 30 мин при 0°C с БХШ 310 (7); БХШ 310 (8).

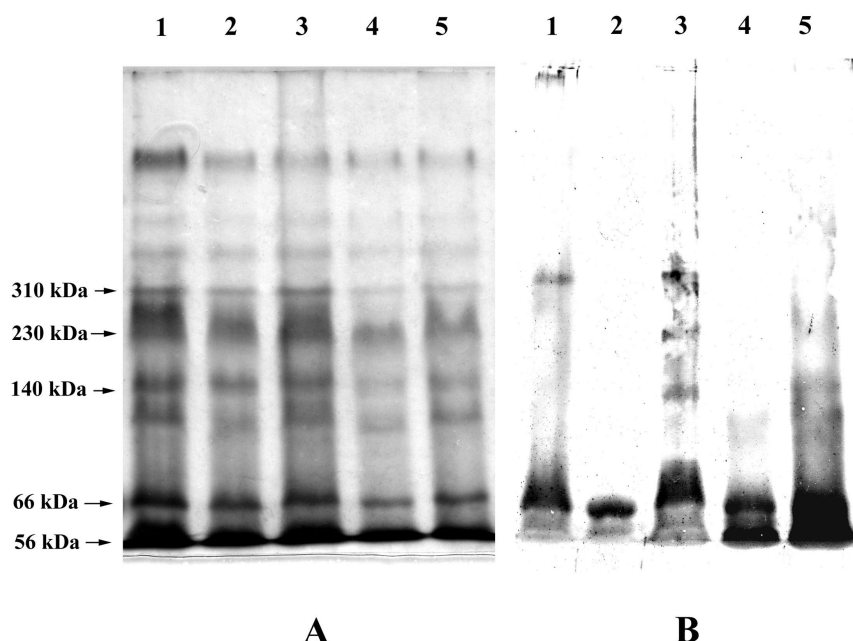


Рис. 37. Электрофорез нативных митохондриальных белков озимой пшеницы (А) с последующим вестерн-блоттингом с поликлональными антителами против БХШ 310 (В). Контрольные митохондрии (1); митохондрии, инкубировавшиеся без добавок (2); инкубировавшиеся с БХШ 310 (3); инактивированные СССР, инкубировавшиеся с БХШ 310 (4); инактивированные KCN, инкубировавшиеся с БХШ 310 (5).

Известно, что градиент электрического потенциала $\Delta\psi$ и зависимое от АТФ функционирование митохондриального комплекса БТШ 70 являются двумя основными энергетическими источниками импорта белков из цитоплазмы в митохондрии (Pfanner et al., 1997). Импорт в митохондрии таких известных разобщающих белков, как UCP и АДФ/АТФ переносчик также зависит от $\Delta\psi$ (Pfanner et al., 1997). Таким образом, можно ожидать, что инактивация митохондрий таким чрезвычайно эффективным разобщителем, как СССР или KCN, который полностью ингибирует дыхание, будет полностью инактивировать механизм транспорта белков в митохондрии и ингибировать ассоциацию БХШ 310 с митохондриями в том случае, если он транспортируется в митохондрии. Электрофорез с ДДС-Na с последующим вестерн-блоттингом показал, что инактивация митохондрий озимой пшеницы СССР (1.5 μ M) и KCN (1.5 мМ) не ингибирует

ассоциацию БХШ 310 с митохондриями (рис. 36). С другой стороны, электрофорез нативных белков с последующим вестерн-блоттингом показал, что между ассоциацией БХШ 310 с интактными и инактивированными митохондриями существует определенная разница. Если с интактными митохондриями ассоциируют и нативная форма БХШ 310, и довольно высокомолекулярные композиции его субъединиц (рис. 37), то с инактивированными митохондриями ассоциировали только субъединицы БХШ 310 (рис. 37). В то же время и между ассоциацией БХШ 310 с инактивированными СССР и KCN митохондриями была отмечена определенная разница. Если с инактивированными СССР митохондриями ассоциировали только субъединицы БХШ 310 с молекулярными массами 66 и 56 кДа (рис. 37), то с митохондриями, инактивированными обработкой KCN, ассоциировали также гомо- и гетеродимеры его субъединиц (рис. 37).

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что механизм ассоциации БХШ 310 с митохондриями не зависит от $\Delta\psi$. По-видимому, цитоплазматический БХШ 310 ассоциирует с митохондриями с наружной стороны, возможно вступая при этом во взаимодействие и образуя комплекс с иммунохимически родственными ему полипептидами наружной мембраны митохондрий. Эти данные позволяют также предположить, что механизм разобщающего действия БХШ 310 должен отличаться от механизма действия остальных известных разобщающих белков.

10.2 Сравнение влияния конститутивно синтезируемой и стрессовой формы БХШ 310 на митохондрии in vitro

Как показали результаты исследований, во время низкотемпературного стресса от макромолекулы стрессового белка БХШ 310 отщепляется лиганд – связанная с ним нуклеиновая кислота. Вследствие этого можно предположить, что данное конформационное изменение способно вызвать

изменение разобшающей активности БХШ 310. С целью выяснения этого было проведено изучение разобшающей активности белка БХШ 310, выделенного из «контрольных» проростков и проростков, подвергнутых холодовому шоку (-1°C , 1 час). Изучение разобшающей активности БХШ 310 проводилось на изолированных митохондриях побегов проростков озимой пшеницы сорта «Заларинка» (Pobezhimova et al., 2001).

Таблица 9

Влияние конститутивно синтезируемой и стрессовой формы БХШ 310 на дыхательную активность митохондрий озимой пшеницы во время инкубации в течение 90 мин при 0°C . Субстрат окисления: малат (10 мМ) + глутамат (10 мМ). $M \pm m$, $n=6$

Инкубация, мин	Поглощение кислорода, нмоль O ₂ /мин/мг белка		Дыхательный контроль	Отношение АДФ:О
	Состояние 3	Состояние 4		
Без добавления белка (контроль)				
5	61.7±3.6	22.3±1.4	2.78±0.16	2.82±0.07
30	60.9±3.1	22.2±1.9	2.73±0.20	2.74±0.09
60	58.2±4.9	22.2±1.3	2.63±0.25	2.68±0.16
90	57.8±3.4	21.6±1.0	2.65±0.26	2.60±0.15
С добавлением конститутивно синтезируемой формы БХШ 310				
5	61.7±4.9	25.0±0.2	2.48±0.23	2.72±0.01
30	59.0±1.7	26.0±0.2	2.27±0.06	2.57±0.01
60	60.6±4.3	30.9±1.7	1.96±0.16	2.39±0.01
90	59.6±3.9	31.3±2.3	1.91±0.08	2.21±0.02
С добавлением стрессовой формы БХШ 310				
5	64.1±3.2	31.4±1.5	2.06±0.12	2.37±0.10
30	61.0±2.9	33.7±1.1	1.82±0.06	2.29±0.01
60	59.6±2.7	34.0±1.8	1.73±0.06	2.14±0.09
90	59.4±3.1	34.0±1.8	1.74±0.08	2.04±0.10

Результаты экспериментов показывают, что митохондрии, выделенные из побегов проростков озимой пшеницы и использованные в данных экспериментах, были энергетически активными и имели хорошую степень сопряжения окисления и фосфорилирования (табл. 9). Инкубация этих митохондрий при 0°C в течение 90 мин не вызывала существенных изменений в их энергетической активности. Величины скоростей фосфорилирующего (состояние 3) и нефосфорилирующего (состояние 4) дыхания, дыхательного контроля и отношения АДФ:О во время гипотермии *in vitro* практически не изменялись (табл. 9, рис. 38). Добавление во время инкубации к митохондриям конститутивно синтезируемой формы БХШ 310 изменило их функционирование. Присутствие в среде инкубации конститутивно синтезируемой формы БХШ 310 вызвало некоторое увеличение дыхания в состоянии 4 и уменьшение дыхательного контроля в первые 5 мин инкубации (табл. 9) и последующее их изменение таким образом, что через 90 мин инкубации скорость дыхания в состоянии 4 увеличилась до 31.3 ± 2.3 нмоль O_2 /мин/мг белка (45%-ное увеличение по сравнению с контрольными митохондриями). Заметно уменьшились также величины дыхательного контроля и отношения АДФ:О. Эти изменения свидетельствуют о разобщении изолированных митохондрий к 90 мин инкубации с конститутивно синтезируемой формой БХШ 310 при гипотермии *in vitro*.

Как показано выше, БХШ 310, выделенный из побегов озимой ржи, выращенных при 26°C, является белком, связанным с лигандом – нуклеиновой кислотой. При гипотермии этот белок изменяет свои характеристики, при этом лиганд отщепляется. В связи с этим был проведен анализ энергетической активности митохондрий, инкубировавшихся при 0°C в течение 90 мин в присутствии стрессовой формы БХШ 310. В результате экспериментов установлено, что стрессовая форма БХШ 310 обладает по сравнению с

конститутивно синтезируемой формой БХШ 310 значительно более сильным эффектом разобщения окислительного фосфорилирования в митохондриях (рис. 38).

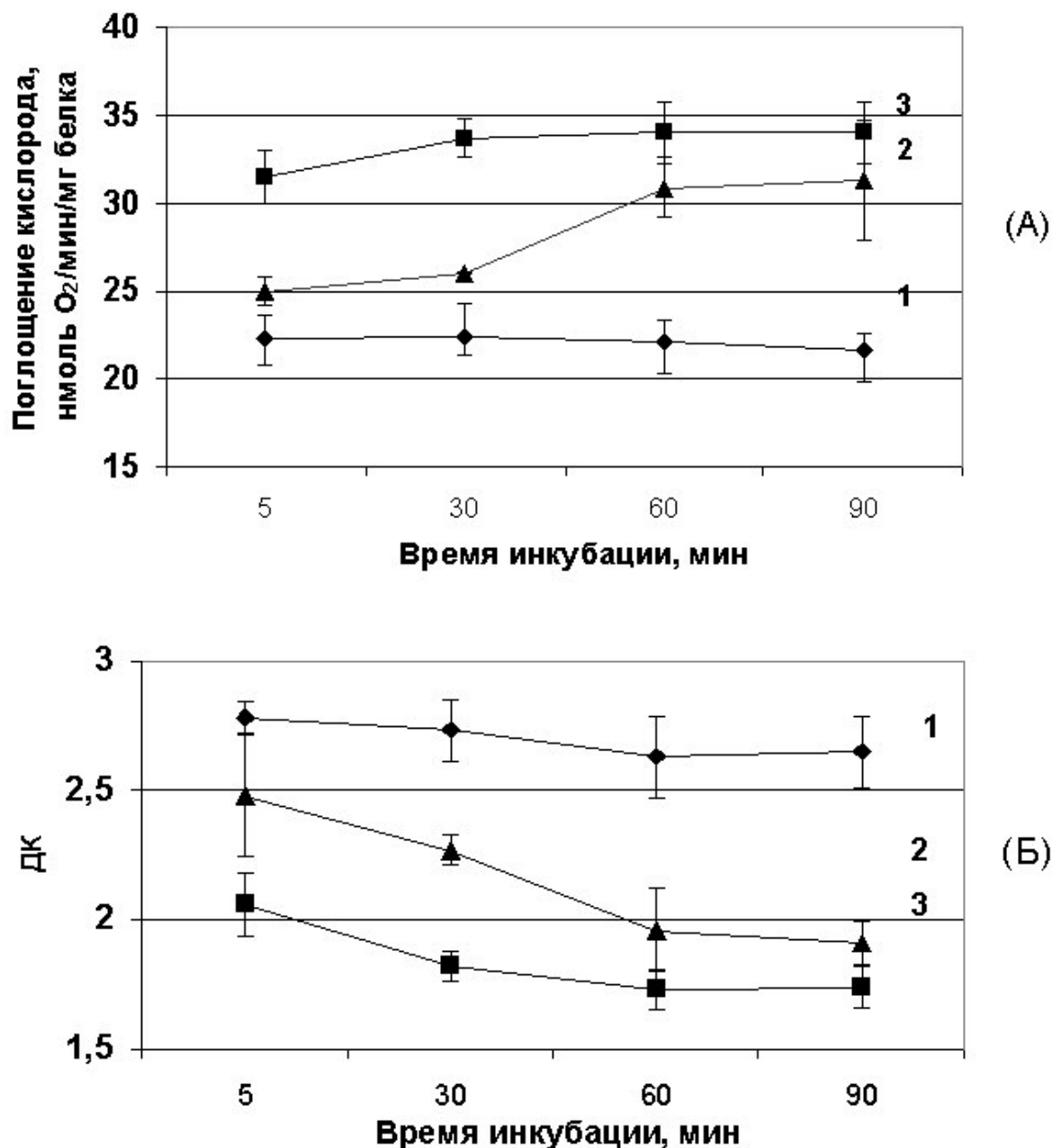


Рис. 38. Изменение скорости дыхания в состоянии 4 (А) и коэффициента дыхательного контроля (Б) митохондрий озимой пшеницы во время инкубации при 0⁰С в присутствии конститутивно синтезируемой и стрессовой формы БХШ 310. Варианты: 1- контроль (инкубация митохондрий без БХШ 310); 2- инкубация митохондрий с конститутивно синтезируемой формой БХШ 310; 3- инкубация митохондрий со стрессовой формой БХШ 310. Субстрат окисления: малат (10 мМ) + глутамат (10 мМ). M±m, n=6.

Наиболее высокий темп увеличения скорости в состоянии 4 и уменьшения дыхательного контроля и отношения АДФ:О у митохондрий был в первые 5 мин инкубации со стрессовой формой БХШ 310 (41% увеличения V_4) (табл. 9). Дальнейшая инкубация на увеличение скорости нефосфорилирующего дыхания влияла более слабо (рост V_4 до 58% через 90 мин инкубации) (табл. 9; рис. 38). Следует отметить, что стрессовая форма БХШ 310, так же как и конститутивно синтезируемая форма БХШ 310, стимулирующего влияния на скорость дыхания в состоянии 3 не оказывала. Наоборот, через 90 мин инкубации скорость дыхания в состоянии 3 митохондрий обоих вариантов несколько уменьшилась, но темп ее уменьшения был таким же, как и у контрольных митохондрий без добавления белка (табл. 9). Полученные данные позволяют сделать вывод, что среди двух форм БХШ 310 стрессовая форма БХШ 310 имеет более выраженный эффект разобщения окислительного фосфорилирования у митохондрий при гипотермии *in vitro* (Pobezhimova et al., 2001; Kolesnichenko et al., 2001g).

Поскольку проведенные эксперименты свидетельствуют, что стрессовая форма БХШ 310 обладает наиболее выраженным разобщающим действием, то во всех дальнейших экспериментах по изучению разобщающего действия БХШ 310 использовали белок, полученный из стрессированных растений.

11 ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВОГО БЕЛКА БХШ 310 НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ

Поскольку в ходе предварительных исследований было установлено, что инкубация изолированных митохондрий с БХШ 310 вызывает в них разобщение окисления и фосфорилирования, необходимо было установить, во-первых, наблюдается ли зависимость степени разобщения митохондрий от концентрации БХШ 310 в среде инкубации и, во-вторых, установить, является ли действие БХШ 310 видоспецифичным, или он способен вызывать разобщение

окисления и фосфорилирования в изолированных митохондриях любых видов растений.

Принимая во внимание этот факт, было проведено изучение зависимости нефосфорилирующего дыхания от концентрации стрессовой формы БХШ 310 в среде инкубации митохондрий. В этих экспериментах эффективность взаимодействия БХШ 310 с митохондриями характеризовали по скорости нефосфорилирующего дыхания и по отношению АДФ:О. Зависимость этих параметров от относительной концентрации БХШ 310 оценивали через 5 и 60 мин инкубации митохондрий с БХШ 310 при 0°C. Как показано на рис. 39, скорость дыхания в состоянии 4 у митохондрий, инкубируемых при 0 °C как в течение 5, так и в течение 60 мин, увеличивалась с увеличением концентрации добавленного белка. Так, при увеличении концентрации белка от 90 до 250 мкг на 1 мг митохондриального белка через 5 мин инкубации она увеличилась с 24.55 ± 1.63 до 31.0 ± 1.70 нмоль O_2 /мин/мг белка (рис. 39). Дальнейшее увеличение концентрации от 250 до 750 мкг/мг белка к значительному увеличению скорости дыхания в состоянии 4 не приводило. Разница в изменении скорости дыхания в состоянии 4 между этими вариантами опыта составляла всего 2.6 нмоль O_2 /мин/мг белка. В то же время при 60 мин инкубации митохондрий скорость дыхания в состоянии 4 увеличивалась почти пропорционально увеличению концентрации добавленного к ним белка (рис. 39). При этом концентрационно - зависимое увеличение скорости нефосфорилирующего дыхания носило монотонный характер. Отношение АДФ:О при этом уменьшалось пропорционально увеличению концентрации добавленной стрессовой формы БХШ 310 (рис. 40). Уменьшение величины АДФ:О наблюдали как после 5 мин, так и после 60 мин инкубации митохондрий со стрессовым белком. Такое концентрационно - зависимое уменьшение отношения АДФ:О у митохондрий указывает на уменьшение эффективности окислительного

фосфорилирования с увеличением концентрации стрессовой формы БХШ 310. Следует отметить, что скорость дыхания митохондрий в состоянии 3 оставалась неизменной на протяжении всего времени инкубации в этих условиях. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод, что разобщение митохондрий, вызванное добавлением стрессовой формы БХШ 310 при гипотермии *in vitro* зависит от его концентрации.

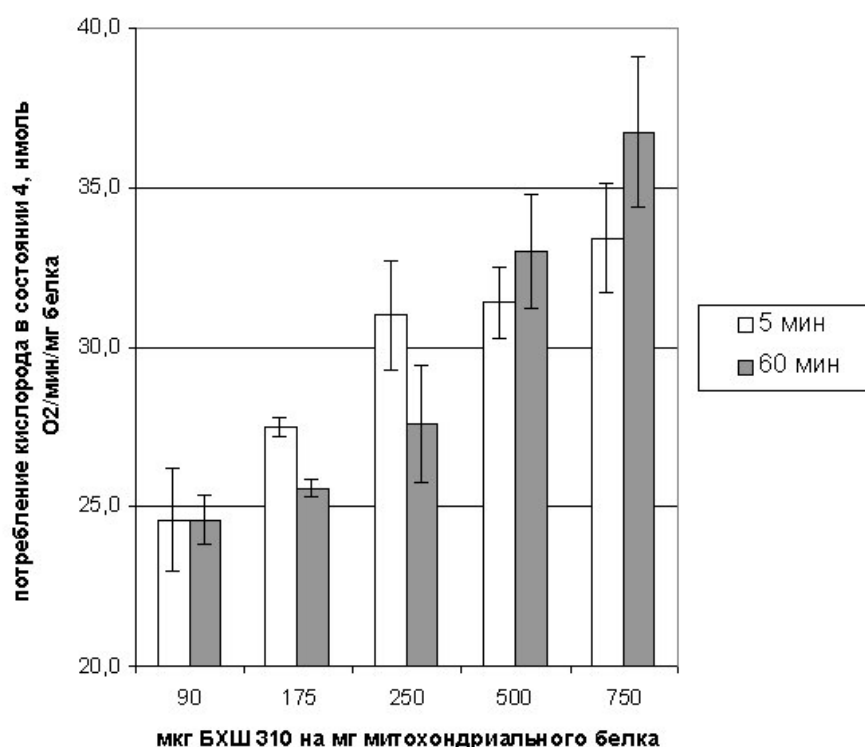


Рис. 39. Влияние различных концентраций БХШ 310 на потребление кислорода в состоянии 4 во время инкубации митохондрий озимой пшеницы в течение 5 и 60 мин при 0°C. Субстрат окисления: малат (10 мМ) в присутствии глутамата (10 мМ). $M \pm m$, $n=6$

Ранее показано (Kolesnichenko et al., 2000a), что при хранении препаратов изолированных клеточных органелл нативные белки, иммунохимически родственные БХШ 310 и состоящие из одних и тех же субъединиц, нестабильны и переходят из одной формы в другую. Учитывая этот факт, а также то, что процедура выделения стрессового разобщающего белка БХШ 310 весьма продолжительна, можно предположить, что при выделении и хранении препаратов конститутивно синтезируемой формы БХШ 310 происходит отщепление лиганда. Учитывая вышесказанное, можно также предположить, что значительная доля разобщающей

активности конститутивно синтезируемой формы БХШ 310 обусловлена присутствием в белковом препарате распавшейся до стрессовой формы конститутивно синтезируемой формы БХШ 310. Косвенным подтверждением этому служит то, что к 90 мин инкубации наблюдаемые разобщающие активности стрессовой и конститутивно синтезируемой форм БХШ 310 сравниваются. Значительная разница в активности этих форм наблюдалась только в начале инкубации (Войников и др., 2001a).

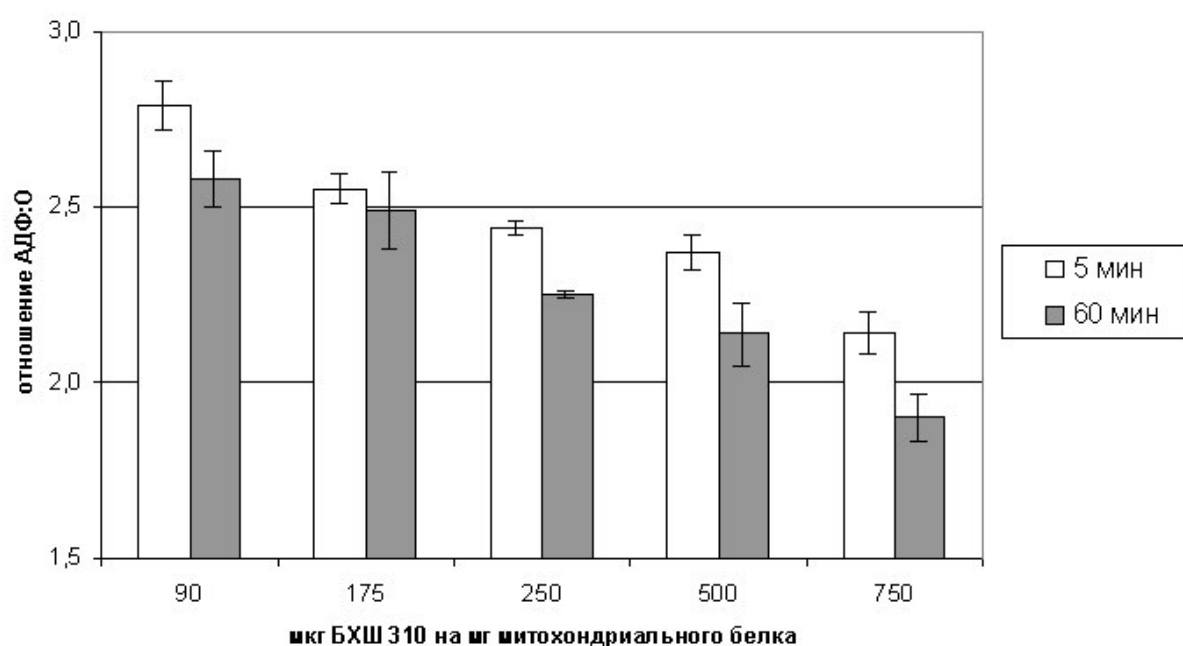


Рис. 40. Влияние различных концентраций БХШ 310 на отношение АДФ:О во время инкубации митохондрий озимой пшеницы в течение 5 и 60 мин при 0°C. Субстрат окисления: малат 10 мМ + глутамат 10 мМ. $M \pm m$, $n=6$.

Данные, полученные при изучении зависимости разобщения окисления и фосфорилирования от концентрации БХШ 310, гораздо более трудно интерпретировать. В целом, эффект разобщения БХШ 310 линейно зависит от его относительной концентрации в среде инкубации митохондрий. В то же время в первый момент инкубации митохондрий наблюдается определенный триггерный эффект.

12 МЕХАНИЗМ РАЗОБЩАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ БХШ 310 ОТЛИЧАЕТСЯ ОТ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ИЗВЕСТНЫХ РАЗОБЩАЮЩИХ БЕЛКОВ

Известно, что в митохондриях растений имеется ряд систем, способных при своем функционировании снижать степень сопряженности окисления и фосфорилирования (Siedow, Umbach, 2000; Ricquier, Bouillaud, 2000a). Исторически первой из них была открыта альтернативная цианидрезистентная оксидаза (Siedow, Umbach, 2000). Относительно недавно в митохондриях растений были также открыты митохондриальные UCP-подобные разобщающие белки, гомологичные разобщающим белкам животных (Ricquier, Bouillaud, 2000a). В связи с этим необходимо было установить, не является ли стрессовый белок БХШ 310 активатором альтернативной цианидрезистентной оксидазы или, поскольку молекулярная масса одной из субъединиц БХШ 310 близка к молекулярной массе димера разобщающего белка PUMP, митохондриальных UCP-подобных разобщающих белков.

12.1 Влияние БХШ 310 на функционирование различных комплексов дыхательной цепи митохондрий озимой пшеницы

Известно, что действие разобщающих белков типа UCP приводит к изменению протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий и зависит от присутствия жирных кислот, которые функционируют в качестве протонофоров (Palou et al., 1998). Если разобщение, вызываемое БХШ 310, происходит по подобному механизму, то можно предположить, что разобщающий эффект данного белка на отдельные комплексы дыхательной цепи должен быть одинаков. В то же время имеется ряд данных, свидетельствующих о том, что открытие митохондриальной поры (РТР), которое также может вызывать разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях, происходит гораздо более легко при использовании субстратов комплекса I дыхательной цепи, чем

при использовании доноров электронов комплексов II или IV (Fontaine et al., 1998). В связи с этим было необходимо провести изучение влияния БХШ 310 на энергетическую активность митохондрий при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий. Для определения влияния БХШ 310 на функциональную активность комплексов дыхательной цепи использовали различные субстраты цикла трикарбоновых кислот. Для комплекса I - α -кетоглутарат и малат, для комплекса II - сукцинат, для комплекса III - НАДН и для комплекса IV - аскорбат плюс ТМФД. При окислении сукцината, НАДН и аскорбата для ингибирования транспорта электронов через комплекс I использовали ротенон (3 мкМ).

Свежевыделенные митохондрии озимой пшеницы имели высокую энергетическую активность и нормальную степень сопряжения окисления и фосфорилирования (табл. 10-14). Инкубация этих митохондрий в течение 90 мин при 0°C не вызывала значительных изменений их активности. Скорости фосфорилирующего (состояние 3) и нефосфорилирующего (состояние 4) дыхания, дыхательный контроль по Chance-Williams и отношение АДФ:О во время гипотермии *in vitro* менялись незначительно. Имело место только некоторое ослабление дыхательной активности (табл. 10-14).

На основании современных представлений о составе митохондриальной дыхательной цепи (Douce, 1985; Moore, Siedow, 1991; Scheffler, 2000) было проведено изучение влияния БХШ 310 на функциональную активность ее комплексов I – IV в условиях инкубации митохондрий *in vitro* при 0°C. Известно, что аскорбат + ТМФД являются эффективным искусственным донором электронов, которые могут быть переданы на комплекс IV (последнюю часть дыхательной цепи) через цитохром c помимо всех других комплексов. В связи с этим эти субстраты были использованы для изучения функционального состояния комплекса IV. Полученные данные свидетельствуют, что добавление БХШ 310 не вызвало значительных изменений в скорости

фосфорилирующего (состояние 3) дыхания в течение 90 мин инкубации митохондрий (табл. 10). В то же время оно немедленно вызвало некоторое увеличение скорости нефосфорилирующего (состояние 4) дыхания и небольшое уменьшение дыхательного контроля и отношения АДФ:О. Дальнейшая инкубация этих митохондрий вплоть до 90 мин показала, что эти изменения происходят во время всей продолжительности эксперимента (табл. 10).

Таблица 10

Влияние БХШ 310 на окислительную активность митохондрий озимой пшеницы. Субстрат окисления: 2 мМ аскорбат + 0.2 мМ ТМФД. $M \pm m$, $n=6$.

Инкубация, мин	Скорость поглощения кислорода, нмоль O ₂ /мин/мг белка		Дыхательный контроль	Отношение АДФ:О
	Состояние 3	Состояние 4		
Контроль				
5	140.3±1.4	88.8±2.7	1.58±0.03	0.79±0.03
30	136.5±3.1	93.0±0.2	1.47±0.04	0.76±0.01
60	135.6±3.2	96.0±1.1	1.42±0.01	0.80±0.12
90	124.5±2.4	87.5±1.8	1.42±0.01	0.72±0.02
С добавлением БХШ 310				
5	137.0±2.3	96.1±2.4	1.42±0.01	0.67±0.21
30	136.8±3.3	100.8±5.6	1.36±0.10	0.59±0.23
60	136.0±2.1	98.4±1.7	1.38±0.01	0.53±0.22
90	130.4±1.8	105.0±3.5	1.24±0.06	0.52±0.17

Сходные данные были получены и при изучении комплекса III и «внешней» НАДН дегидрогеназы. Действительно, когда в качестве субстрата окисления был использован экзогенный НАДН, потребление кислорода было связано с потоком электронов через участок дыхательной цепи «внешняя» НАДН дегидрогеназа – убихинон – комплекс III – комплекс IV. Полученные результаты показывают, что скорость фосфорилирующего (состояние 3) дыхания не

зависит от присутствия БХШ 310 в среде инкубации. В то же время добавление БХШ 310 вызывало более сильное увеличение скорости нефосфорилирующего дыхания и уменьшение дыхательного контроля и отношения АДФ:О по сравнению с комплексом IV (табл. 11).

Таблица 11

Влияние БХШ 310 на окислительную активность митохондрий озимой пшеницы. Субстрат окисления: 1 мМ НАДН в присутствии 3 мкМ ротенона. $M \pm m$, $n=6$.

Инкубация, мин	Скорость потребления кислорода, нмоль O ₂ /мин/мг белка		Дыхательный контроль	Отношение АДФ:О
	Состояние 3	Состояние 4		
Контроль				
5	119.7±2.8	79.8±9.8	1.52±0.15	0.51±0.05
30	119.9±0.3	77.4±2.8	1.55±0.05	0.42±0.01
60	103.9±9.3	76.5±1.4	1.36±0.10	0.44±0.02
90	103.6±4.9	78.9±2.4	1.31±0.10	0.39±0.02
С добавлением БХШ 310				
5	120.1±6.7	93.3±15.3	1.30±0.15	0.44±0.05
30	118.3±7.2	94.6±7.9	1.28±0.00	0.39±0.01
60	109.3±6.8	92.4±3.7	1.19±0.02	0.38±0.02
90	102.6±5.4	88.9±3.8	1.15±0.01	0.36±0.03

Для определения влияния БХШ 310 на функционирование комплекса II в качестве субстрата был использован сукцинат. В этом случае, как было обнаружено, присутствие БХШ 310 в среде инкубации вызывает такие же изменения, как и в комплексе III (табл. 12). Отличия наблюдались только в первые моменты инкубации – скорость нефосфорилирующего дыхания была несколько выше.

Влияние БХШ 310 на функционирование комплекса I значительно отличается от его влияния на все остальные

комплексы. Для определения влияния БХШ 310 на этот комплекс были использованы НАД-зависимые субстраты (α -кетоглутарат и малат). В этих случаях добавление БХШ 310 в среду инкубации митохондрий вызывало резкое увеличение скорости нефосфорилирующего (состояние 4) дыхания и значительное уменьшение дыхательного контроля и отношения АДФ:О. При этом после 30 мин инкубации это действие БХШ 310 усиливалось (табл. 13, 14).

Таблица 12

Влияние БХШ 310 на окислительную активность митохондрий озимой пшеницы. Субстрат окисления: 8 мМ сукцинат в присутствии 5 мМ глутамата и 3 мкМ ротенона. $M \pm m$, $n=6$.

Инкубация, мин	Скорость потребления кислорода, нмоль O ₂ /мин/мг белка		Дыхательный контроль	Отношение АДФ:О
	Состояние 3	Состояние 4		
Контроль				
5	91.5±1.8	47.0±3.4	1.95±0.13	1.66±0.25
30	90.3±7.6	47.2±5.8	1.91±0.34	1.55±0.21
60	87.9±3.4	49.1±3.4	1.82±0.27	1.51±0.18
90	82.1±7.7	47.7±4.4	1.71±0.32	1.49±0.16
С добавлением БХШ 310				
5	93.1±3.6	62.6±0.2	1.50±0.11	1.45±0.11
30	89.5±6.0	57.0±3.4	1.42±0.15	1.26±0.10
60	93.7±3.0	60.6±3.1	1.26±0.10	1.12±0.07
90	70.6±3.2	56.0±1.4	1.26±0.07	1.07±0.11

Сравнение влияния БХШ 310 на функциональную активность комплексов дыхательной цепи митохондрий озимой пшеницы во время гипотермии *in vitro* показывает, что наиболее чувствителен к разобщающему дыханию и фосфорилированию действию этого белка комплекс I (рис. 41). При использовании в качестве субстрата окисления малата отмечалось самое большое увеличение скорости

нефосфорилирующего (состояние 4) дыхания (до 60%) и падение дыхательного контроля (до 38%). Необходимо отметить, что при использовании дыхательных субстратов этого комплекса скорость дыхания в состоянии 4 во время инкубации возрастала (рис. 41). В то же время уменьшение отношения АДФ:О во время периода инкубации не менялось и составляло около 20% (рис. 42).

Таблица 13

Влияние БХШ 310 на окислительную активность митохондрий озимой пшеницы. Субстрат окисления: 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата. $M \pm m$, $n=6$.

Инкубация, мин	Скорость потребления кислорода, нмоль O ₂ /мин/мг белка		Дыхательный контроль	Отношение АДФ:О
	Состояние 3	Состояние 4		
Контроль				
5	61.7±3.0	22.3±1.4	2.78±0.36	2.82±0.07
30	60.9±3.1	22.2±1.9	2.73±0.20	2.51±0.14
60	58.2±4.9	22.2±1.3	2.63±0.25	2.68±0.16
90	57.8±3.4	21.6±1.0	2.65±0.34	2.60±0.35
С добавлением БХШ 310				
5	64.1±3.2	31.4±1.5	2.06±0.12	2.37±0.10
30	61.0±2.9	33.7±1.1	1.82±0.06	2.29±0.01
60	59.6±2.7	34.0±1.8	1.73±0.06	2.14±0.09
90	59.4±3.1	34.0±1.8	1.74±0.08	2.04±0.13

Комплексы II и III были более стабильны к разобщающему действию БХШ 310. Их ответы на добавление БХШ 310 в среду инкубации были очень сходны (рис. 41). Скорости дыхания в состоянии 4 возрастали на 20 – 30% и были достаточно стабильны во время всего периода инкубации (рис. 41). В то же время необходимо отметить значительную разницу в отношениях АДФ:О между этими двумя вариантами эксперимента. В случае использования в качестве

дыхательного субстрата сукцината наблюдалось уменьшение отношения АДФ:О с 13% в начале до 28% в конце инкубации, то при использовании в качестве субстрата НАДН уменьшение отношения АДФ:О не было столь ярко выраженным (около 10%) и сохранялось таковым на протяжении всего периода инкубации (рис. 42).

Таблица 14

Влияние БХШ 310 на окислительную активность митохондрий озимой пшеницы. Субстрат окисления: 5 мМ α -кетоглутарат в присутствии 3 мМ малоната и 0.5 мМ ТПФ. $M \pm m$, $n=6$.

Инкубация, мин	Скорость потребления кислорода, нмоль O ₂ /мин/мг белка		Дыхательный контроль	Отношение АДФ:О
	Состояние 3	Состояние 4		
Контроль				
5	42.8±2.8	9.0±0.5	4.73±0.45	2.89±0.16
30	37.7±2.6	8.0±1.0	4.71±0.52	2.89±0.16
60	33.9±2.2	8.2±1.1	4.13±0.53	2.88±0.12
90	30.1±2.8	7.4±1.2	4.07±0.66	2.88±0.15
С добавлением БХШ 310				
5	41.5±3.0	12.3±1.3	3.37±0.51	2.54±0.12
30	37.1±1.3	11.6±0.9	3.21±0.23	2.51±0.14
60	33.9±2.2	12.5±1.6	2.60±0.38	2.34±0.26
90	27.8±1.7	10.5±1.4	2.65±0.34	2.31±0.16

Комплекс IV показал самый слабый ответ на добавление БХШ 310 в среду инкубации. Возрастание скорости нефосфорилирующего дыхания у митохондрий, инкубированных в присутствии БХШ 310, составляло только около 8% по отношению к контролю (рис. 41). В то же время было отмечено уменьшение отношения АДФ:О вплоть до 30% к концу инкубации (рис. 42).

Полученные в ходе экспериментов данные свидетельствуют о различии в разобщающем действии БХШ

310 на различные комплексы дыхательной цепи. Результаты показывают, что комплекс I наиболее чувствителен к разобщающему действию БХШ 310, в то время как остальные комплексы дыхательной цепи более стабильны к данному воздействию. Эти данные подтверждают полученные рядом авторов (Lee, 1995; Singer et al., 1995; El-Wadawi, Bowler, 1996; Pobezhimova et al., 1996) результаты, свидетельствующие о большей чувствительности комплекса I митохондриальной дыхательной цепи к различным стрессовым воздействиям.

Таким образом, на основании этих данных можно сделать вывод, что механизм разобщающего действия БХШ 310 субстратно-зависим. Ключевой точкой разобщающего действия БХШ 310 является комплекс I митохондриальной дыхательной цепи.

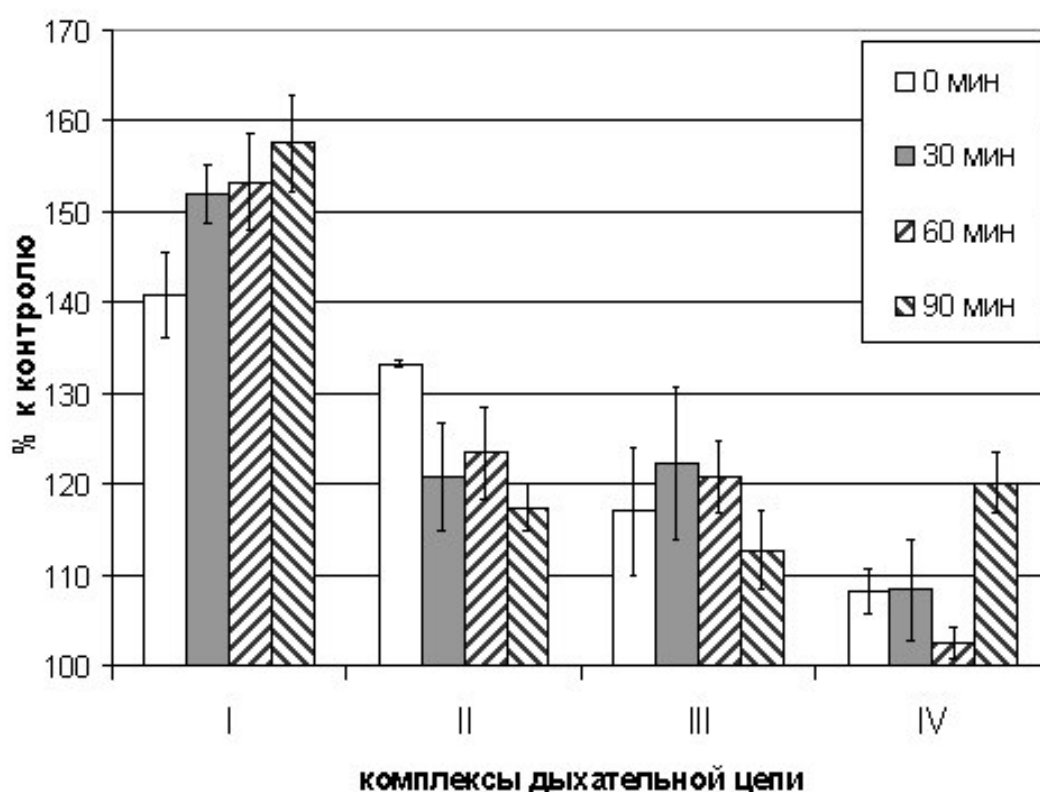


Рис. 41. Влияние БХШ 310 на скорость дыхания в состоянии 4 при окислении различных субстратов (комплекс I – малат, комплекс II – сукцинат, комплекс III – НАДН, комплекс IV – аскорбат + ТМФД). За 100% принята скорость поглощения кислорода в состоянии 4 у контрольных митохондрий, равная среднему значению 6 опытов. $M \pm m$, $n=6$.

Поскольку известно, что открытие митохондриальной поры происходит легче при использовании субстратов комплекса I дыхательной цепи митохондрий, чем при использовании субстратов комплексов II или IV (Fontaine et al., 1998), а циклоспорин А является эффективным ингибитором открытия митохондриальной поры, было проведено изучение влияния циклоспорина А на разобщающий эффект БХШ 310. Полученные в этом эксперименте данные свидетельствуют, что БХШ 310 вызывал разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях в присутствии циклоспорина А. Если добавление циклоспорина А к инкубируемым в состоянии 3 митохондриям озимой пшеницы вызвало 66% ингибирование дыхания в этом состоянии, то последующее добавление БХШ 310 вызывало увеличение скорости дыхания митохондрий (рис. 43).

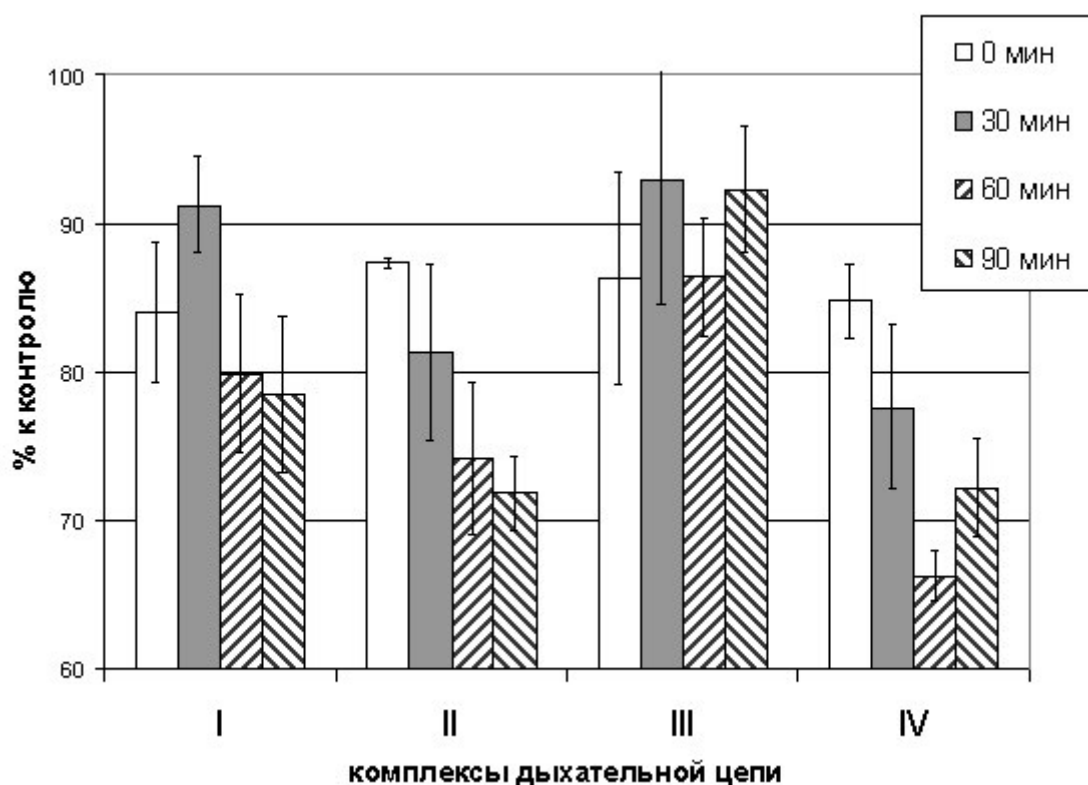


Рис. 42. Влияние БХШ 310 на отношение АДФ:О при окислении различных субстратов (комплекс I – малат, комплекс II – сукцинат, комплекс III – НАДН, комплекс IV – аскорбат + ТМФД). За 100% принято отношение АДФ:О у контрольных митохондрий, равное среднему значению 6 опытов. $M \pm m$, $n=6$.

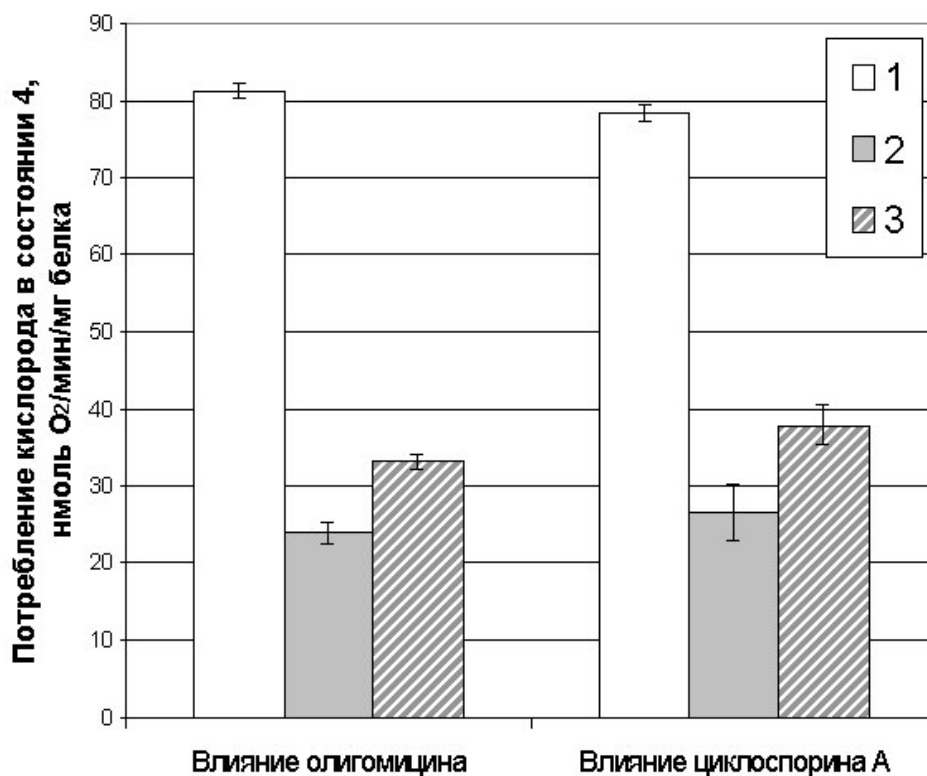


Рис. 43. Влияние БХШ 310 на скорость поглощения кислорода митохондриями в присутствии олигомицина (2.5 мкг/мг митохондриального белка) и циклоспорина А (1 мкМ). 1 – скорость потребления кислорода в состоянии 3; 2 – скорость потребления кислорода в состоянии 3 после добавления олигомицина или циклоспорина А, соответственно; 3 – скорость потребления кислорода после последующего добавления БХШ 310.

Изучение влияния на разобщающий эффект БХШ 310 олигомицина, ингибирующего митохондриальную АТФ-синтетазу, показало что стимуляция дыхания митохондрий озимой пшеницы, вызванная добавлением БХШ 310, в присутствии олигомицина была такой же (около 40%), как и в его отсутствие. При этом необходимо отметить, что абсолютные значения увеличения дыхания в состоянии 4 были близки. Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что разобщающий эффект БХШ 310 не блокируется добавлением олигомицина и, следовательно, не связан с активацией АТФ-синтетазы.

Таким образом, полученные данные о влиянии олигомицина и циклоспорина А на разобщающую активность БХШ 310 свидетельствуют, что БХШ 310 не является

активатором АТФ-синтетазы или компонентом классической митохондриальной поры (РТР) (Zoratti, Szabo, 1995; Vercesi et al., 1997). В то же самое время некоторые характеристики разобщающего действия БХШ 310, в частности, то, что ключевой точкой действия его разобщающей активности, подобно РТР, является комплекс I дыхательной цепи митохондрий, а также то, что разобщение окисления и фосфорилирования происходит при ассоциации цитоплазматического БХШ 310 с митохондриями, позволяют предположить определенное сходство между механизмами действия БХШ 310 и РТР. Можно предположить, что БХШ 310 ассоциирует с белками наружной мембраны митохондрий и в дальнейшем этот комплекс взаимодействует с комплексом I дыхательной цепи митохондрий, образуя специфический канал, сходный с митохондриальной порой животных, но отличный от нее. Образование такого канала вызывает утечку заряда внутренней мембраны митохондрий и разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях. Возможно также, что БХШ 310 шунтирует поток электронов с комплекса I на комплекс IV, что также может вызывать разобщение окисления и фосфорилирования из-за обхода пункта сопряжения на комплексе III.

12.2 Влияние БХШ 310 на функционирование альтернативной цианидрезистентной оксидазы

Одной из особенностей функционирования дыхательной цепи растительных митохондрий является присутствие альтернативной цианидрезистентной оксидазы (Шугаев, 1991; Меденцев и др., 1999; Meeuse, Buggeln, 1969; Meeuse, 1975; Huq, Palmer, 1978; Rich, 1978; Vanlerberghe, McIntosh, 1997; Siedow, Umbach, 2000). При функционировании альтернативной оксидазы (АО) электроны переносятся с убихинона на кислород, минуя ряд пунктов сопряжения электронтранспортной цепи, следовательно, при ее функционировании происходит регулируемое разобщение окисления и фосфорилирования. АО является белком ядерного

кодирования и импортируется в митохондрии в соответствии с общей схемой импорта белков (Murcha et al., 1999). Зрелый белок альтернативной оксидазы у большинства видов растений состоит из приблизительно 280 аминокислотных остатков (Rhoads, McIntosh, 1992; 1993; Siedow, Umbach, 2000). Анализ профиля гидрофобности белка показал, что большая часть белка гидрофильна, но в нем имеются две гидрофобные области размером каждая около 20 аминокислот, начинающиеся обычно в областях около 110 и 170 аминокислот (Siedow, Umbach, 2000). Тот факт, что альтернативная оксидаза ведет себя как интегральный белок внутренней мембраны, привело к предположению, что белок «заякорен» в мембране этими гидрофобными участками, образующими трансмембранные домены (Siedow, Umbach, 2000). Установленными функциями данного белка являются термогенез (Meeuse, Buggeln, 1969; Meeuse, 1975; Wilson, Smith, 1971; Kumar et al., 1990; Leach et al., 1996; Moynihan et al., 1995; Ordentlich et al., 1991) и регуляция образования АФК митохондриями (Purvis et al., 1995; Popov et al., 1997; Maxwell et al., 1999).

В дальнейшем при изучении структуры и механизмов регуляции альтернативной оксидазы было установлено, что у растений альтернативная оксидаза функционирует в виде димера (Siedow, Umbach, 2000; Umbach, Siedow, 1993). Активность фермента *in vivo* очень сильно зависит от содержания белка альтернативной оксидазы, а, следовательно, и степени экспрессии его гена, а также от концентрации его субстрата – восстановленного убихинона (Siedow, Umbach, 2000; Vanlenberge et al., 1999). В последние годы при изучении механизмов посттрансляционной регуляции активности данного фермента было установлено, что когда субъединицы альтернативной оксидазы ковалентно связаны дисульфидным мостом, то фермент практически неактивен (Umbach, Siedow, 1993; Vanlenberge et al., 1999). Восстановление дисульфидных связей резко повышает активность фермента (Umbach,

Siedow, 1993; Vanlenberge et al., 1999). В то же время известно, что в изолированных митохондриях активность альтернативной оксидазы заметно усиливается при добавлении α -кетокислот, особенно пирувата (Millar et al., 1993; Day et al., 1994). Ряд авторов предполагает наличие связи между этими двумя регуляторными механизмами, поскольку установлено, что альтернативная оксидаза не стимулируется α -кетокислотами при образовании дисульфидных связей между субъединицами (Vanlenberge et al., 1999; Siedow, Umbach, 2000).

Известно, что альтернативная оксидаза активируется в ответ на большое число различных типов внешних воздействий на растения и, по-видимому, принимает участие в ответе растения на различные типы стресса. Альтернативная оксидаза значительно индуцируется условиями окислительного стресса (Maxwell et al., 1999), различными инфекциями (Lennon et al., 1997) и низкими температурами (McCaig, Hill, 1977; Elthon, McIntosh, 1987; Vanlerberghe, McIntosh, 1992; Gonzalez-Meler et al., 1999).

В связи с этим следующей задачей было установить, не является ли стрессовый белок БХШ 310 активатором альтернативной оксидазы. Изучение влияния БХШ 310 на функционирование альтернативной цианидрезистентной оксидазы проводилось на митохондриях озимой пшеницы, альтернативная оксидаза в которых была предварительно полностью активирована добавлением 5 мМ дитиотриетолом для полного восстановления регуляторных дисульфидных связей и достижения наивысшей активности альтернативной оксидазы в присутствии 1 мМ пирувата.

Полученные результаты свидетельствуют, что инкубация митохондрий озимой пшеницы с БХШ 310 не оказывала влияния на скорость дыхания в состоянии 3, но заметно стимулировала дыхание в состоянии 4 (табл. 15). При этом коэффициент дыхательного контроля в данной серии опытов снижался с $1,63 \pm 0,07$ у контрольных митохондрий,

Таблица 15

Влияние БХШ 310 на активность цианидрезистентной альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы. Субстрат окисления 8 мМ сукцинат + 5 мМ глутамат в присутствии 3 мкМ ротенона.

Вариант	Потребление кислорода, нмоль O ₂ / мин на 1 мг белка		Дыхательный контроль	Отношение АДФ:О	Потребление кислорода, нмоль O ₂ / мин на 1 мг белка		% от дыхания в состоянии 3
	Состояние 3	Состояние 4			Состояние 3	Цианидрезистентное дыхание в присутствии пирувата	
Контроль	94,0±2,4	57,9±2,2	1,63±0,07	2,01±0,10	84,1±5,9	38,5±2,8	45,8
БХШ 310	93,7±3,5	66,8±3,6	1,39±0,07	1,43±0,14	88,9±2,5	23,2±3,8	26,1

Митохондрии преинкубировались с 5 мМ дитиотрептолом для полного восстановления регуляторных дисульфидных связей и достижения наивысшей активности альтернативной оксидазы в присутствии 1 мМ пирувата. И использованная концентрация KCN составляла 0,4 мМ.

инкубировавшихся без БХШ 310, до $1,39 \pm 0,07$ у митохондрий, инкубировавшихся в присутствии БХШ 310. Отношение АДФ:О вследствие инкубации митохондрий с БХШ 310 также снижалось с $2,01 \pm 0,10$ в контрольном варианте до $1,43 \pm 0,14$.

Ингибирование основной дыхательной цепи митохондрий KСN в присутствии дитиотриетолa и пирувата показало, что альтернативная цианидрезистентная оксидаза была полностью активирована (табл. 15). Цианидрезистентное дыхание контрольных митохондрий составляло 45.8% отдыхания в состоянии 3. В то же время цианидрезистентное дыхание митохондрий, инкубировавшихся с БХШ 310 составляло всего 26.1% от дыхания в состоянии 3 (табл. 15). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что инкубация митохондрий с БХШ 310 вызывала ингибирование альтернативной цианидрезистентной оксидазы и снижение цианидрезистентного дыхания. В связи с этим можно считать, что БХШ 310 не является активатором альтернативной цианидрезистентной оксидазы растительных митохондрий (Колесниченко и др., 2001).

Интересно отметить, что аналогичное влияние на функционирование альтернативной оксидазы оказывает и активация митохондриальных UCP-подобных белков. Эти данные были получены при изучении влияния активации PUMP свободными жирными кислотами на функционирование альтернативной оксидазы (Sluse et al., 1998; Almeida et al., 1999).

12.3 Влияние БСА, связывающего свободные жирные кислоты и ингибирующего активность UCP-подобных разобщающих белков, на активность БХШ 310

Митохондриальные разобщающие белки (англ. транскрипция – uncoupling proteins, UCP) в настоящее время обнаружены как в митохондриях животных и человека, так и в растительных органеллах (Скулачев, 1989; Vercesi et al., 1995; Jezek et al., 1998, 2000; Jezek, Garlid, 1998; Samec et al.,

1998; Bouillaud et al., 2001). Эти белки, как предполагают, являются филогенетически специализированными протеинами, с помощью которых осуществляется регулируемое разобщение процессов окисления и фосфорилирования (Fleury, Sanchis, 1999; Bouillaud et al., 2001). Все известные разобщающие белки принадлежат к семейству митохондриальных переносчиков и являются белками внутренней мембраны органелл (Garlid et al., 1998, 2000, 2001; Jezek et al., 1998; Jezek, Garlid, 1998).

UCP1, ранее известный как UCP или термогенин, является в этом смысле «классическим» митохондриальным разобщающим белком, специфичным для митохондрий бурой жировой ткани млекопитающих (Palou et al., 1998; Klingenberg, 1999; Klingenberg, Huang, 1999; Nicholls, Rial, 1999; Ricquier, Bouillaud, 2000a, Stuart et al., 1999, 2001). Этот белок кодируется ядерным геном. Мол. масса термогенина у всех исследованных видов животных и человека приблизительно равна 33 кДа. UCP1 представляет собой мономер, состоящий из 305 аминокислот у человека и 306 аминокислот у мыши (Jezek et al., 1998). Функциональная единица белка является гомодимером (Palou et al., 1998, Ricquier, Bouillaud, 2000a,b). Согласно принятой в настоящее время большинством исследователей модели, UCP1 выступает посредником, облегчающим трансмембранный перенос анионов жирных кислот (Garlid et al., 1998, 2000; Palou et al., 1998; Jezek, 1999; Skulachev, 1999; Klingenberg et al., 2001; Stuart et al., 2001).

Изучение геномов растений позволило установить, что в них присутствуют гены, кодирующие белки, имеющие высокую гомологию с UCP1 и UCP2. Эти белки были названы растительными митохондриальными разобщающими белками (plant mitochondrial uncoupling proteins – PUMP) (Vercesi et al., 1995; Laloi, 1997, Jarmuszkiewicz, 2001; Vercesi, 2001). Растительный разобщающий митохондриальный белок PUMP вначале был выделен из клубней картофеля, затем с помощью

иммунологических методов был обнаружен в других видах растений как полипептид с мол. массой 32 кДа и димер с молекулярной массой 64 кДа (Laloi, 1997; Jezek et al., 1998). При помощи вестерн-блоттинга белок PUMP был обнаружен в митохондриях значительного количества исследованных видов как однодольных, так и двудольных растений [Jezek et al., 2000]. Среди исследованных однодольных растений PUMP был обнаружен у пшеницы, лука и кукурузы (Jezek et al., 2000; Murayama, Handa, 2000; Pastore et al., 2000), среди двудольных – у картофеля (Vercesi et al., 1995), свеклы, капусты, турнепса, подсолнечника, шпината (Jezek et al., 2000), арабидопсиса (Maia et al., 1998; Watanabe et al., 1999), апельсина, папайи, банана и ананаса (Jezek et al., 1998), табака, манго (Considine et al., 2001; Jezek et al., 2001), томата (Costa et al., 1999; Sluse, Jarmuszkiewicz, 2000). Изучение разобщения в митохондриях, изолированных из этих видов растений, вызванного добавлением линолевой кислоты, позволило выявить в них функциональную активность белка PUMP (Jezek et al., 2000). На основании этих фактов было выдвинуто предположение о повсеместном присутствии данного разобщающего белка в растениях.

Интересно также отметить, что при изучении влияния активации PUMP свободными жирными кислотами на функционирование альтернативной оксидазы было установлено, что активация PUMP вызывает ингибирование альтернативной оксидазы (Sluse et al., 1998; Almeida et al., 1999).

Следует отметить, что почти все обнаруженные в растениях UCP-подобные разобщающие белки, в частности StUCP (Laloi, 1997) и PUMP в клубнях картофеля при хранении (Nantes et al., 1999), AtPUMP у арабидопсиса (Maia et al., 1998), а также SfUCPa и SfUCPb в початках *Symplocarpus foetidus* (Ito, 1999)] индуцируются холодом. В связи с этим имеются все основания предполагать, что эти белки принимают участие в защите растений от низкотемпературного стресса (Laloi, 1997;

Maia et al., 1998; Ito, 1999) и, следовательно, могут считаться стрессовыми белками растений (Колесниченко и др., 2000).

Поскольку, как отмечалось выше, функционирование известных в настоящее время «классических» митохондриальных разобщающих белков типа UCP связано с циклическим оборотом через митохондриальную мембрану жирных кислот, то, в соответствии с этим механизмом, добавление к инкубируемым *in vitro* митохондриям БСА, связывающего свободные жирные кислоты, должно вызвать резкое ингибирование активности «классического» разобщающего белка. Действительно, имеются данные, говорящие о том, что, после стимуляции разобщения добавлением экзогенной линолевой кислоты, добавление БСА вызывает ингибирование активности растительного разобщающего белка PUMP (Jarmuszkiewicz et. al., 1998). В связи с этим можно предположить, что, если разобщающий стрессовый белок БХШ 310 также функционирует как переносчик жирных кислот, либо как регулятор активности известных разобщающих белков, то инкубация изолированных митохондрий одновременно с БХШ 310 и с БСА не должна оказывать на них разобщающего эффекта.

Результаты экспериментов показали, что митохондрии, выделенные из побегов проростков озимой ржи, были энергетически активными и имели хорошую степень сопряжения окисления и фосфорилирования (табл. 16). Инкубация этих митохондрий при 0°C в течение 90 мин вызывала некоторое снижение их энергетической активности. При этом скорость фосфорилирующего (состояние 3) дыхания незначительно снижалась, скорость нефосфорилирующего (состояние 4) дыхания оставалась практически неизменной, дыхательный контроль снижался на 0.34, а отношение АДФ:О во время гипотермии *in vitro* снижалось на 0.12 (табл. 16). Таким образом, во время инкубации органелл при гипотермии произошло частичное разобщение процессов окисления и фосфорилирования. Подобные изменения митохондриальной

активности, как известно, связаны с увеличением количества свободных жирных кислот в органеллах во время инкубации при 0°C (Войников, 1980; Войников и др., 1983) и активацией ими митохондриальных разобщающих белков (Jezek et al., 1998). В то же время известно, что добавление 0.5% БСА к инкубируемым митохондриям связывает свободные жирные кислоты и инактивирует «классические» разобщающие белки (Jarmuszkiewicz et. al., 1998).

Таблица 16

Влияние БСА (0.5%) и стрессового разобщающего белка БХШ 310 (0.5 мг на 1 мг митохондриального белка) на энергетическую активность митохондрий озимой ржи во время их инкубации при 0° в течение 90 мин. Субстрат окисления: 10 мМ малат+10 мМ глутамат. $M \pm m$, $n=6$.

Инкубация мин	Потребление кислорода, нмоль O ₂ / мин/мг белка		Дыхательный контроль	Отношение АДФ:О
	Состояние 3	Состояние 4		
Контроль				
5	90.7 \pm 5.9	40.8 \pm 0.9	2.21 \pm 0.21	2.00 \pm 0.13
30	82.9 \pm 5.5	41.5 \pm 0.3	1.99 \pm 0.11	2.00 \pm 0.11
60	79.2 \pm 3.0	41.1 \pm 1.7	1.88 \pm 0.05	1.88 \pm 0.08
90	76.7 \pm 7.3	41.4 \pm 0.1	1.87 \pm 0.15	1.88 \pm 0.01
С добавлением БСА				
5	90.3 \pm 5.8	35.8 \pm 0.2	2.54 \pm 0.04	2.12 \pm 0.02
30	87.3 \pm 2.1	33.3 \pm 0.2	2.63 \pm 0.08	2.00 \pm 0.16
60	78.4 \pm 5.1	35.4 \pm 1.0	2.22 \pm 0.21	2.07 \pm 0.01
90	78.8 \pm 3.9	37.2 \pm 2.7	2.13 \pm 0.25	1.98 \pm 0.08
С добавлением БХШ 310				
5	84.8 \pm 1.3	48.6 \pm 3.7	1.75 \pm 0.14	1.90 \pm 0.13
30	83.8 \pm 1.0	49.3 \pm 0.1	1.70 \pm 0.02	1.58 \pm 0.04
60	76.7 \pm 4.0	48.4 \pm 0.8	1.59 \pm 0.10	1.47 \pm 0.13
90	70.9 \pm 5.4	46.0 \pm 2.4	1.55 \pm 0.18	1.40 \pm 0.16
С добавлением БХШ 310 и БСА				
5	90.1 \pm 5.1	41.9 \pm 3.3	2.20 \pm 0.12	1.97 \pm 0.12
30	80.4 \pm 9.1	42.9 \pm 0.1	1.88 \pm 0.21	1.82 \pm 0.02
60	83.6 \pm 3.1	46.7 \pm 0.4	1.79 \pm 0.08	1.73 \pm 0.01
90	77.9 \pm 3.7	50.6 \pm 0.6	1.44 \pm 0.06	1.49 \pm 0.19

Добавление к митохондриям с целью связывания эндогенных жирных кислот 0.5% бычьего сывороточного альбумина (БСА) значительно повысило их активность. При этом, если скорость дыхания в состоянии 3 по отношению к контролю практически не менялась (табл. 16), то скорость дыхания в состоянии 4 была в данном варианте опыта значительно ниже, чем в контроле – 35.8 ± 0.2 нмоль O_2 /мин/мг белка в начале инкубации и 37.2 ± 2.7 нмоль O_2 /мин/мг белка через 90 мин инкубации. У митохондрий с добавлением БСА был выше дыхательный контроль (на 0.33 в начале инкубации и на 0.26 в конце) и отношение АДФ:О (на 0.12 в начале и 0.10 в конце инкубации) (табл. 16).

Данный феномен давно известен (Войников и др., 1983), но лишь в последнее время получил объяснение в связи с открытием наличия в растениях белков, разобщающих окисление и фосфорилирование за счет циклического оборота жирных кислот (Jezek et al., 1998). Более того, показано, что данные белки индуцируются холодом (Palou et al., 1998) и в силу этого являются стрессовыми белками, защищающими растения от повреждения в первые моменты переохлаждения. Все известные к настоящему времени разобщающие растительные белки имеют высокую гомологию с первым разобщающим белком UCP – 1 и принадлежат к одному семейству митохондриальных переносчиков анионов (Jezek et al., 1998). В то же время ранее нами был выделен цитоплазматический стрессовый белок озимой ржи (Колесниченко и др., 1996) и показано, что 30 мин инкубация с ним митохондрий озимой пшеницы вызывает у них разобщение окисления и фосфорилирования (Побежимова и др., 1996; Voinikov et al., 1998).

Добавление к изолированным митохондриям озимой ржи во время их инкубации разобщающего стрессового белка БХШ 310 вызвало изменение их энергетической активности (табл. 16). Если на скорость фосфорилирующего (состояние 3) дыхания добавление БХШ 310 не оказывало практически

никакого влияния (табл. 16), то скорость нефосфорилирующего дыхания при добавлении БХШ 310 возрастала уже через 5 мин инкубации. Вследствие этого уже через 5 мин инкубации снижался дыхательный контроль (на 0.46 по сравнению с контролем) и отношение АДФ:О (табл. 16). Во время дальнейшей инкубации в течение 90 мин сохранялась более высокая по сравнению с контролем скорость дыхания митохондрий в состоянии 4. При этом дыхательный контроль через 90 мин инкубации снижался на 0.27 по сравнению с контрольными митохондриями, а отношение АДФ:О снижалось на 0.48 (табл. 16).

Эксперимент по инкубации изолированных митохондрий озимой ржи одновременно с БХШ 310 и БСА показал, что эффект разобщения окисления и фосфорилирования, индуцируемый добавлением БХШ 310, не снимается добавлением в среду инкубации БСА (табл. 16). Если через 5 мин инкубации разница в скорости нефосфорилирующего дыхания между вариантами «контроль» и «с добавлением БХШ 310» составляла 7.8 нмоль O_2 /мин/мг белка, то разница между вариантами «с добавлением 0.5% БСА» и «с добавлением БХШ 310 и БСА» составляла 6.1 нмоль O_2 /мин/мг белка (табл. 16). Такая же картина сохранялась и во время последующей инкубации митохондрий. Разница между этими вариантами составляла 6 – 8 нмоль O_2 /мин/мг белка в начале инкубации и еще больше увеличивалась к концу инкубации до 13 нмоль O_2 /мин/мг белка (табл. 16) (Войников и др., 2001a). Таким образом, полученные нами данные показывают, что разобщающий эффект БХШ 310 не зависит от присутствия в среде инкубации митохондрий жирных кислот. В связи с этим мы можем предполагать, что механизм разобщающего действия БХШ 310 на митохондрии озимой ржи отличен от характерного для «классических» разобщающих белков циклического оборота жирных кислот.

Поскольку как показано выше, БХШ 310 был обнаружен у ряда видов однодольных растений (Kolesnichenko et al., 1999),

но не был обнаружен у двудольных растений, была предпринята попытка установить, какое влияние БХШ 310 оказывает на митохондрии однодольных (пшеницы, кукурузы) и двудольных (горох) растений. Влияние БХШ 310 на функционирование митохондрий изучали как при добавлении в среду инкубации БХШ 310 в чистом виде, так и на фоне 0.5% БСА.

Митохондрии гороха, кукурузы и пшеницы после 60 мин инкубации в среде ресуспендирования без добавок имели довольно высокую величину ДК, отношение АДФ:О у органелл было близко к теоретическому значению для НАД-зависимых субстратов (табл. 17). Дыхание в состоянии 4 составляло 29% у гороха, 33% у кукурузы и 30% у пшеницы от дыхания, связанного с фосфорилированием. Поскольку данная величина для митохондрий ржи составляла 53% (табл. 16), можно сделать вывод, что митохондрии гороха, кукурузы и пшеницы после 60 мин инкубации имели хорошую степень сопряжения. В то же время у митохондрий озимой ржи после 60 мин инкубации наблюдалось значительное разобщение дыхания и фосфорилирования ($ДК=1.88\pm0.05$; $АДФ:О=1.88\pm0.08$).

Инкубация митохондрий в течение 60 мин в присутствии БХШ 310 у всех видов растений сопровождалась значительными изменениями параметров сопряженности - на фоне значительного увеличения скорости нефосфорилирующего дыхания было отмечено падение ДК и уменьшение отношения АДФ:О (табл. 17). Наибольшая степень разобщения дыхания и фосфорилирования отмечалась при добавлении БХШ 310 к митохондриям гороха (уменьшение ДК на 39%) и пшеницы (уменьшение ДК на 38%). Менее выраженный эффект БХШ 310 оказывал на митохондрии кукурузы (уменьшение ДК на 29%) (табл. 17). Таким образом, на основании этих данных можно сделать вывод, что БХШ 310 оказывает разобщающее влияние на митохондрии всех исследованных видов растений.

Таблица 17

Влияние БСА (0.5%) и БХШ 310 (0.5 мг на 1 мг белка митохондрий) на энергетическую активность митохондрий озимой пшеницы, кукурузы и гороха после инкубации при 0° в течение 60 мин. Субстрат окисления: 10 мМ малат+10 мМ глутамат. $M \pm m$, $n=6$.

Вариант опыта	Потребление кислорода, нмоль O ₂ / мин/мг белка		Дыхательный контроль	Отношение АДФ:О
	Состояние 3	Состояние 4		
Горох				
Контроль	76.8±4.7	22.4±1.9	3.56±0.44	2.38±0.02
БСА	76.0±3,1	19.0±2.1	4.00±0.17	2.61±0.09
БХШ 310	78.1±2.9	36.2±2.2	2.16±0.20	1.97±0.11
БХШ 310+БСА	77.1±0.8	34.3±1.8	2.27±0.08	1.98±0.03
Кукуруза				
Контроль	70.5±3.6	23.3±2.4	3.26±0.32	2.59±0.12
БСА	75.8±4.2	20.0±1.8	3.79±0.04	2.50±0.03
БХШ 310	76.3±6.4	31.4±1.1	2.32±0.11	2.40±0.18
БХШ 310+БСА	71.0±4.6	29.6±2.6	2.49±0.24	2.25±0.13
Озимая пшеница				
Контроль	78.7±6.0	23.1±2.2	3.41±0.14	2.26±0.06
БСА	76.4±5.8	18.3±1.4	4.17±0.12	2.46±0.08
БХШ 310	80.7±5.2	37.2±0.1	2.10±0.11	2.03±0.12
БХШ 310+БСА	84.0±3.7	25.9±0.5	3.24±0.12	2.11±0.11

Митохондрии гороха, кукурузы и пшеницы после 60 мин инкубации в среде ресуспендирования с добавлением 0.5% БСА имели более высокую величину коэффициента ДК, чем контрольные митохондрии (табл. 17). Дыхание в состоянии 4 в присутствии БСА было ниже, чем в контроле и составляло 25% у гороха и кукурузы и 23% у пшеницы от дыхания, связанного с фосфорилированием. Эти данные позволяют сделать вывод, что присутствие БСА в среде инкубации оказывало

сопрягающее действие на митохондрии всех исследованных видов растений.

Инкубация митохондрий всех видов растений в течение 60 мин в присутствии БХШ 310 на фоне БСА сопровождалась значительными изменениями параметров сопряженности по сравнению с вариантом «в присутствии БСА» - на фоне увеличения скорости нефосфорилирующего дыхания наблюдали падение коэффициента ДК (табл. 17). Наибольшая степень разобщения дыхания и фосфорилирования была отмечена при добавлении БХШ 310 на фоне БСА к митохондриям гороха (уменьшение коэффициента ДК на 43%) и кукурузы (уменьшение коэффициента ДК на 36%). Менее выраженный эффект БХШ 310 на фоне БСА оказывал на митохондрии пшеницы (уменьшение коэффициента ДК на 22%). При этом необходимо отметить, что если у митохондрий озимой пшеницы разобщающее действие БХШ 310 на фоне БСА было на 16% ниже, чем в отсутствие БСА, то влияние БХШ 310 на митохондрии гороха и кукурузы в присутствии БСА было выше на 4 и 7%, соответственно. Таким образом, БХШ 310 в присутствии БСА оказывает разобщающее влияние на митохондрии всех исследованных видов растений.

12.4 Влияние иммунохимически родственных БХШ 310 белков ряда злаков на энергетическую активность митохондрий озимой пшеницы

Принимая во внимание приведенные выше результаты, которые свидетельствуют о том, что БХШ 310 из озимой ржи оказывает разобщающий эффект на митохондрии разных видов растений, представлялось интересным изучить влияние белков иммунохимически родственных БХШ 310, полученных из разных видов растений, на митохондриальную активность одного вида растений (озимой пшеницы). Это позволило бы установить, зависит ли разобщающее действие БХШ 310 от нативной структуры и комбинации субъединиц.

Во всех полученных при помощи аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованной

антисывороткой против БХШ 310 препаратах присутствовали иммунохимически родственные БХШ 310 белки с мол. массами 230 кДа, около 140 кДа и субъединицы с мол. массами 56 и 66 кДа. В то же время в препарате из пырейника сибирского присутствовал ряд белков с мол. массами 330-380 кДа. В препарате белков из пшеницы содержание собственно БХШ 310 было низким ввиду длительности процесса аффинной хроматографии и высокой лабильности данного белка. В препарате белков, выделенных из ржи, сохранялось высокое содержание БХШ 310.

Сравнительный анализ влияния иммунохимически родственных БХШ 310 белков, полученных с помощью аффинной хроматографии из озимой ржи и пшеницы, кукурузы и пырейника сибирского показал значительные различия в их влиянии на митохондриальную активность. Только при добавлении к митохондриям белков семейства БХШ 310 из озимой ржи уже через 30 мин инкубации наблюдали резкое увеличение скорости нефосфорилирующего дыхания (на 42%) и снижение величины ДК (на 25%) (табл. 18). Дальнейшая инкубация митохондрий с данными белками привела к постепенному снижению скорости поглощения кислорода в состоянии 4, но на фоне сниженной скорости фосфорилирующего дыхания сохранялось падение ДК (до 25% после 90 мин инкубации). Небольшое разобщающее действие на изолированные митохондрии озимой пшеницы оказывали белки кукурузы (табл. 18). Белки пшеницы и пырейника сибирского таким действием не обладали, наоборот, их влияние сводилось к незначительному повышению степени сопряженности процессов окисления и фосфорилирования.

Таким образом, при изучении влияния белков, иммунохимически родственных БХШ 310, явное разобщение вызывают только белки семейства БХШ 310 озимой ржи (Kolesnichenko et al., 2001i). Обращает на себя внимание тот факт, что препарат, состоящий из смеси всех иммунохимически родственных БХШ 310 белков, выделенных

из цитоплазмы озимой ржи при помощи аффинной хроматографии, обладает значительно более слабым эффектом разобщения по сравнению с собственно БХШ 310 (Kolesnichenko et al., 2001i). Поскольку ранее (Kolesnichenko et al., 1999) показано, что, кроме белка с мол. массой 310 кДа, в цитоплазме озимой ржи содержатся еще иммунохимически родственные ему белки с мол. массами 470, 230, три белка с мол. массой около 140 кДа и их отдельные субъединицы с мол. массами 66 и 56 кДа, мы можем предположить, что значительным разобщающим эффектом обладает только собственно БХШ 310, а остальные иммунохимически родственные ему белки не обладают, либо обладают гораздо более слабым разобщающим действием. Дополнительным подтверждением этому служит тот факт, что иммунохимически родственные БХШ 310 белки, выделенные при помощи аффинной хроматографии из пырейника сибирского, в спектре белков которого отсутствует собственно БХШ 310, а имеется ряд родственных ему белков с мол. массами 380 – 320 кДа, не обладали эффектом разобщения дыхания и фосфорилирования (Kolesnichenko et al., 2001i).

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что добавление БХШ 310 к инкубируемым *in vitro* в условиях гипотермии митохондриям вызывает у них резкое разобщение процессов окисления и фосфорилирования уже через 5 мин инкубации. Присутствие в среде инкубации митохондрий БСА в концентрации, связывающей эндогенные жирные кислоты, не оказывает влияния на разобщающий эффект БХШ 310. Этот факт позволяет сделать вывод, что механизм разобщающего действия БХШ 310 отличается от механизма действия известных разобщающих растительных белков и не связан с циклическим оборотом жирных кислот через внутреннюю мембрану митохондрий. На основании различий в разобщающей активности очищенного БХШ 310 и препаратов иммунохимически родственных ему белков можно предполагать, что среди белков данного семейства только

БХШ 310 оказывает разобщающее действие на митохондрии, при этом БХШ 310 оказывает разобщающее действие на митохондрии всех изученных видов растений - как однодольных (рожь, пшеница, кукуруза), так и двудольных (горох).

Таблица 18

Влияние белков, иммунохимически родственных БХШ 310 на активность митохондрий озимой пшеницы (в соотношении 0.5 мг добавленного белка на 1 мг митохондриального белка) во время их инкубации при 0°. Субстрат окисления: 10 мМ малат+ 10 мМ глутамат. $M \pm m$, n=6.

Инкубация, мин	Потребление кислорода, нмоль O ₂ / мин/мг белка		Дыхательный контроль	Отношение АДФ:О
	Состояние 3	Состояние 4		
Контроль				
30	77.8±4.7	25.5±1.5	3.04±0.21	2.20±0.12
60	77.3±2.9	27.5±1.5	2.81±0.20	2.25±0.19
90	75.6±1.8	27.0±1.8	2.80±0.17	2.09±0.06
Белки семейства БХШ 310 из озимой ржи				
30	79.7±3.7	36.1±2.2	2.28±0.29	2.01±0.09
60	72.9±6.2	33.6±2.8	2.16±0.13	1.99±0.18
90	63.2±4.9	30.2±2.7	2.10±0.27	1.94±0.18
Белки семейства БХШ 310 из кукурузы				
30	76.8±3.0	29.5±1.2	2.61±0.01	1.91±0.13
60	75.5±4.1	29.8±2.3	2.55±0.17	2.07±0.16
90	67.6±3.3	29.7±1.8	2.29±0.13	2.00±0.17
Белки семейства БХШ 310 из пшеницы				
30	76.4±5.8	26.3±1.7	2.90±0.16	2.06±0.16
60	74.6±7.5	23.9±1.0	3.11±0.14	1.91±0.07
90	73.3±7.7	25.4±2.0	2.87±0.23	2.01±0.20
Белки семейства БХШ 310 из пырейника сибирского				
30	73.4±6.1	25.0±1.4	2.91±0.09	2.26±0.12
60	67.2±5.1	23.1±2.0	2.84±0.14	2.31±0.19
90	63.6±5.8	26.2±2.7	2.42±0.16	2.28±0.21

13 ВЛИЯНИЕ ПРЕЦИПИТАЦИИ ЭНДОГЕННОГО БХШ 310 АНТИСЫВОРОТКОЙ ПРОТИВ ЭТОГО БЕЛКА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ

Хотя при изучении спектров полипептидов митохондриальных мембран в них были обнаружены белки, иммунохимически родственные субъединицам БХШ 310, ряд фактов, в частности, быстрая ассоциация цитоплазматического БХШ 310 с митохондриями во время низкотемпературного стресса, а также быстрая элиминация субъединиц БХШ 310 из спектра митохондриальных полипептидов при обработке митохондрий проназой Е, либо при дальнейшей инкубации митохондрий без БХШ 310, позволили предполагать, что функционально активный белок БХШ 310 локализован снаружи митохондрий. В этом случае можно предположить, что обработка митохондрий антисывороткой против БХШ 310, которая преципитирует этот белок, будет оказывать влияние на энергетическую активность митохондрий и увеличивать степень сопряженности окисления и фосфорилирования.

Для проверки этого предположения были проведены эксперименты по изучению влияния антисыворотки против БХШ 310 на энергетическую активность митохондрий, изолированных из стрессированных и нестрессированных проростков как ряда различающихся по холодостойкости злаков, так и двудольных растений.

13.1 Влияние преципитации эндогенного БХШ 310 антисывороткой против этого белка на энергетическую активность митохондрий, изолированных из стрессированных проростков

Поскольку, как показано выше, инкубация митохондрий с БХШ 310 в условиях низкотемпературного стресса приводит к быстрой его ассоциации с митохондриями, а с другой стороны, известно, что преципитация белков соответствующими антисыворотками приводит к потере их функциональной активности, было предположено, что, если

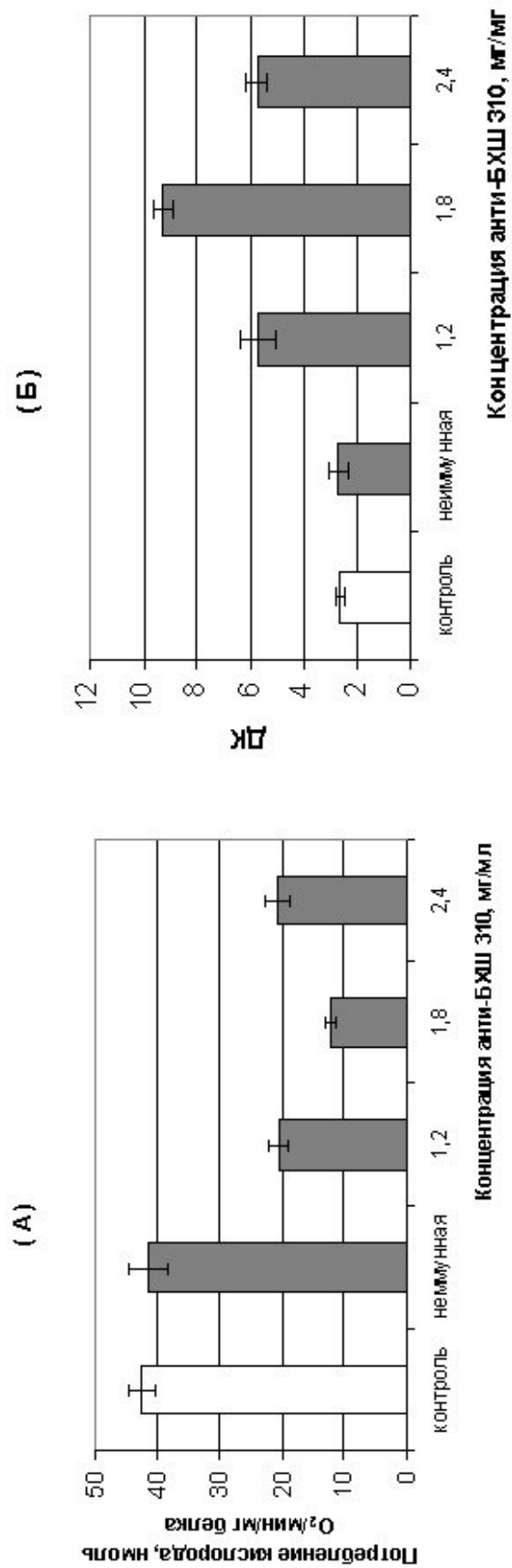


Рис. 44. Влияние добавления в ячейку полярографа к митохондриям, изолированным из стрессированных при -1°C в течение 1 часа проростков озимой ржи, неймунной антисыворотки и антисыворотки против стрессового белка БХШ 310 на скорость в состоянии 4 (А) и коэффициент дыхательного контроля (Б).

БХШ 310 локализован снаружи митохондрий, то его преципитация путем добавления антисыворотки приведет к увеличению степени сопряжения митохондрий.

Для определения энергетической активности использовались свежевыделенные митохондрии озимой пшеницы. В качестве второго контроля была использована неиммунная антисыворотка, полученная от неиммунизированных кроликов. Добавление 1.8 мг неиммунной антисыворотки на 0.7 мг митохондриального белка не вызывало значительного изменения их энергетической активности (рис. 44). Скорость нефосфорилирующего дыхания и коэффициент дыхательного контроля по Chance-Williams не менялись после добавления неиммунной антисыворотки в полярографическую ячейку (рис. 44) (Kolesnichenko et al., 2001c).

Добавление антисыворотки против БХШ 310 к инкубируемым в состоянии 4 митохондриям, изолированным из стрессированных проростков озимой пшеницы, вызвало значительное падение скорости нефосфорилирующего дыхания (состояние 4) и резкое увеличение коэффициента дыхательного контроля (рис. 44). При этом, если увеличение концентрации добавленной антисыворотки с 1.2 до 1.8 мг/мл среды инкубации вызывало уменьшение скорости дыхания в состоянии 4 и рост дыхательного контроля, то дальнейшее увеличение концентрации антисыворотки с 1.8 до 2.4 мг/мл среды инкубации не вызывало таких изменений, а, напротив, даже несколько ослабляло эффект антисыворотки (рис. 44) (Kolesnichenko et al., 2001c).

Известно, что добавление к митохондриям антисыворотки против низкомолекулярных белков теплового шока, локализованных в матриксе митохондрий, не оказывает влияние на функционирование этих белков во время теплового шока (Downs, Neckathorn, 1998). Таким образом, факт влияния антисыворотки против БХШ 310 на энергетическую активность митохондрий во время

низкотемпературного стресса подтверждает то, что разобщение окисления и фосфорилирования вызывает ассоциированный с митохондриями БХШ 310, который локализован снаружи митохондрий. Факт влияния антисыворотки против БХШ 310 на энергетическую активность митохондрий позволяет также тестировать митохондрии на наличие ассоциированного с ними БХШ 310.

13.2 Влияние преципитации эндогенного БХШ 310 антисывороткой против этого белка на энергетическую активность митохондрий, изолированных из нестрессированных проростков

Из-за сильной и быстрой индукции БХШ 310 во время холодового стресса и установленного быстрого – в течение 5 минут – начала разобщающего действия БХШ 310 на митохондрии было предположено, что во время выделения растительных митохондрий даже из нестрессированных растений этот стрессовый белок ассоциирует с митохондриями из-за охлаждения растительного материала во время выделения, и что добавление анти-БХШ 310 антисыворотки к инкубируемым *in vitro* митохондриям может преципитировать этот разобщающий белок и ослаблять разобщающую активность БХШ 310, ассоциировавшего с митохондриями во время процедуры их выделения.

Для определения энергетической активности использовались свежевыделенные митохондрии озимой ржи, озимой пшеницы, кукурузы и гороха. Самые высокие значения коэффициента дыхательного контроля были отмечены у митохондрий кукурузы. Самые низкие значения коэффициента дыхательного контроля и, следовательно, самая высокая степень разобщения окисления и фосфорилирования были у митохондрий озимой ржи. Добавление 1.8 мг неиммунной антисыворотки на 0.7 мг митохондриального белка не вызывало значительного изменения их энергетической активности. Скорость нефосфорилирующего дыхания и коэффициент дыхательного контроля по Chance-

Williams не менялись после добавления неиммунной антисыворотки в полярографическую ячейку (табл. 19).

В то же время добавление 0.8 мг анти-БХШ 310 антисыворотки в ячейку полярографа к находящимся в состоянии 4 митохондриям (0.7 мг митохондриального белка) вызвало значительное уменьшение уровня нефосфорилирующего дыхания и увеличение коэффициента дыхательного контроля у злаков (табл. 14). Особенно высокое увеличение дыхательного контроля было отмечено у митохондрий кукурузы. Напротив, добавление анти-БХШ 310 антисыворотки к митохондриям гороха не вызвало изменений коэффициента дыхательного контроля (табл. 19) (Kolesnichenko et al., 2001c).

Как показано ранее, БХШ 310 и иммунохимически родственные ему белки обнаружены у некоторых видов злаков (Kolesnichenko et al., 1999). При этом показано, что содержание БХШ 310 различается у исследованных видов злаков. Наиболее высокая концентрация БХШ 310 была установлена в цитоплазматических белках озимой ржи. У озимой пшеницы было отмечено более низкое содержание БХШ 310. У кукурузы среди цитоплазматических белков обнаруживались только более низкомолекулярные иммунохимически родственные БХШ 310 белки, а БХШ 310 обнаружен только в митохондриях. В связи с этими данными можно предположить, что добавленное к митохондриям ограниченное количество антисыворотки оказалось в состоянии преципитировать практически весь БХШ 310 в митохондриях кукурузы. Соответственно, у них наблюдались наиболее сильное уменьшение скорости дыхания в состоянии 4 и максимальное возрастание коэффициента дыхательного контроля (табл. 19). У озимой пшеницы добавленное количество антисыворотки оказалось в состоянии преципитировать только часть митохондриального БХШ 310, соответственно, и эффект ее добавления был меньше (табл. 19). У озимой ржи, содержащей наибольшее количество БХШ

Таблица 19

Влияние антисыворотки против БХШ 310 на скорость нефосфорилирующего дыхания и дыхательный контроль митохондрий некоторых видов растений. Субстрат окисления – 10 мМ малаг. $M \pm m$, $n=6$

Виды	Скорость дыхания в состоянии 3*	Скорость дыхания в состоянии 4*			Дыхательный контроль		
		Без добавок	С неиммунной сывороткой	С сывороткой против БХШ 310	Без добавок	С неиммунной сывороткой	С сывороткой против БХШ 310
Кукуруза	86,62±6,33	19,25±2.91	18,84±2.05	12,37±2.62	4,50±0.23	4,59±0.20	7,00±0.29
Рожь	81,43±4.07	32,04±3.55	30,24±3.71	22,69±2.88	2,54±0.13	2,69±0.14	3,59±0.21
Пшеница	102,12±8.98	26,64±2.34	26,64±2.55	21,47±2.14	3,83±0.18	3,83±0.16	4,76±0.25
Горох	71,41±3,57	19,56±2.78	19,45±2.25	19,56±2.05	3,65±0.15	3,67±0.18	3,65±0.16

* нмоль O_2 /мин/мг белка

310, добавленные антитела преципитировали только небольшую часть этого белка, поэтому эффект добавления антисыворотки был самым низким (табл. 19).

В виду отсутствия эффекта при добавления антисыворотки против БХШ 310 к митохондриям гороха, можно сделать вывод об отсутствии иммунохимически родственных БХШ 310 белков с разобщающей активностью в проростках гороха (табл. 19) (Kolesnichenko et al., 2001c).

Для того, чтобы определить, зависит ли действие анти-БХШ 310 антисыворотки от количества добавленных к митохондриям антител, был проведен эксперимент по добавлению к инкубируемым в ячейке полярографа митохондриям озимой ржи различных количеств анти-БХШ 310 антисыворотки. Полученные результаты показывают, что сопрягающий эффект антисыворотки возрастает с увеличением ее добавляемого количества (рис. 45).

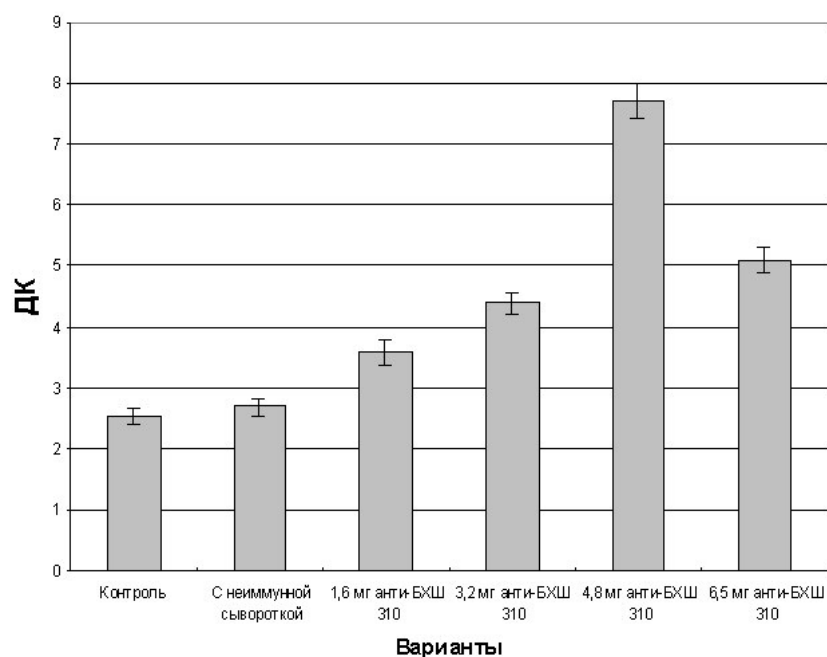


Рис. 45. Влияние количества добавленной к митохондриям анти-БХШ 310 антисыворотки на дыхательный контроль митохондрий озимой ржи.

Наиболее высокое сопряжение окисления и фосфорилирования было отмечено при добавлении 4.8 мг антисыворотки к инкубируемым в состоянии 4 митохондриям (рис. 45). Усиление эффекта сопряжения с увеличением количества добавленной антисыворотки показывает, что в ходе экспериментов наблюдается преципитация БХШ 310,

ассоциированного с инкубируемыми митохондриями и вызывающего эффект разобщения окисления и фосфорилирования (Kolesnichenko et al., 2001c).

Известно, что все «классические» разобщающие белки растений и животных принадлежат к семье митохондриальных переносчиков анионов (Jezek et al., 1998). Следовательно, их активность *in vitro* зависит от присутствия свободных жирных кислот в среде инкубации митохондрий (Jezek et al., 1998). Известно также, что БСА, эффективно связывающий жирные кислоты, является ингибитором всех «классических» растительных разобщающих белков (Palou et al., 1998). Если предположить, что БХШ 310 функционирует так же, как и другие известные разобщающие белки, то следовало бы ожидать, что добавление БСА в среду инкубации митохондрий удалило бы свободные жирные кислоты из среды инкубации и элиминировало разобщающий эффект БХШ 310. Следовательно, добавление БСА в среду инкубации вызвало бы уменьшение сопрягающего эффекта анти-БХШ 310 антисыворотки. Для выяснения этого вопроса были проведены эксперименты с последовательным добавлением к находящимся в состоянии 4 митохондриям БСА в концентрации, вызывающей полное ингибирование разобщающей активности всех известных разобщающих растительных белков, и анти-БХШ 310 антисыворотки в наиболее эффективной концентрации. Полученные данные показывают, что сопрягающий эффект добавления анти-БХШ 310 антисыворотки не зависит от присутствия БСА в среде инкубации (табл. 20). Эти данные подтверждают, что разобщающее действие БХШ 310 не зависит от присутствия свободных жирных кислот в среде инкубации. Таким образом, можно предположить, что механизм разобщающего действия БХШ 310 в митохондриях отличен от чистой протонофорной активности (Jezek et al., 1998) других известных разобщающих белков.

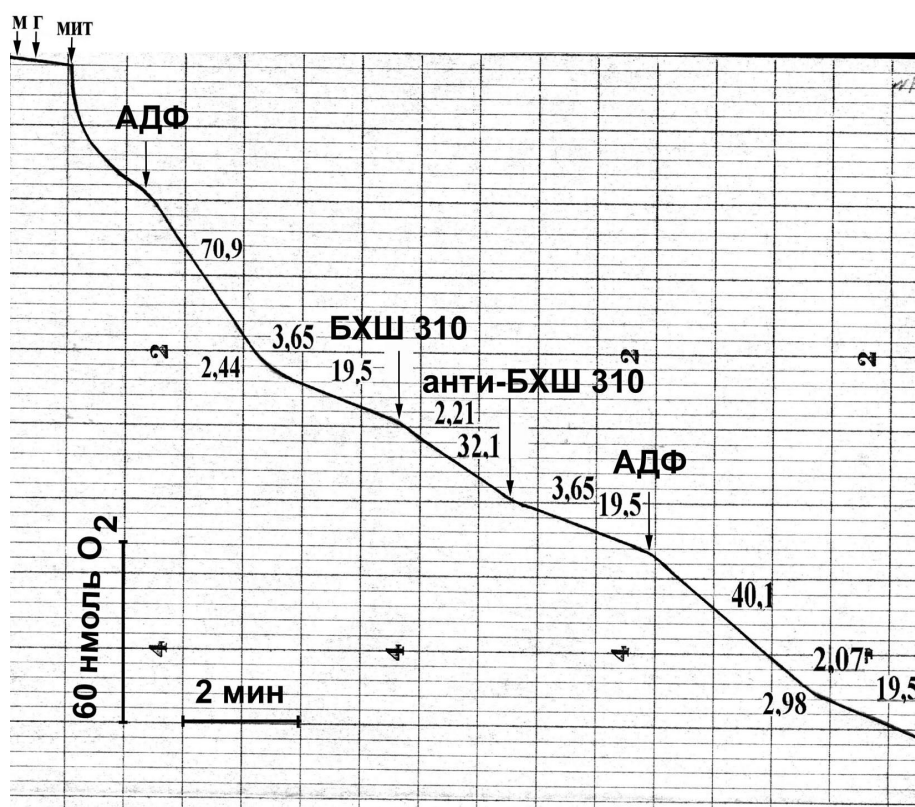


Рис. 46. Энергетическая активность митохондрий гороха. Над кривой указана скорость поглощения кислорода (нмоль O_2 /мин/мг митохондриального белка) и коэффициент ДК, под кривыми – отношение АДФ:О. М-малат (10 мМ), Г-глутамат (10 мМ), Мит – митохондрии. Стрелками обозначены моменты внесения: БХШ 310 (0.3 мг на мл среды инкубации); анти-БХШ 310 – антисыворотки против БХШ 310 (0.6 мг на мл среды инкубации) и АДФ (200 мкМ).

Таблица 20

Влияние БСА на эффект антисыворотки против БХШ 310 на митохондрии озимой ржи. Субстрат окисления: 10 мМ малат + 10 мМ глутамат.

$M \pm m$, $n=6$

Скорость * дыхания в состоянии 3	Скорость * дыхания в состоянии 4			Дыхательный контроль		
	Без добавок	4 мг БСА	4 мг БСА и 4.8 мг анти- БХШ 310	Без добавок	4 мг БСА	4 мг БСА и 4.8 мг анти- БХШ 310
81,43±4.07	32,04±3.55	16,89±2.91	9,22±1.89	2,54±0.13	4,82±0.21	8,83±0.19

* - нмоль O_2 /мин/мг белка

Предположение, что разобщение при добавлении БХШ 310 является результатом функционирования именно

стрессового белка БХШ 310, и что это разобщение может быть элиминировано добавлением антисыворотки против БХШ 310, преципитирующей данный белок, было подтверждено в модельном эксперименте с митохондриями гороха (Войников и др., 2001a). Добавление БХШ 310 к изолированным митохондриям гороха вызывало увеличение скорости нефосфорилирующего дыхания и падение ДК (рис. 46), что свидетельствует о переходе митохондрий в низкоэнергетическое состояние. Последующее добавление специфической сыворотки устраняло разобщающий эффект БХШ 310, показатели скорости нефосфорилирующего дыхания и коэффициента ДК возвращались к значениям, которые были у митохондрий до добавления БХШ 310 (рис. 46). Обобщая данные экспериментов с применением антител на БХШ 310 можно сделать вывод, что разобщение окисления и фосфорилирования является результатом функционирования БХШ 310 и что это разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях обратимо.

Таким образом, полученные данные показывают существование в митохондриях знаков разобщающего эффекта стрессового белка БХШ 310, который может быть элиминирован добавлением антисыворотки против БХШ 310. Они также подтверждают предположение, что механизм разобщающего действия БХШ 310 не зависит от присутствия свободных жирных кислот в среде инкубации.

14 ВЛИЯНИЕ БХШ 310 И АНТИСЫВОРОТКИ ПРОТИВ БХШ 310 НА ГЕНЕРАЦИЮ ТЕПЛА МИТОХОНДРИЯМИ И ПРОРОСТКАМИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Ранее было показано, что во время низкотемпературного стресса проростки морозоустойчивых озимых злаков генерируют тепло, и за счет этого в течение первых 20 – 30 минут могут поддерживать свою температуру выше 0°C (Войников, Корзун, 1984; Vojnikov et al., 1984). Поскольку как инкубация изолированных растительных митохондрий со

стрессовым разобшающим белком БХШ 310, так и добавление его к митохондриям в полярнографическую ячейку в установившемся состоянии 4 вызывают увеличение скорости нефосфорилирующего дыхания, то представляется интересным установить, направляется ли эта вырабатываемая митохондриями энергия на выработку тепла.

Для выяснения этого вопроса был проведен эксперимент, в ходе которого измерялась разность температур между двумя ячейками с инкубируемыми митохондриями озимой пшеницы. Измерение разницы температур между термоизолированными ячейками объемом 1 мл проводилось при помощи термопары медь-константан, изготовленной из проволоки диаметром 0.1 мм. Регистрирующим прибором служил высокочувствительный микровольтметр (Германия). Точность регистрации составляла 0.025°C . В первой серии опытов в контрольной ячейке прибора инкубировали митохондрии озимой пшеницы без добавок, а в опытной - митохондрии озимой пшеницы с добавлением 0.5 мг БХШ 310 на 1 мг митохондриального белка. Во второй серии опытов в «контрольной» ячейке также инкубировали митохондрии озимой пшеницы без всяких добавок, а в «опытной» ячейке инкубировали митохондрии с добавлением наиболее активной концентрации (3.2 мг/мл) антисыворотки против БХШ 310. Перед внесением в ячейки суспензию митохондрий и среды инкубации термостатировали. Отсчет разницы температур между ячейками прибора снимали каждые 30 секунд.

Результаты экспериментов показывают, что как БХШ 310, так и сыворотка против БХШ 310 оказывают определенное влияние на разность температур между «контрольной» и «опытной» ячейкой (рис. 47). Если при добавлении в «опытную» ячейку БХШ 310 наблюдался, начиная с 3-х минут инкубации митохондрий, рост температуры в «опытной» ячейке, достигающий к 10 минутам инкубации 0.5°C , то при добавлении в «опытную» ячейку

антисыворотки против БХШ 310 в ней отмечалось падение температуры, достигающее 0.6°C .

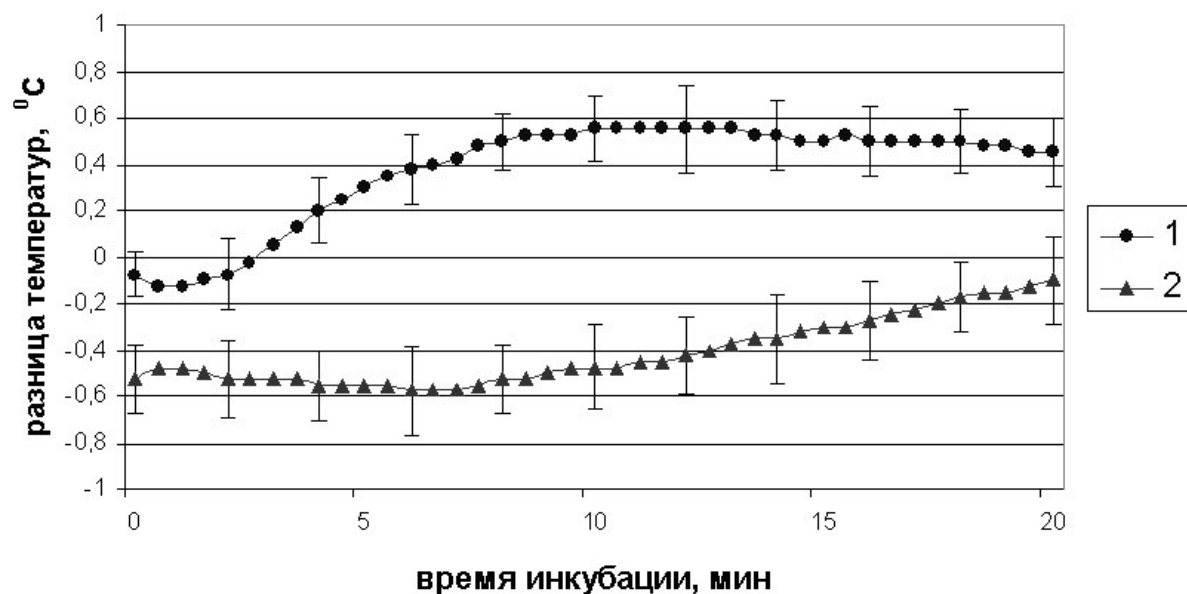


Рис. 47. Разница температур между митохондриями, инкубируемыми с БХШ 310 и антисывороткой против БХШ 310, и контрольными митохондриями. 1 – разница температур между ячейкой с добавлением БХШ 310 и ячейкой без добавок; 2 - разница температур между ячейкой с добавлением антисыворотки против БХШ 310 и ячейкой без добавок.

При этом, если при добавлении в «опытную» ячейку БХШ 310 разница температур между «опытной» и «контрольной» ячейками к концу эксперимента снижается незначительно (до 0.4°C), то при добавлении в нее антисыворотки против БХШ 310 после 8 минут инкубации митохондрий наблюдается уменьшение разницы температур между ячейками.

Изучение влияния БХШ 310 на разность температур между ячейками на фоне добавления 10 мМ KCN показало, что в этом варианте опыта БХШ 310 не вызывал повышения температуры в «опытной» ячейке (рис. 48). Таким образом, БХШ 310 не является активатором цианидрезистентного дыхания.

Полученные в этом эксперименте результаты хорошо соответствуют полученным ранее данным о влиянии БХШ 310 и сыворотки против БХШ 310 на изолированные митохондрии озимой пшеницы. Действительно, если при добавлении к митохондриям БХШ 310 наблюдается увеличение

нефосфорилирующего дыхания (Voinikov et al., 1998), то в данном эксперименте отмечается и увеличение генерации тепла митохондриями.

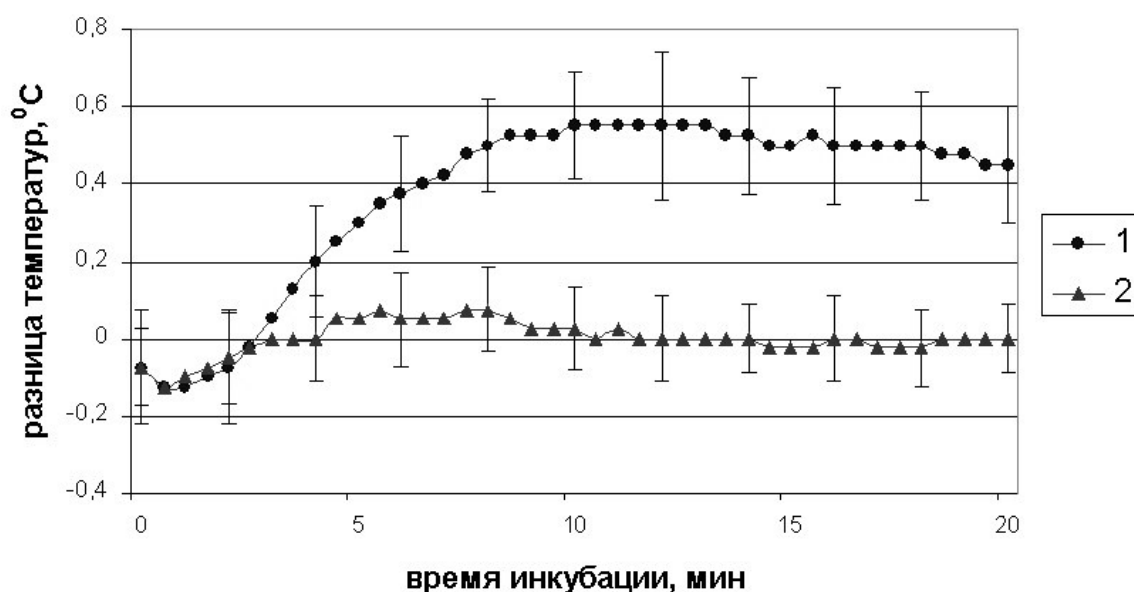


Рис. 48. Влияние KCN на разницу температур между митохондриями, инкубируемыми с БХШ 310, и контрольными митохондриями. 1 – разница температур между ячейкой с добавлением БХШ 310 и ячейкой без добавок; 2 – разница температур между ячейкой с добавлением БХШ 310 и 10 мМ KCN и ячейкой с добавлением 10 мМ KCN.

Если же при добавлении к митохондриям антисыворотки против БХШ 310 отмечалось резкое снижение скорости нефосфорилирующего дыхания (рис. 44), то в этом эксперименте был установлен факт резкого снижения выработки тепла митохондриями, инкубируемыми с антисывороткой против БХШ 310.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что эффект разобщения окисления и фосфорилирования в митохондриях, вызываемый добавлением экзогенного БХШ 310, сопровождается термогенезом. В совокупности с приведенными выше данными, эти результаты также позволяют предположить, что термогенез, наблюдаемый в проростках морозостойких озимых злаков (Vojnikov et al., 1984), частично обусловлен действием БХШ 310 *in vivo*.

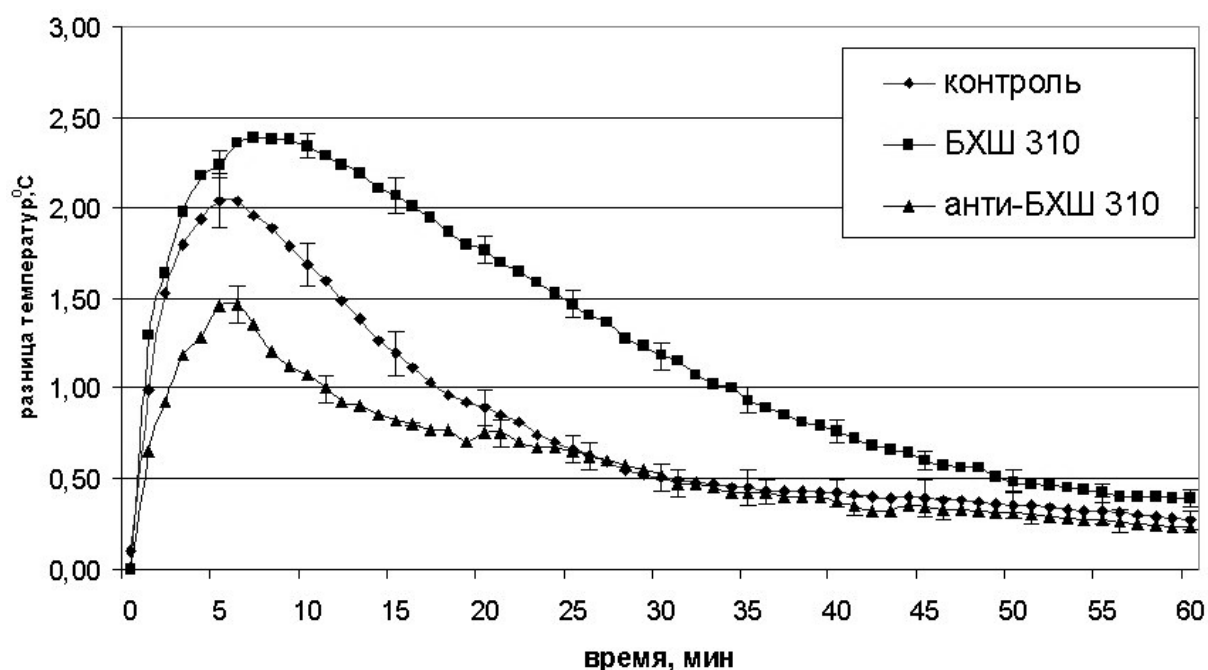


Рис. 49. Разница температур между инфильтрованными водой и убитыми (контроль), инфильтрованными БХШ 310 и убитыми (БХШ 310) и инфильтрованными антисывороткой против БХШ 310 и убитыми (анти-БХШ 310) побегами проростков озимой пшеницы сорта «Иркутская озимая».

Поскольку БХШ 310 вызывал увеличение генерации тепла в изолированных митохондриях озимой пшеницы, то представляло интерес изучить влияние инфильтрации стрессовым белком БХШ 310 и антисывороткой против него на генерацию тепла проростками озимой пшеницы во время низкотемпературного стресса. Результаты опытов свидетельствуют, что в отличие от инфильтрации побегов неиммунной сывороткой, не оказывавшей влияние на разницу температур (Kolesnichenko et al., 2003), инфильтрация побегов проростков озимой пшеницы антисывороткой против стрессового белка БХШ 310 подобно их инфильтрации прокаином и KCN (Войников, Корзун, 1984; Vojnikov et al., 1984), вызывала уменьшение разницы температур между живыми и убитыми проростками (рис. 49). При этом наиболее выраженный эффект инфильтрации антисывороткой отмечался в первые 20 минут холодового шока. После 20 минут холодового шока влияние антисыворотки снижалось и

после 30 мин исчезало. В ходе экспериментов было также установлено, что инфильтрация побегов проростков озимой пшеницы стрессовым белком БХШ 310 вызывала увеличение разницы температур между живыми и убитыми проростками с 2 до 2.5°C в первые 20 минут холодового шока и значительно удлиняло период действия термогенеза вплоть до 40 минут холодового шока (рис. 49).

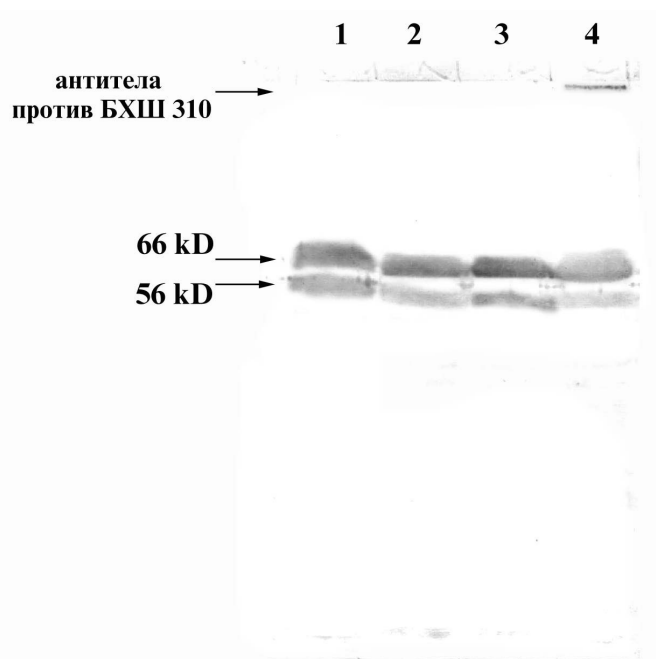


Рис. 50. Вестерн-блоттинг цитоплазматических белков контрольных проростков озимой пшеницы (1), белков стрессированных проростков озимой пшеницы (2), белков проростков озимой пшеницы, инфильтрованных БХШ 310 (3) и белков проростков озимой пшеницы, инфильтрованных антисывороткой против БХШ 310 (4).

Вестерн-блоттинг белков инфильтрованных БХШ 310 и антисывороткой против этого белка проростков показал увеличение содержания субъединиц БХШ 310 при инфильтрации проростков стрессовым белком БХШ 310 и уменьшение содержания субъединиц БХШ 310 и появление в спектре белков полосы антисыворотки против БХШ 310 при инфильтрации проростков антисывороткой против этого стрессового белка (рис. 50). Противоположность влияния инфильтрации БХШ 310 и антисыворотки против этого белка на разницу температур между живыми и убитыми проростками озимой пшеницы во время низкотемпературного стресса позволяют сделать вывод, что влияние антисыворотки против БХШ 310 на термогенез в проростках озимой пшеницы не является артефактом, но происходит по причине

элиминации антисывороткой разобщающего эффекта БХШ 310 и вызываемого им термогенеза.

15 ВЛИЯНИЕ БХШ 310 НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

Повреждения при охлаждении, как и при замерзании, частично обусловлены действием свободных радикалов кислорода как агентов, вызывающих вторичные повреждения в мембранах и фотосистемах (Владимиров, Арчаков, 1972; Жиров, 1982; Куликов и др., 1988; Мерзляк, 1989; Барабой, 1991; Барабой и др., 1992; Kendall, McKersie, 1989). С одной стороны, предполагается, что активация кислорода фотосистемами при интенсивном свете является основным сайтом образования свободных радикалов в листьях (Parkin et al., 1989). В то же время другие электронно-транспортные системы, включая системы в митохондриях или плазмалемме, также могут производить активные формы кислорода, особенно в нефотосинтезирующих тканях.

Действительно, в нормально функционирующих митохондриях освобождение АФК во время восстановления кислорода цитохром с оксидазой не происходит в связи с его высоким сродством к цитохрому с (Turrens, 1997). Ввиду этого образование супероксида путем одноэлектронного восстановления кислорода на уровне цитохром с оксидазы незначительно. Однако в последнее время получено значительное количество данных, свидетельствующих о том, что митохондрии постоянно генерируют супероксид и перекись водорода (1-2% от общего потребления кислорода дыхательной цепи митохондрий) (Скулачев, 1998; Richter et al., 1995, Turrens, 1997; Liu, 1997; Kowaltowski, Vercesi, 1999). Генерация этой активной формы кислорода происходит при участии НАДН-дегидрогеназы (Turrens, Boveris, 1980), флавопротеина (комплекс I) и частично убихинона и цитохрома *b* (комплекс III) (Cadenas et al., 1977). В нормально функционирующей дыхательной цепи электроны переносятся от НАДН к окисленной форме убихинона, при этом образуются

восстановленные формы убихинона. Эта форма затем передает электроны на цитохром с оксидазу и вновь превращается в окисленную форму, проходя через форму аниона свободного радикала - семихинона ($UQ^{\bullet-}$) (Побежимова, Войников, 1999). Этот процесс вначале происходит на цитоплазматической поверхности внутренней митохондриальной мембраны, а затем повторяется на матриксной поверхности мембраны. Антимицин А, который блокирует электронный поток после убихинона, усиливает образование активных форм кислорода (Rustin et al., 1984). При этом антимицин А блокирует образование $UQ^{\bullet-}$ на матриксной поверхности мембраны, что вызывает аккумуляцию $UQ^{\bullet-}$ на ее цитоплазматической поверхности (Побежимова, Войников, 1999; Turrens et al., 1985). Вероятно, другие условия, которые увеличивают восстановленность убихинона, также благоприятствуют образованию активных форм кислорода в районе цепи убихинон - цитохром *b* (Rich, Bonner, 1978). Имеются данные, что образование митохондриями АФК в присутствии ротенона, который переводит НАДН-дегидрогеназу в восстановленное состояние, значительно стимулируется при добавлении сукцината, восстанавливающего убихинон (Kowaltowski et al., 1995). Различные Fe-S белки и НАДН- дегидрогеназа также вовлечены в образование супероксида и перекиси водорода (Turrens, Boveris, 1980; Turrens et al., 1982). В митохондриях, обладающих высокой интенсивностью цианид-резистентного дыхания, эффективность образования $O_2^{\bullet-}$ может достигать значительных величин (10% от общего потребления кислорода в митохондриях у аронника пятнистого) (Rustin et al., 1984). Интересно заметить, что митохондрии дрожжей во время дыхания также являются одним из основных источников АФК (Halliwell, Chirico, 1993). При этом, исследования *in vitro* показали, что митохондрии являются основным источником супероксида в клетке, и что комплекс III дыхательной цепи

может быть ответственен за образование более чем 80% АФК в клетках дрожжей (Chance et al., 1979; Boveris, Cadenas, 1982).

При физиологических условиях, кроме геминового железа и железа в форме FeS-белков, в митохондриях содержится еще приблизительно 1.7 нмоль ионов Fe в расчете на 1 мг митохондриального белка. Эти ионы железа хелатированы такими веществами, как АТФ, АДФ, ГТФ и цитрат (Tangeras et al., 1980). Эти низкомолекулярные комплексы железа способны инициировать процесс ПОЛ в митохондриальной мембране и, как предполагается, принимают участие в механизмах повреждения клетки во время различных стрессовых состояний (Minotti, Aust, 1987; Bacon, Britton, 1990). Однако в то же время имеются данные, свидетельствующие о том, что генерация АФК в данном случае не зависит от функционирования дыхательной цепи митохондрий (Castilho et al., 1994, 1995).

Таким образом, в митохондриях имеется все необходимое для протекания процессов ПОЛ: источники активного кислорода, субстраты перекисного окисления - ненасыщенные жирные кислоты митохондриальных мембран. В митохондриях присутствует также и железо в геминовой и негеминовой форме. Следовательно, в условиях, когда генерация супероксида митохондриями возрастает, либо когда ослаблены антиоксидантные системы, в органеллах может накапливаться H_2O_2 , что может привести к развитию окислительного стресса, поскольку H_2O_2 может реагировать с митохондриальным Fe^{2+} , образуя высокоактивный радикал гидроксида (HO^\bullet) путем реакции Фентона (Sutton, Winterbourn, 1989; Halliwell, Gutteridge, 1989).

Действительно, установлено, что митохондрии являются основным источником супероксида в чувствительных к охлаждению растительных тканях при низких температурах (Purvis et al., 1995), при этом уровень генерации митохондриями супероксида изменяется в зависимости от

многих физиологических или стрессовых условий (Turrens, 1997).

Хотя у животных основной физиологической функцией UCP белков считается участие в терморегуляции посредством термогенеза (Ricquier, Bouillaud, 2000a), в то же время разобщающие белки выполняют в организме и другие функции в связи с защитой от стресса. В 1994 году В.П. Скулачевым (Skulachev, 1994) была выдвинута гипотеза о специальном механизме «мягкого» разобщения, которое достигается путем некоторого повышения протонной проводимости внутренней митохондриальной мембраны. В соответствии с этой гипотезой, когда потребление кислорода по пути фосфорилирующего дыхания тормозится из-за истощения АДФ и накопления АТФ, происходит увеличение внутриклеточной концентрации O_2 и накопление восстановленных переносчиков дыхательной цепи, которые атакуются кислородом с образованием супероксидного радикала. В данных условиях разобщение ускоряет потребление O_2 и тормозит генерацию $O_2^{\bullet-}$. Эта гипотеза нашла подтверждение в недавних исследованиях. В частности, установлено, что ингибирование растительного разобщающего белка PUMP в митохондриях клубней картофеля значительно увеличивает генерацию ими H_2O_2 (Kowaltowski et al., 1999). Также показано, что субстраты разобщающих белков, такие как линолевая кислота, снижают продукцию H_2O_2 митохондриями (Korshunov et al., 1999; Kowaltowski et al., 1999). Было также показано, что протонофоры и такие разобщающие белки, как UCP млекопитающих, PUMP и альтернативная оксидаза растений, способны при функционировании уменьшать образование АФК митохондриями (Boveris, Chance, 1973; Korshunov et al., 1997; Negre-Salvayre et al., 1997; Popov et al., 1997; Kowaltowski et al., 1998; Casolo et al., 2000; Jezek et al., 2001).

Таким образом, уровень генерации митохондриями супероксида изменяется в зависимости от многих

физиологических или стрессовых условий (Turrens, 1997). Как отмечалось выше, образование АФК усиливается при восстановлении убихинона в присутствии антимицина А (Kowaltowski et al., 1995; Turrens, 1997; Korshunov et al., 1997). Быстрое изменение редокс-состояния убихинона также стимулирует образование АФК митохондриями (Korshunov et al., 1997). Хотя разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях обычно уменьшает образование ими АФК (Guidot et al., 1995), при некоторых специфических условиях оно может возрасть. Например, протонофоры усиливают генерацию АФК при ингибировании дыхательной цепи антимицином А (Boveris, Chance, 1973; Cadenas, Boveris, 1980) или в том случае, когда в митохондриях заингибирован Ca^{2+} унипортер и блокированы потоки кальция (Kowaltowski et al., 1996a,b; Chakraborti et al., 1999). С другой стороны, свободные жирные кислоты и такие разобщающие белки как UCP млекопитающих, PUMP и альтернативная оксидаза растений способны при своем функционировании уменьшать образование АФК митохондриями (Korshunov et al., 1997; Boveris, Chance, 1973; Negre-Salvayre et al., 1997; Popov et al., 1997; Kowaltowski et al., 1998). Эти факты могут быть объяснены тем, что разобщение окисления и фосфорилирования усиливает митохондриальное дыхание, уменьшает время жизни семихинона и, следовательно, вероятность образования супероксида за счет передачи электрона от семихинона на кислород (Skulachev, 1996, 1998).

Следовательно, поскольку известные UCP-подобные разобщающие растительные белки оказывают влияние на процессы ПОЛ, то представляло интересным установить, влияет ли стрессовый белок БХШ 310, который также вызывает разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях во время низкотемпературного стресса (Побежимова и др., 1996), на процессы ПОЛ в митохондриях.

15.1 Влияние сыворотки против БХШ 310 и неиммунной сыворотки на спонтанное ПОЛ в изолированных митохондриях озимой пшеницы

Как свидетельствуют литературные данные, субстраты разобшающих белков, такие как линолевая кислота, снижают продукцию H_2O_2 митохондриями (Korshunov et al., 1999; Kowaltowski et al., 1999). Кроме того, известно, что ингибирование растительного разобшающего белка РУМР в митохондриях клубней картофеля значительно увеличивает генерацию ими H_2O_2 (Kowaltowski et al., 1998). В то же время установлено, что в митохондриях имеются эндогенный БХШ 310 и иммунохимически родственные ему белки и полипептиды (Kolesnichenko et al., 2000b). При этом показано, что ингибирование разобшающей активности БХШ 310 при помощи инкубации изолированных митохондрий с антисывороткой против этого стрессового белка вызывает сопряжение митохондрий (Kolesnichenko et al., 2001c). Эти данные позволяют предположить, что ингибирование функциональной активности БХШ 310 в митохондриях при помощи антисыворотки против этого белка будет также индуцировать реакции ПОЛ в митохондриях. В связи с этим было проведено изучение влияния антисыворотки против БХШ 310 на ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы. Определение первичных продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов ненасыщенных жирных кислот – проводили спектрофотометрически по методике (Стальная, 1977).

В ходе экспериментов по изучению влияния сыворотки против БХШ 310 на ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы установлено, что добавление антисыворотки в концентрации 1 мг на 1 мл среды инкубации вызывало достоверное (около 55%) повышение уровня спонтанного ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы (рис. 51). Таким образом, связывание эндогенного БХШ 310 при помощи антисыворотки, подобно ингибированию УСР-подобных растительных разобшающих белков, вызывает индукцию процессов ПОЛ в митохондриях.

При этом необходимо отметить, что добавление неиммунной сыворотки не оказывало заметного влияния на процессы ПОЛ в инкубируемых *in vitro* митохондриях (рис. 51). Эти результаты свидетельствуют о том, что индукция ПОЛ в данном случае является следствием ингибирования активности эндогенного БХШ 310 вследствие его связывания антисывороткой, а не следствием присутствия в среде инкубации сывороточных белков (Kolesnichenko et al., 2001d).

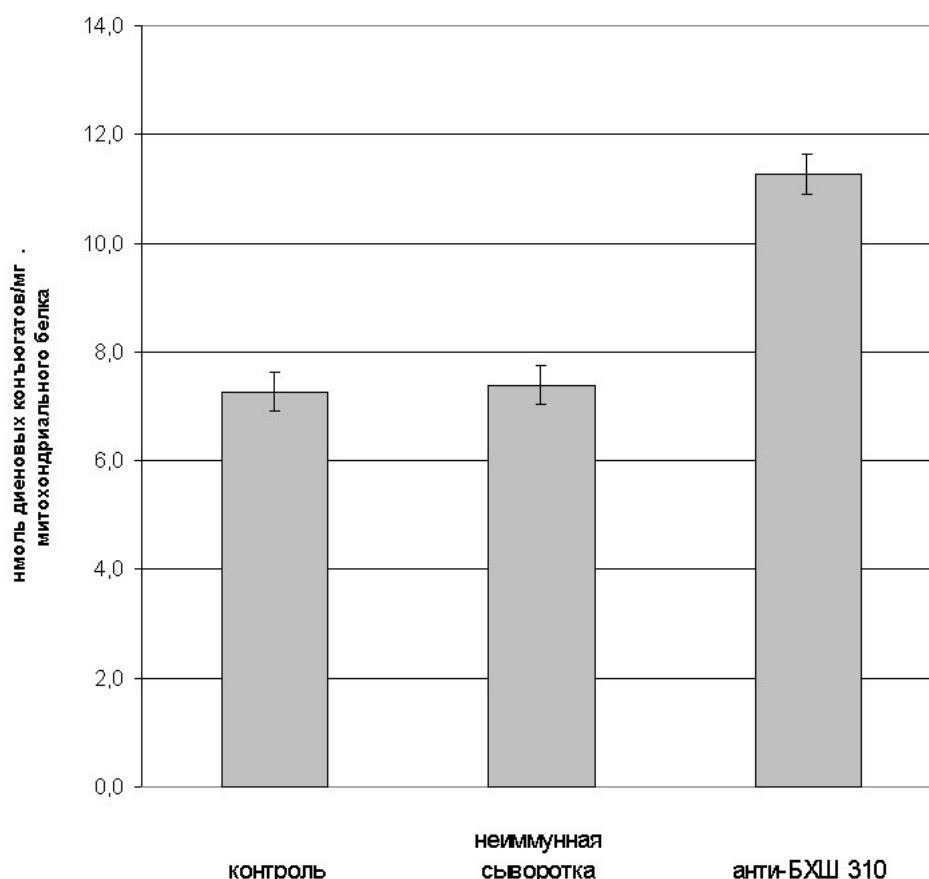


Рис. 51. Изучение влияния сыворотки против БХШ 310 и неиммунной сыворотки на спонтанное ПОЛ в изолированных митохондриях озимой пшеницы при инкубации в течение 40 мин при 27°C .

Следовательно, можно предположить, что при ингибировании функционирования БХШ 310 антисывороткой против этого белка происходит либо увеличение степени восстановленности убихинона вследствие повышения степени сопряжения митохондрий, либо локальное повышение

содержания O_2 из-за снижения скорости дыхания в состоянии 4 и, вследствие этого, меньшего его расходования в митохондриях. Обе эти причины приводят к увеличению образования активных форм кислорода митохондриями, и, как следствие, повышению уровня ПОЛ.

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что эндогенный БХШ 310 подобно другим известным к настоящему времени разобщающим растительным белкам (Kowaltowski et al., 1998), может участвовать в системе защиты клетки от окислительного стресса.

15.2 Динамика влияния БХШ 310 и антисыворотки против БХШ 310 на ПОЛ в изолированных митохондриях озимой пшеницы

Ранее при изучении влияния БХШ 310 на энергетическую активность митохондрий озимой пшеницы было установлено, что разобщающее влияние БХШ 310 на энергетические параметры митохондрий сохраняется при инкубации митохондрий с БХШ 310 в течение 1.5 часов (Grabelnych et al., 2001a). В связи с этим было проведено исследование динамики влияния ингибирования разобщающей активности БХШ 310 при помощи антисыворотки против этого стрессового белка и присутствия экзогенного стрессового белка БХШ 310 на ПОЛ в изолированных митохондриях озимой пшеницы при инкубации в течение 2 часов при 27°C.

В ходе эксперимента были получены следующие результаты. В системе спонтанного ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы индукция ПОЛ была отмечена после 1 часа инкубации митохондрий при 27°C (около 140%). При этом в первые 60 мин инкубации наблюдались лишь незначительные (110%) колебания индукции ПОЛ по (рис. 52). Затем вплоть до 2 ч скорость образования продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов монотонно увеличивалась до 150% (рис. 52) (Kolesnichenko et al., 2001d; Zyкова et al., 2001b).

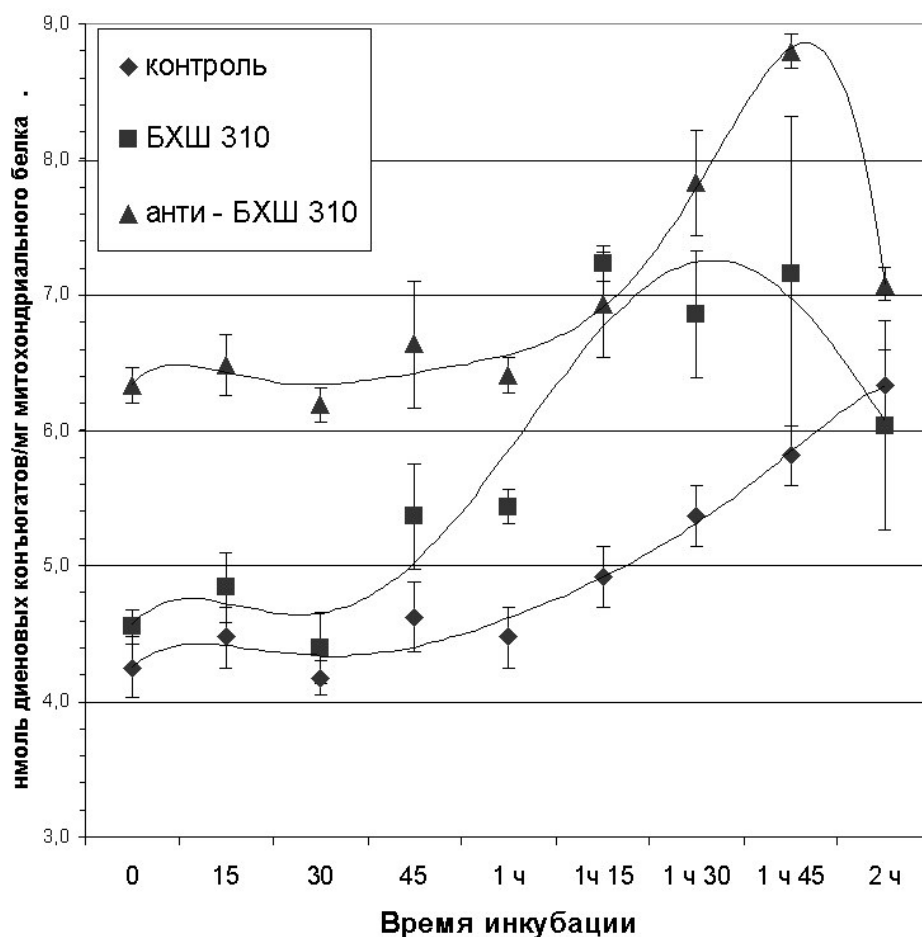


Рис. 52. Изучение влияния БХШ 310 (1 мг/мл) и сыворотки против БХШ 310 (2 мг/мл) на спонтанное ПОЛ в изолированных митохондриях озимой пшеницы при их инкубации в течение 2 часов при 27⁰С.

Добавление к митохондриям антисыворотки против стрессового белка БХШ 310 вызывало немедленное увеличение содержания диеновых конъюгатов с 4.2 до 6.4 нМ/мг митохондриального белка, т.е. примерно на 50% (рис. 52). Содержание диеновых конъюгатов в этом варианте опыта сохранялось приблизительно на одном уровне в течение первого часа инкубации митохондрий. Дальнейшая инкубация митохондрий с антисывороткой против БХШ 310 вызывала увеличение концентрации диеновых конъюгатов до 8.8 нМ/мг митохондриального белка (рис. 52). К двум часам инкубации митохондрий с антисывороткой отмечалось уменьшение содержания в митохондриях диеновых конъюгатов до 7.0 нМ/мг митохондриального белка (рис. 52).

Таким образом, если спонтанное ПОЛ в митохондриях характеризовалось монотонным увеличением содержания диеновых конъюгатов после 1 часа инкубации, что, по-видимому, связано с происходящими процессами «старения» митохондрий (Войников и др., 1983; Константинов и др., 1989а,б), то в присутствии антисыворотки против белка БХШ 310 после 1.5 час инкубации митохондрий был отмечен максимум содержания диеновых конъюгатов. Предположительно, что этот факт можно объяснить тем, что после 1.5 часов инкубации митохондрий в них происходят дегенеративные повреждения, достаточные для нарушения функции БХШ 310, в связи с чем его ингибирование становится неэффективным (Kolesnichenko et al., 2001d).

Изучение влияния добавления в среду инкубации митохондрий экзогенного БХШ 310 на ПОЛ в суспензии митохондрий показало, что, в отличие от активации митохондриальных УСР-подобных разобщающих белков, которая вызывает ингибирование образования АФК митохондриями, добавление к инкубируемым *in vitro* митохондриям экзогенного БХШ 310 не вызывало ингибирования ПОЛ (рис. 52). В первые 30 минут инкубации митохондрий присутствие экзогенного БХШ 310 не оказывало влияние на уровень ПОЛ в митохондриях. В дальнейшем при инкубации митохондрий уровень ПОЛ в присутствии БХШ 310 начинал возрастать и к 1.5 часам инкубации образование диеновых конъюгатов достигало максимума – около 7.0 нМ/мг митохондриального белка. Интересно отметить, что этот прооксидантный эффект БХШ 310 проявлялся только после 30-60 минут инкубации митохондрий, когда отмечалось начало индукции спонтанного ПОЛ в контрольных митохондриях, инкубируемых без всяких добавок.

Резкое отличие влияния добавления экзогенного БХШ 310 на ПОЛ от активации остальных известных разобщающих белков позволяет предположить отличия в механизме его функционирования, а именно, что данный белок является

редокс-агентом. В этом случае, принимая во внимание наличие большого количества негеминового железа в митохондриях (Tangeras et al., 1980), а также то, что эти низкомолекулярные комплексы железа способны инициировать процесс ПОЛ в митохондриальной мембране (Bacon, Britton, 1990) при выходе этих комплексов наружу в случае повреждения мембран митохондрий, можно предположить, что экзогенный БХШ 310 способен образовывать с ними пары, генерирующие активные формы кислорода в поврежденных митохондриях.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что добавление антисыворотки вызывает немедленное достоверное повышение уровня ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы. При этом необходимо отметить, что добавление неимунной сыворотки не оказывало заметного влияния на процессы ПОЛ в инкубируемых *in vitro* митохондриях (рис. 51). Это позволяет утверждать, что индукция ПОЛ в данном случае является следствием ингибирования активности эндогенного БХШ 310 вследствие его связывания антисывороткой, а не следствием присутствия в среде инкубации сывороточных белков. Полученные данные позволяют предполагать, что эндогенный БХШ 310 так же, как и другие известные к настоящему времени разобщающие растительные белки (Kowaltowski et al., 1998), участвует в системе защиты клетки от окислительного стресса путем снижения образования АФК вследствие разобщения окисления и фосфорилирования (Kolesnichenko et al., 2001d).

В то же время добавление экзогенного БХШ 310 к инкубируемым митохондриям озимой пшеницы не вызывало снижения уровня ПОЛ. При этом, если в первые 30 мин инкубации добавление БХШ 310 не оказывало влияние на ПОЛ, то при дальнейшей инкубации, вплоть до 1.5 ч, скорость образования продуктов ПОЛ в присутствии БХШ 310 увеличивалась на 60% по сравнению с контрольными митохондриями. Известно, что инкубация изолированных

митохондрий приводит к их «старению», связанному с повреждением мембран органелл и нарушением их функциональной активности (Войников и др., 1983; Константинов и др., 1989а,б). Этот факт позволяет предположить, что прооксидантный эффект БХШ 310, наблюдаемый после 1 часа инкубации митохондрий с белком, может быть связан с повреждением митохондриальных мембран, происходящим во время «старения» митохондрий, а сам он является редокс-агентом. Для проверки этого предположения необходимо было провести эксперименты по изучению влияния БХШ 310 на ПОЛ в эмульсии полиненасыщенной жирной кислоты чтобы исключить собственную прооксидантную активность БХШ 310 и изучить влияние экзогенного БХШ 310 на ПОЛ в митохондриях на фоне индукции неферментативной и ферментативной систем ПОЛ, повреждающих митохондриальные мембраны.

15.3 Влияние БХШ 310 на ПОЛ в эмульсии линолевой кислоты

В связи с приведенными выше данными о способности БХШ 310 индуцировать ПОЛ в митохондриях, необходимо было установить, не обладает ли он собственными прооксидантными свойствами. Для этого был проведен модельный эксперимент по изучению влияния БХШ 310 на ПОЛ в эмульсии полиненасыщенной жирной кислоты.

Известно, что многие полиненасыщенные жирные кислоты, в частности, линолевая кислота, могут накапливаться в растениях при закаливании в значительных концентрациях (Климов и др., 1993) и играют важную роль в изменении структуры мембран во время низкотемпературного стресса (McKersie, 1991). В связи с этим для изучения влияния БХШ 310 на процессы ПОЛ была выбрана линолевая кислота. Изучение влияния БХШ 310, взятого в концентрации 0.5 мг/мл среды инкубации, на ПОЛ проводили в среде, содержащей 0.25 мМ трис-НСl, рН 7.4 и 20 мМ линолевой

кислоты. В качестве контроля использовали БСА в концентрации 1 мг/мл среды инкубации.

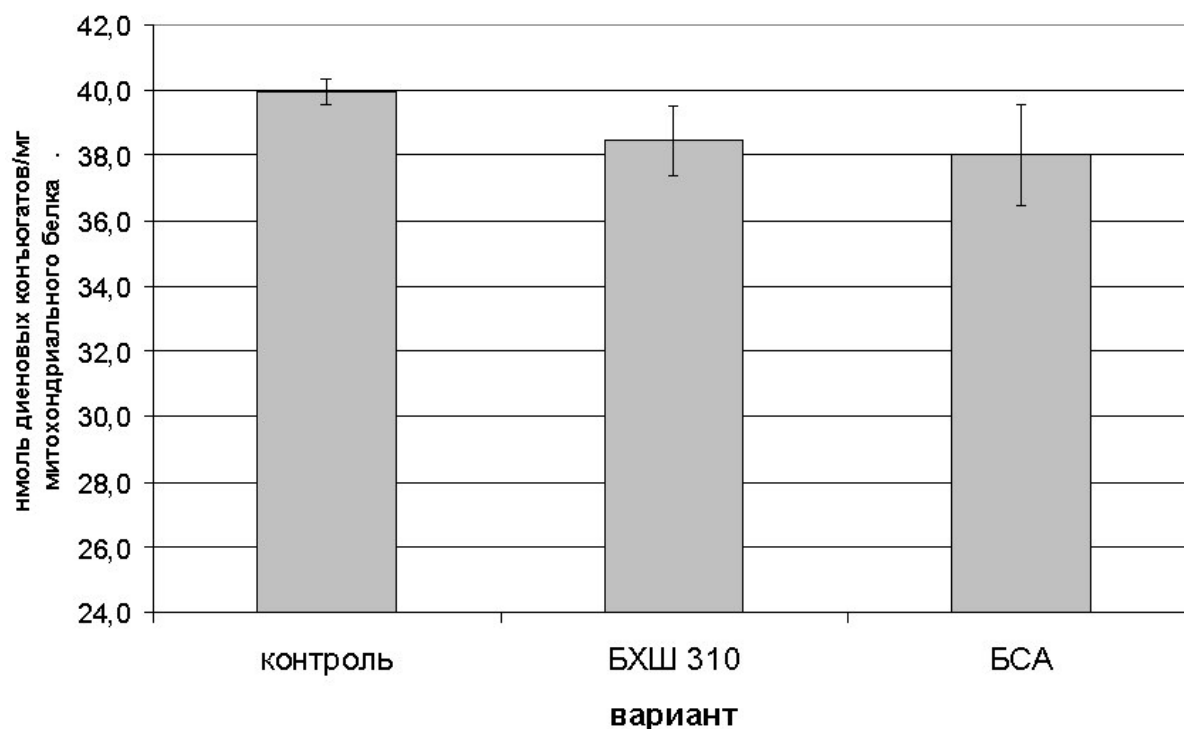


Рис. 53. ПОЛ в эмульсии линолевой кислоты во время инкубации в течение 20 мин при 27⁰С в присутствии БХШ 310 (0.5 мг/мл) и БСА (1 мг/мл).

В ходе экспериментов установлено, что БХШ 310 так же, как и БСА, взятый в качестве контроля, не оказывает индуцирующего влияния на ПОЛ (рис. 53). Эти данные позволяют утверждать, что БХШ 310 не обладает липоксигеназной активностью и не индуцирует ПОЛ в силу своего присутствия в среде инкубации.

15.4 Влияние БХШ 310 на различные системы перекисного окисления липидов в митохондриях озимой пшеницы

При проведении экспериментов по изучению влияния БХШ 310 на перекисное окисление липидов в митохондриях озимой пшеницы в стандартных условиях индукции неферментативного и ферментативного ПОЛ (37⁰С, 20 мин)

установлено, что инкубация митохондрий с БХШ 310 при 37°C вызывает индукцию изученных систем перекисного окисления - неферментативного и ферментативного ПОЛ (рис. 54).

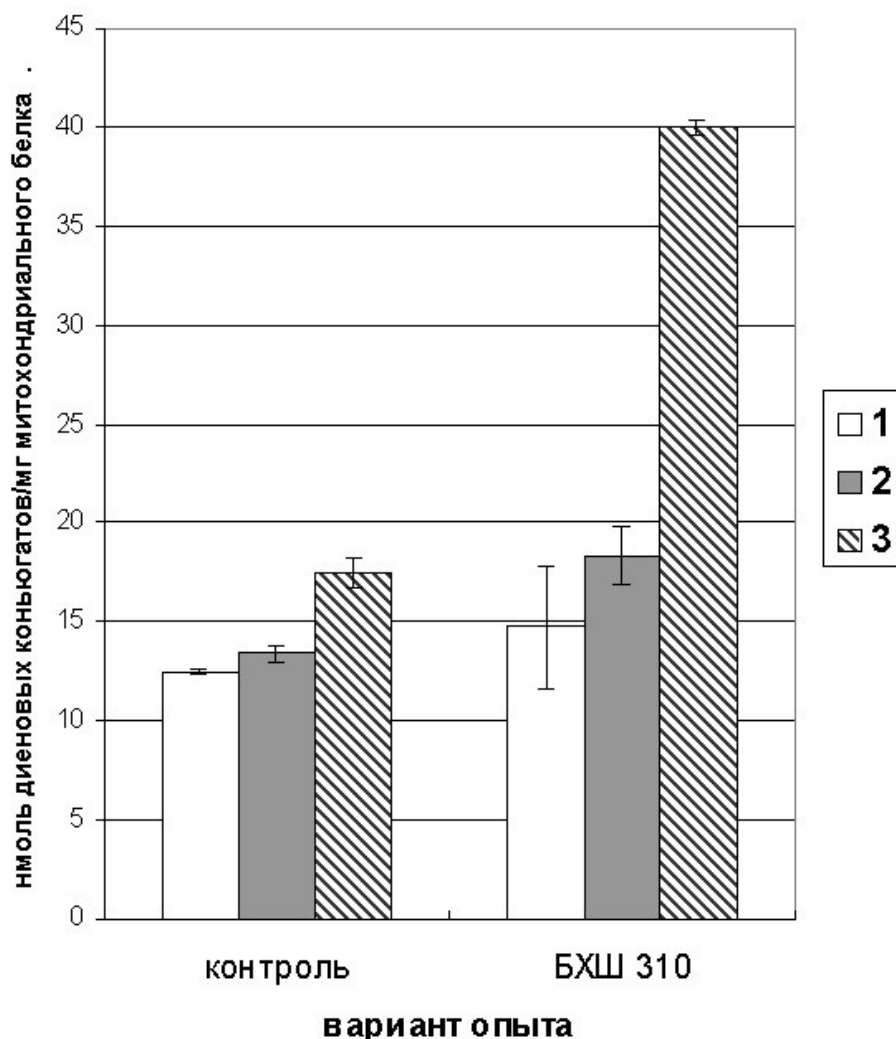


Рис.54. Влияние стрессового белка БХШ 310 на активность спонтанного (1), неферментативного (2) и ферментативного (3) ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы во время их инкубации в течение 20 мин при 37°C.

При этом, если индукция неферментативного ПОЛ (115% к контролю) была незначительна, то индукция ПОЛ в ферментативной системе составляла около 150% к контролю. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что в митохондриях, поврежденных индукцией неферментативного и ферментативного ПОЛ, стрессовый белок БХШ 310 проявляет свойства прооксиданта, активизирующего процессы перекисного окисления липидов в митохондриях

(Zykova et al., 2000; Kolesnichenko et al., 2001i). По-видимому, являясь редокс-агентом, в системах с искусственной индукцией ПОЛ БХШ 310 генерирует активные формы кислорода, интенсифицируя процессы ПОЛ, что особенно заметно при индукции ферментативного ПОЛ.

Влияние различных концентраций БХШ 310 на перекисное окисление липидов в митохондриях озимой пшеницы. В связи с тем, что БХШ 310 оказывал заметное влияние на индукцию ферментативного ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы, было проведено изучение влияния концентрации БХШ 310 на ПОЛ в стандартных условиях (37°C, 20 мин). При этом при изучении влияния различных концентраций БХШ 310 (0.5 - 3 мг/мл) в среде инкубации митохондрий было установлено, что максимальный индуцирующий эффект на ферментативное и неферментативное ПОЛ оказывают различные концентрации стрессового белка (рис. 55). Если спонтанное ПОЛ лишь незначительно индуцировалось при концентрации БХШ в среде инкубации 2 мг/мл, то максимальный индуцирующий эффект на НАДН - зависимую систему был отмечен при концентрации БХШ в среде инкубации 1 мг/мл. В аскорбат - зависимой системе ПОЛ максимальная индукция наблюдалась при концентрации БХШ в среде инкубации 0.5 мг/мл. Следует также отметить, что высокие концентрации стрессового белка в среде инкубации (2 - 3 мг/мл) не вызывали индукции ПОЛ, а в некоторых экспериментах даже оказывали ингибирующее действие (Зыкова и др., 2000; Zykova et al., 2000).

Поскольку основной известной к настоящему времени функцией БХШ 310 является разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях во время низкотемпературного стресса, т. е. для реализации его разобщающей активности необходима функциональная сопряженность митохондрий, определенный интерес представляло изучение влияния БХШ 310 на ПОЛ в несопряженных митохондриях. Эксперименты по изучению

эффектов БХШ 310 на интенсивность ПОЛ в неактивных митохондриях с низкой степенью сопряжения окисления и фосфорилирования показали, что стрессовый белок ни в одной из концентраций практически не оказывал влияния на процессы ПОЛ в митохондриях (рис. 56). Необходимо также отметить, что уровень ПОЛ в контрольном варианте был значительно выше в несопряженных митохондриях (рис. 56) по сравнению с сопряженными (рис. 55).

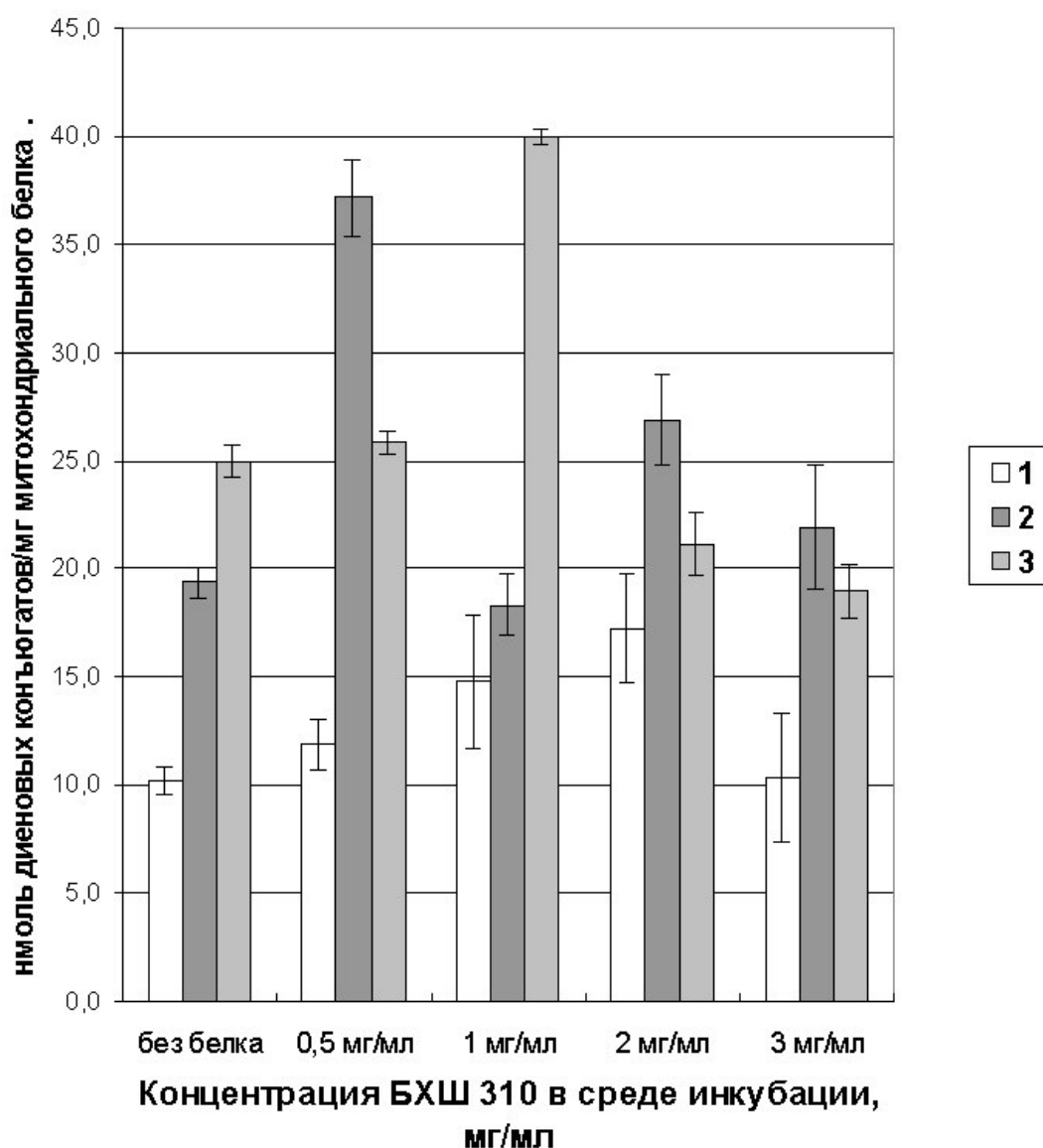


Рис. 55. Влияние разных концентраций стрессового белка БХШ 310 в среде инкубации на активность спонтанного (1), неферментативного (2) и ферментативного (3) ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы во время их инкубации в течение 20 мин при 37⁰С.

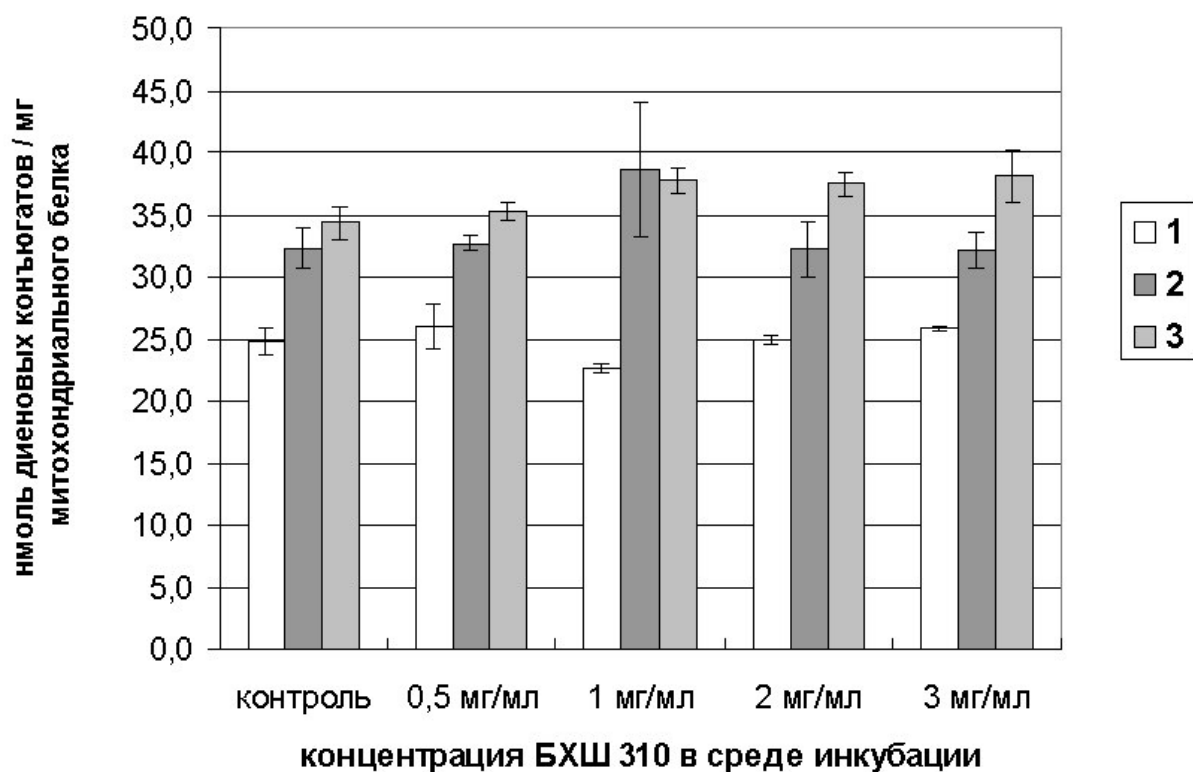


Рис. 56. Влияние стрессового белка БХШ 310 на активность спонтанного (1), неферментативного (2) и ферментативного (3) ПОЛ в неактивных митохондриях озимой пшеницы во время их инкубации в течение 20 мин при 37 °С.

Эти данные позволяют предположить наличие связи между функционированием электронтранспортной цепи, наличием трансмембранного потенциала в митохондриях и индукцией ПОЛ под влиянием стрессового белка БХШ 310. Известно, что УСР-подобные растительные разобщающие белки оказывают влияние на ПОЛ путем регулирования энергетической активности митохондрий (Korshunov et al., 1999; Kowaltowski et al., 1998). В связи с этим можно предположить, что БХШ 310 также может оказывать влияние на ПОЛ и напрямую генерируя АФК, и путем регулирования их образования при функционировании митохондрий. В то же время тот факт, что экзогенный БХШ 310 оказывает лишь незначительное влияние на спонтанное ПОЛ, но вызывает значительную индукцию ПОЛ в условиях окислительного стресса (индукции неферментативного и ферментативного ПОЛ) позволяет предположить его участие в апоптических

процессах (Зыкова и др., 2000; Zyкова et al., 2000; Kolesnichenko et al., 2001i).

Влияние БХШ 310 на ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы при низкотемпературном стрессе *in vitro*. К настоящему времени установлено, что стрессовый белок БХШ 310 оказывает разобщающий эффект на окислительное фосфорилирование в митохондриях в условиях низкотемпературного стресса (Побежимова и др., 1996; Voinikov et al., 1998). В то же время изучение процессов ПОЛ в стандартных условиях, разработанных для регистрирования процессов ПОЛ в животных клетках, проводятся при температуре 37°C, которая вызывает быструю инактивацию растительных митохондрий (Pobezhimova et al., 1996). При этом инкубация растительных митохондрий при 0 - 4°C не оказывала значительного влияния на их дыхательные параметры (Pobezhimova et al., 1996). Поскольку, как показано в предыдущей главе, БХШ 310 оказывает влияние на ПОЛ только в активных митохондриях и его функциональная активность проявляется во время низкотемпературного стресса, то в связи с этим был проведен эксперимент по изучению его влияния на ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы при моделировании низкотемпературного стресса *in vitro*. В этом эксперименте индукцию ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы проводили при 4°C.

Прежде всего, необходимо отметить, что при этой температуре было отмечено резкое уменьшение уровней неферментативного и ферментативного ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы (рис. 57). В то же время результаты эксперимента показывают, что в данных условиях стрессовый белок БХШ 310 вызывает индукцию ПОЛ в митохондриях (рис. 57). При этом индукция спонтанной системы (21% к контролю) была даже выше, чем при 37°C. Индукция неферментативной системы перекисного окисления липидов практически не изменилась по сравнению с 37°C (15% к контролю). Индукция ферментативной системы ПОЛ

составляла около 25% к контролю и была ниже, чем при 37°C, что можно объяснить общим падением скорости ферментативных реакций при снижении температуры (Зыкова и др., 2000; Zyкова et al., 2000).

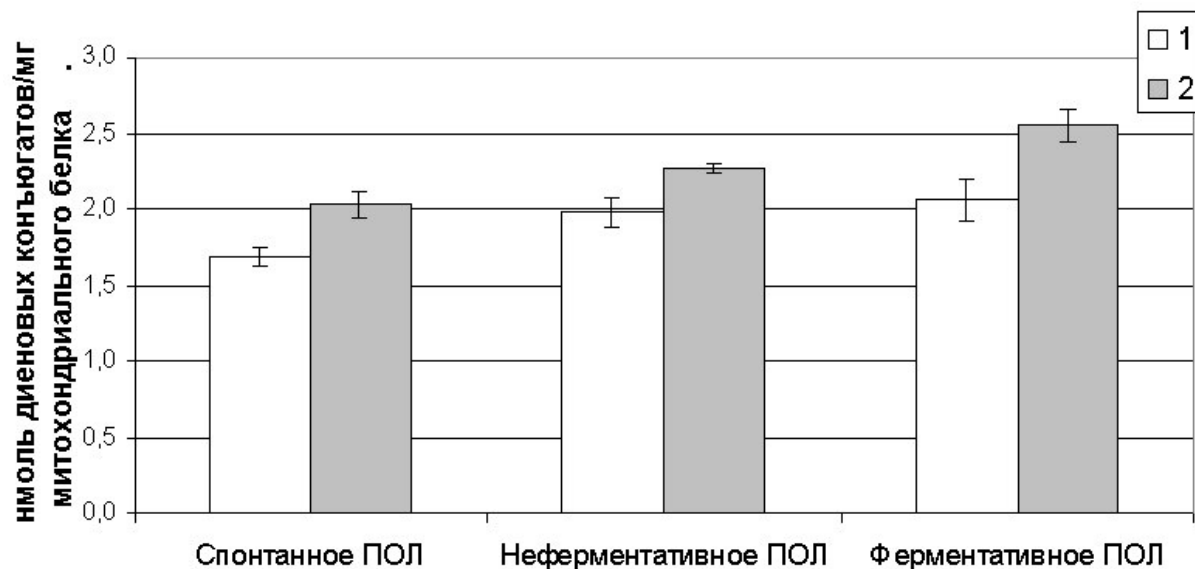


Рис. 57. Влияние стрессового белка БХШ 310 на активность спонтанного, неферментативного и ферментативного ПОЛ во время инкубации митохондрий озимой пшеницы в течение 20 мин при 4°C.

1 - митохондрии, инкубировавшиеся без БХШ 310; 2- митохондрии, инкубировавшиеся в присутствии БХШ 310.

Таким образом, данные, полученные в ходе изучения влияния БХШ 310 на ПОЛ в изолированных митохондриях при моделировании низкотемпературного стресса свидетельствуют, что, несмотря на общее снижение уровня ПОЛ, БХШ 310 обладает более выраженным прооксидантным эффектом в митохондриях при низкой температуре. По-видимому, это происходит из-за его ассоциации с митохондриями под действием низкотемпературного стресса. Учитывая то, что БХШ 310 усиливает ПОЛ в митохондриях, поврежденных вследствие индукции аскорбат-зависимой и НАДН-зависимой систем ПОЛ, имеются все основания предполагать, что он является редокс-агентом и при повреждении митохондрий в условиях низкотемпературного

стресса этот белок может обладать прооксидантным эффектом.

Влияние белков, иммунохимически родственных БХШ 310, на ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы. Поскольку при изучении иммунохимически родственных БХШ 310 белков у ряда культурных и дикорастущих злаков был установлен значительный межвидовой полиморфизм среди высокомолекулярных цитоплазматических белков данного семейства, была поставлена задача определить влияние этих белков, выделенных при помощи аффинной хроматографии из цитоплазмы исследуемых злаков, на процессы ПОЛ в митохондриях. Во всех полученных препаратах присутствовали иммунохимически родственные белки с мол. массами 230 кДа, около 140 кДа и субъединицы с мол. массами 56 и 66 кДа. В то же время в препарате из пырейника сибирского присутствовал ряд белков с мол. массами 330-380 кДа. В препарате белков из пшеницы содержание собственно БХШ 310 было низким ввиду длительности процесса аффинной хроматографии и высокой лабильности стрессового белка. В препарате белков, выделенных из ржи, сохранялось высокое содержание БХШ 310 (Kolesnichenko et al., 2001i; Zyкова et al., 2001a).

В эксперименте по изучению влияния на ПОЛ иммунохимически родственных БХШ 310 белков, выделенных при помощи аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованной на носителе сывороткой против БХШ 310, было показано, что, по сравнению с препаратом иммунохимически родственных БХШ 310 белков, выделенных из озимой ржи, белки семейства БХШ 310, выделенные из других злаков (пшеницы, кукурузы и пырейника сибирского), не обладают прооксидантной активностью (рис. 58). При этом если белки, выделенные из пшеницы, не оказывали заметного влияния на неферментативное и ферментативное ПОЛ в митохондриях пшеницы, то белки, выделенные из кукурузы и, особенно, из пырейника сибирского, вызывали значительное

ингибирование во всех изученных системах ПОЛ. При этом белки семейства БХШ 310, выделенные из пырейника сибирского, ингибировали ферментативное ПОЛ в митохондриях пшеницы более чем в два раза (рис. 58).

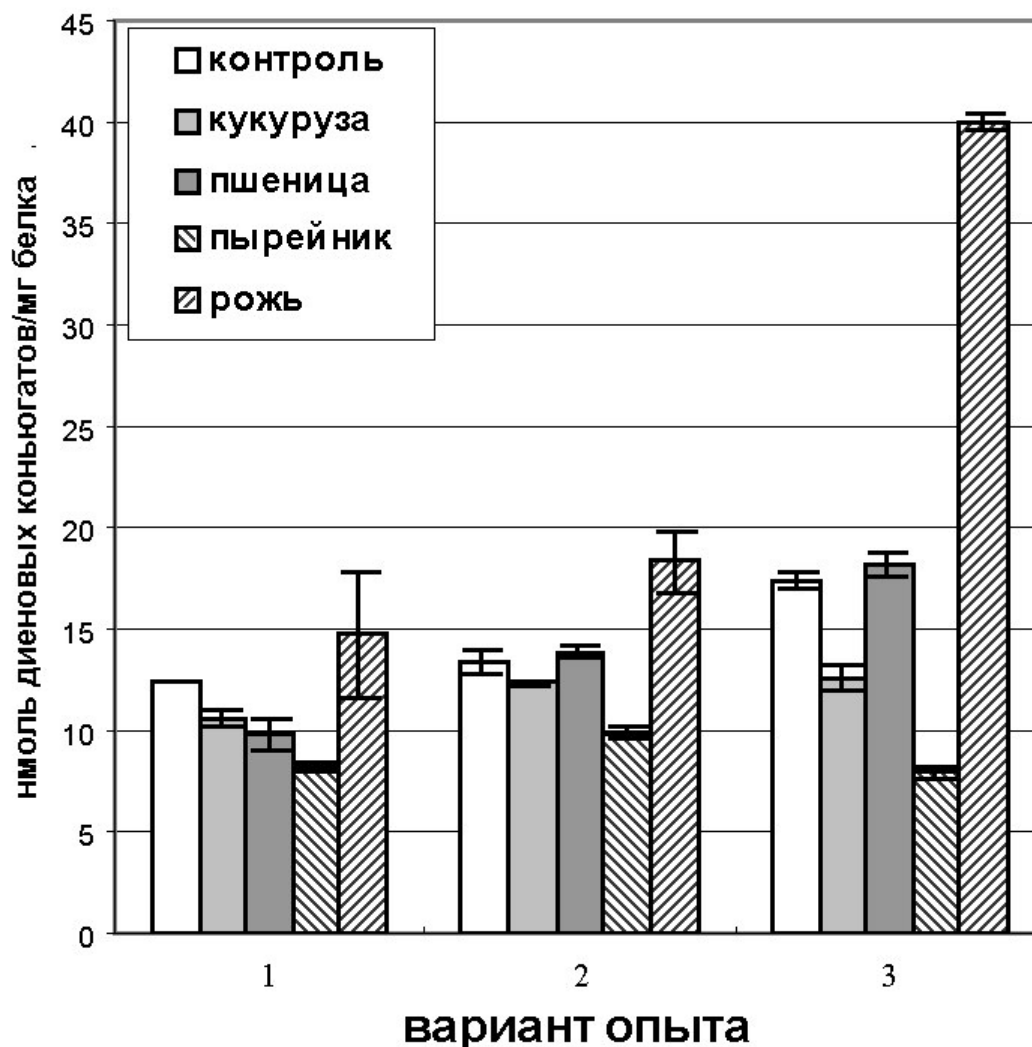


Рис. 58. Влияние выделенных из разных видов злаков препаратов иммунохимически родственных БХШ 310 белков на активность спонтанного (1), неферментативного (2) и ферментативного (3) ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы во время их инкубации в течение 20 мин при 37⁰С.

Особый интерес эти данные представляют потому, что, как показано ранее, белки семейства БХШ 310 у ржи, пшеницы и кукурузы состоят из субъединиц с одинаковой молекулярной массой. Различия же между ними обусловлены различными наборами субъединиц в образованных из них нативных белках (Kolesnichenko et al., 1999). В связи с этим обнаруженные отличия, касающиеся влияния белков данного

семейства из разных видов растений на активность ПОЛ в митохондриях связаны, по-видимому, именно с этими видовыми особенностями (Kolesnichenko et al., 2001i; Zyкова et al., 2001a), и, вследствие этого, различной активностью их как редокс-агентов.

Известно, что увеличение содержания АФК и индукция ПОЛ приводят к явлению открытия митохондриальных пор (Kowaltowski, Vercesi, 1999). При этом показано, что открытие митохондриальных пор и высвобождение из межмембранного пространства определенного сигнального белка является прямой причиной апоптоза (Petit et al., 1996).

Поскольку БХШ 310 значительно индуцирует ПОЛ в митохондриях в условиях окислительного стресса (при индукции неферментативного и ферментативного ПОЛ), то одна из его функций в этом случае состоит, возможно, в «разборке» определенной части митохондрий, наиболее пострадавших от действия температурного стресса, путем активации ПОЛ и последующих митоптоза и апоптоза (Скулачев, 1998).

Известно, что в митохондриях животных увеличение содержания АФК и индукция ПОЛ приводят к открытию митохондриальных пор (Kowaltowski, Vercesi, 1999). При этом открытие митохондриальных пор и высвобождение из межмембранного пространства определенного сигнального белка является прямой причиной апоптоза (Petit et al., 1996). Поскольку экзогенный БХШ 310 индуцирует ПОЛ в поврежденных митохондриях, то одна из его функций в этом случае состоит, возможно, в «разборке» определенной части митохондрий, наиболее пострадавших от действия температурного стресса, путем активации ПОЛ и последующих митоптоза и апоптоза (Скулачев, 1998).

15.5 Влияние БХШ 310 на ПОЛ в митохондриях при функционировании различных комплексов дыхательной цепи изолированных растительных митохондрий

Как показано выше, стрессовый белок БХШ 310 оказывает различное влияние на комплексы дыхательной цепи, причем основное разобщающее действие направлено на комплекс I дыхательной цепи митохондрий (Grabelnich et al., 2001a). В связи с этим представляло определенный интерес установить, каким образом протекает ПОЛ в митохондриях при переносе электронов через отдельные комплексы дыхательной цепи митохондрий и как на это влияет присутствие в среде инкубации БХШ 310 и антисыворотки на этот белок. Для оценки влияния БХШ 310 на ПОЛ при функционировании отдельных комплексов дыхательной цепи использовали субстраты, при окислении которых в транспорте электронов участвовали отдельные комплексы дыхательной цепи (Scheffler, 2000). Для комплекса I был использован малат, для комплекса II - сукцинат, для комплекса III - НАДН, для комплекса IV - аскорбат плюс ТМФД (тетраметил-п-фенилдиамин).

Влияние БХШ 310 и антисыворотки против БХШ 310 на процесс ПОЛ при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из нестрессированных проростков озимой пшеницы. При изучении влияния БХШ 310 и антисыворотки против БХШ 310 на процесс ПОЛ при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из нестрессированных проростков озимой пшеницы, оказалось, что, если перенос электронов осуществляется через комплексы I, II или III, то интенсивность ПОЛ в митохондриях довольно низка и примерно одинакова во всех случаях (около 4 нмоль диеновых конъюгатов/мг митохондриального белка) (рис. 59). При взаимодействии субстрата с комплексом IV дыхательной цепи интенсивность ПОЛ была на 50% выше и составляла около 7

нмоль/мг митохондриального белка (рис. 59) (Kolesnichenko et al., 2001d; Zykova et al., 2001b).

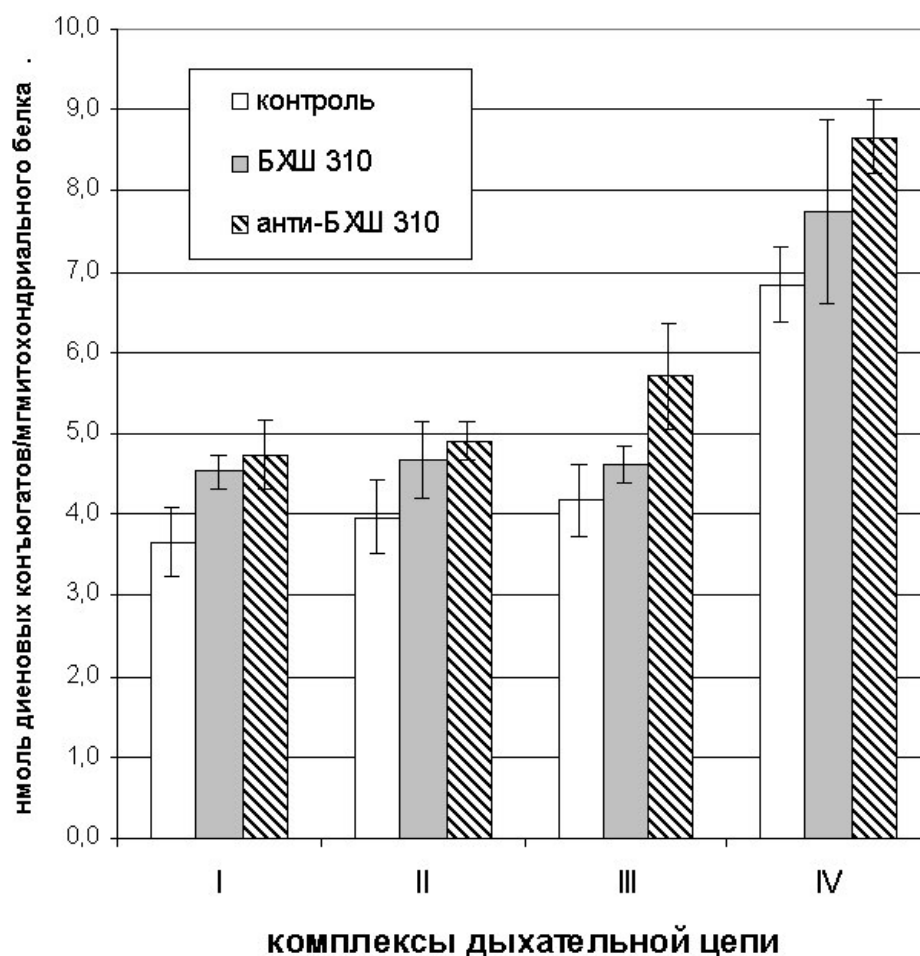


Рис. 59. Влияние БХШ 310 (1 мг/мл) и антисыворотки против БХШ 310 (2 мг/мл) на ПОЛ в митохондриях при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из нестрессированных проростков озимой пшеницы во время инкубации в течение 20 мин при 27°C.

Эти результаты можно объяснить тем, что при функционировании первых двух комплексов дыхательной цепи электроны переносятся через убихиноновый комплекс, который функционирует как эффективная антиоксидантная система (Побежимова, Войников, 1999). Добавление БХШ 310 в среду инкубации митохондрий оказывало незначительное влияние (рис. 59). Достоверные отличия от контроля (около 25%) были при этом отмечены только при функционировании комплекса I. Добавление в среду инкубации митохондрий антисыворотки против БХШ 310 вызывало более

значительную индукцию ПОЛ, чем добавление БХШ 310. В этом случае прирост ПОЛ составлял 29, 24, 36 и 27% при использовании субстратов комплекса I, II, III и IV дыхательной цепи, соответственно (рис. 59). При функционировании комплекса IV дыхательной цепи индукция ПОЛ составляла 26%, т.е. была относительно ниже, чем при использовании субстрата комплекса III, однако в абсолютном значении выход диеновых конъюгатов в этом случае увеличился на 125% по отношению к варианту функционирования комплекса I (рис. 59).

Таким образом, при функционировании разных комплексов дыхательной цепи ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы протекает с различной интенсивностью. При активировании комплекса IV дыхательной цепи митохондрий, изолированных из проростков озимой пшеницы, отмечается наибольший выход продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов. БХШ 310 по-разному влияет на ПОЛ при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий озимой пшеницы. При этом экзогенный БХШ 310 индуцирует ПОЛ только при функционировании комплекса I дыхательной цепи. Присутствие в среде инкубации митохондрий сыворотки против стрессового белка БХШ 310 вызывает за счет повышения степени сопряжения окисления и фосфорилирования более значительную индукцию ПОЛ в митохондриях, чем присутствие БХШ 310 (Kolesnichenko et al., 2001d; Zyкова et al., 2001b).

Влияние антисыворотки против БХШ 310 на ПОЛ в митохондриях при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из проростков озимой пшеницы, подвергнутых низкотемпературному стрессу. При изучении влияния низкотемпературного стресса на интенсивность ПОЛ в митохондриях озимой пшеницы при функционировании различных комплексов дыхательной цепи, оказалось, что, если перенос электронов осуществляется к

комплексам I, II или III, то интенсивность ПОЛ довольно низка и примерно одинакова (рис. 60). В то же время при переносе электронов через комплекс IV дыхательной цепи интенсивность ПОЛ была значительно (на 80%) выше (рис. 60). Необходимо отметить, что при функционировании комплекса II дыхательной цепи абсолютные значения ПОЛ в митохондриях, выделенных из стрессированных проростков, были несколько ниже, чем в митохондриях, выделенных из нестрессированных проростков (рис. 59, 60). Образование диеновых конъюгатов при переносе электронов к I, III и IV комплексам дыхательной цепи митохондрий, выделенных из стрессированных проростков, достоверно не отличалось от образования диеновых конъюгатов при функционировании соответствующих комплексов дыхательной цепи митохондрий, выделенных из нестрессированных проростков (рис. 60). Эти результаты можно так же, как и полученные при изучении ПОЛ в нестрессированных проростках, объяснить тем, что при функционировании первых двух комплексов дыхательной цепи электроны идут через убихиноновый комплекс, который функционирует во время стресса как эффективная антиоксидантная система. При этом во время стресса, по-видимому, происходит активация и других антиоксидантных систем митохондрий (Kolesnichenko et al., 2001d; Zyкова et al., 2001b).

Антисыворотка против БХШ 310 вызвала более значительную индукцию ПОЛ в митохондриях, изолированных из стрессированных проростков, чем в митохондриях, изолированных из нестрессированных проростков. Увеличение образования продуктов ПОЛ составило 40, 58, 26 и 37% при функционировании комплексов I, II, III и IV дыхательной цепи, соответственно (рис. 60). В этом случае, как и у контрольных проростков, при использовании субстрата комплекса IV дыхательной цепи индукция ПОЛ составляла 37% и была относительно ниже, чем при использовании субстратов комплекса I и II, однако абсолютная

величина образования диеновых конъюгатов в митохондриях, изолированных из стрессированных проростков, также была значительно выше и достигала около 145% к контролю при функционировании комплекса I (рис. 60).

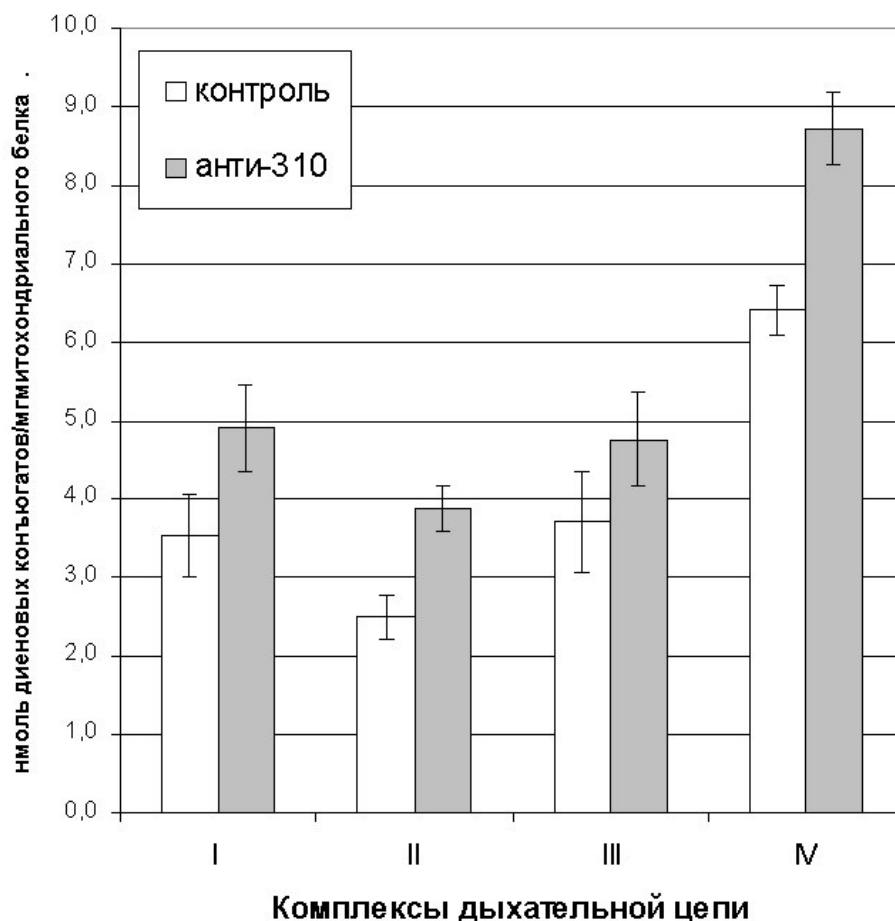


Рис. 60. Влияние антисыворотки против БХШ 310 (2 мг/мл) на ПОЛ в митохондриях при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из стрессированных (-1°C , 1 час) проростков озимой пшеницы, во время инкубации в течение 20 мин при 27°C .

При сравнении влияния сыворотки против БХШ 310 на интенсивность процессов ПОЛ в митохондриях, изолированных из контрольных и стрессированных проростков озимой пшеницы, необходимо отметить, что в стрессированных митохондриях под действием антисыворотки против БХШ 310, за исключением комплекса II, ПОЛ активируется до тех же абсолютных значений (около 5

нмоль диеновых конъюгатов/мг митохондриального белка при функционировании I и III комплексов и 9 нмоль диеновых конъюгатов/мг митохондриального белка при функционировании IV комплекса дыхательной цепи митохондрий), как и у контрольных проростков.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из стрессированных проростков озимой пшеницы, ПОЛ протекает с различной интенсивностью. Антисыворотка против БХШ 310 индуцирует ПОЛ в митохондриях, изолированных из стрессированных проростков озимой пшеницы, до того же уровня, что и в митохондриях, изолированных из нестрессированных проростков.

Влияние БХШ 310 и антисыворотки против БХШ 310 на ПОЛ при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из нестрессированных проростков кукурузы. Ранее при изучении влияния антисыворотки против БХШ 310 на энергетические функции митохондрий ряда злаков было установлено, что она оказывает значительное сопрягающее действие на митохондрии, выделенные из проростков такого теплолюбивого злака, как кукуруза. В то же время при изучении митохондриальных белков кукурузы было установлено, что в их спектре присутствует, хотя и в меньших количествах, чем у озимых пшеницы и ржи, БХШ 310 (Kolesnichenko et al., 2000a). В связи с этим было проведено изучение влияния БХШ 310 и антисыворотки против этого стрессового белка на интенсивность ПОЛ при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из проростков кукурузы.

В ходе эксперимента было установлено, что добавление БХШ 310 в среду инкубации митохондрий вызывало сильную индукцию ПОЛ при функционировании I (60%) и II (120%) комплекса, в то время как у IV комплекса наблюдалась лишь

незначительная индукция (7%). При функционировании III комплекса добавление экспериментальной концентрации БХШ 310, наоборот, даже несколько снижало образование диеновых конъюгатов по отношению к контрольному варианту (рис. 61).

Добавление в среду инкубации митохондрий, изолированных из проростков кукурузы, антисыворотки против БХШ 310 показало в целом ту же картину, что и при добавлении антисыворотки в среду инкубации митохондрий, изолированных из проростков пшеницы. При функционировании I и II комплекса была отмечена индукция ПОЛ по отношению к контрольному варианту на 33 и 67%, соответственно. При использовании субстратов комплекса III и IV дыхательной цепи также была отмечена индукция ПОЛ относительно контрольного варианта (рис.61) (Kolesnichenko et al., 2001a; 2001d).

В то же время необходимо отметить, что если БХШ 310 при добавлении к инкубируемым митохондриям озимой пшеницы вызывал лишь незначительную (в пределах 20-30%) индукцию ПОЛ при функционировании всех четырех комплексов дыхательной цепи митохондрий (рис. 59), то при добавлении БХШ 310 к инкубируемым митохондриям кукурузы при функционировании I и II комплексов дыхательной цепи наблюдалась сильная (60-120%) индукция ПОЛ (рис. 61). Возможно, данный факт объясняется тем, что у кукурузы содержание эндогенного БХШ 310 в митохондриях значительно ниже, чем у пшеницы (Kolesnichenko et al., 2000a), в связи с чем инкубация с экзогенным БХШ 310 оказывает более сильное влияние на митохондрии кукурузы (Kolesnichenko et al., 2001a).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что БХШ 310 и антисыворотка против этого белка также вызывают индукцию ПОЛ в митохондриях, изолированных из нестрессированных проростков кукурузы. Необходимо отметить, что при использовании субстрата

комплекса III добавление БХШ 310 вызывает снижение выхода диеновых конъюгатов.

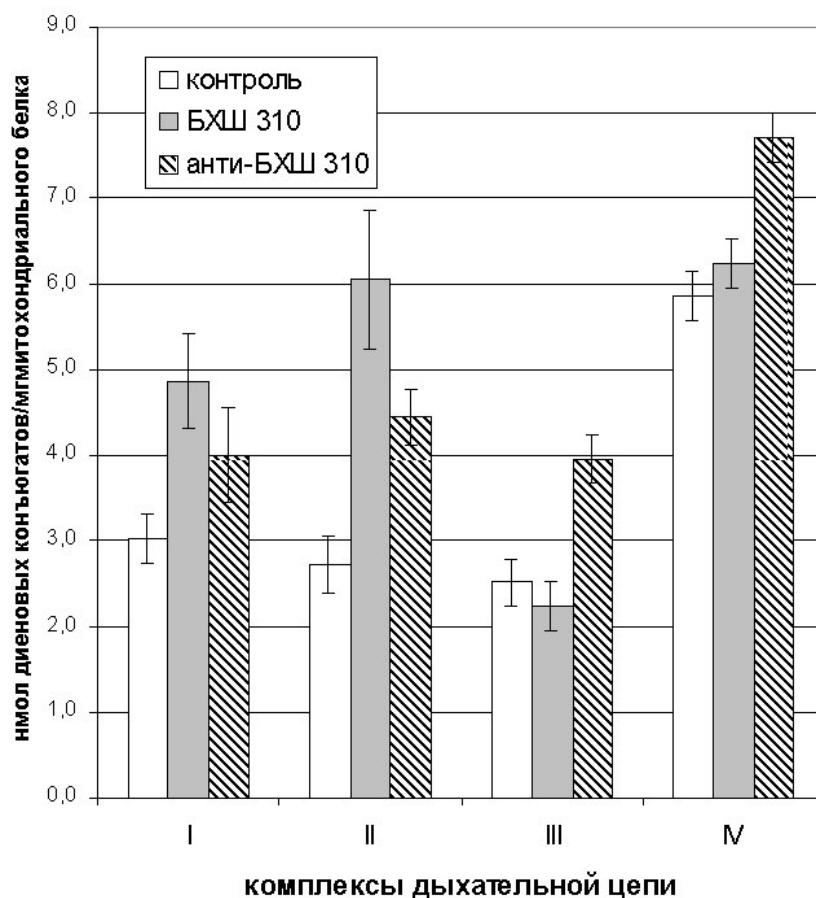


Рис. 61. Влияние БХШ 310 (0.5 мг/мл) и антисыворотки против БХШ 310 (2 мг/мл) на ПОЛ при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из нестрессированных проростков кукурузы, во время инкубации в течение 20 мин при 27°C.

Возможно, что исследуемый белок не оказывает влияние на функционирование данного комплекса дыхательной цепи в митохондриях кукурузы.

Влияние антисыворотки против БХШ 310 на ПОЛ при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из стрессированных проростков кукурузы. При изучении влияния низкотемпературного стресса на интенсивность ПОЛ при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из проростков кукурузы, которые были предварительно стрессированы в течение 1 часа

при 4⁰С, было установлено, что низкотемпературный стресс вызывал увеличение образования диеновых конъюгатов в митохондриях при функционировании всех комплексов дыхательной цепи. Наиболее сильное увеличение образование диеновых конъюгатов было отмечено при функционировании IV комплекса дыхательной цепи (рис. 61) (Kolesnichenko et al., 2001a, d).

Добавление в среду инкубации митохондрий антисыворотки против БХШ 310 вызвало более значительную индукцию ПОЛ, чем у контрольных митохондрий - до 6 нмоль диеновых конъюгатов/мг митохондриального белка при функционировании I, II и III комплекса дыхательной цепи и до 14 нмоль/мг митохондриального белка при функционировании IV комплекса (рис. 62). У нестрессированных проростков кукурузы при добавлении антисыворотки против БХШ 310 образование диеновых конъюгатов составляло около 4 нмоль/мг митохондриального белка при функционировании I, II и III комплексов дыхательной цепи и около 8 нмоль/мг митохондриального белка при функционировании IV комплекса (рис. 61).

Следует отметить, что в экспериментах с митохондриями, изолированными из стрессированных проростков кукурузы, была отмечена более высокая интенсивность ПОЛ, чем в опытах со стрессированными проростками озимой пшеницы. Если при функционировании I, II и III комплексов дыхательной цепи митохондрий стрессированных проростков пшеницы образование диеновых конъюгатов составляло 4 - 5 нмоль/мг митохондриального белка (рис. 60), то у стрессированных проростков кукурузы эта величина составляла около 6 нмоль/мг митохондриального белка (рис. 62). При функционировании IV комплекса образование диеновых конъюгатов составляло 9 и 14 нмоль/мг митохондриального белка у стрессированных проростков озимой пшеницы и кукурузы, соответственно.

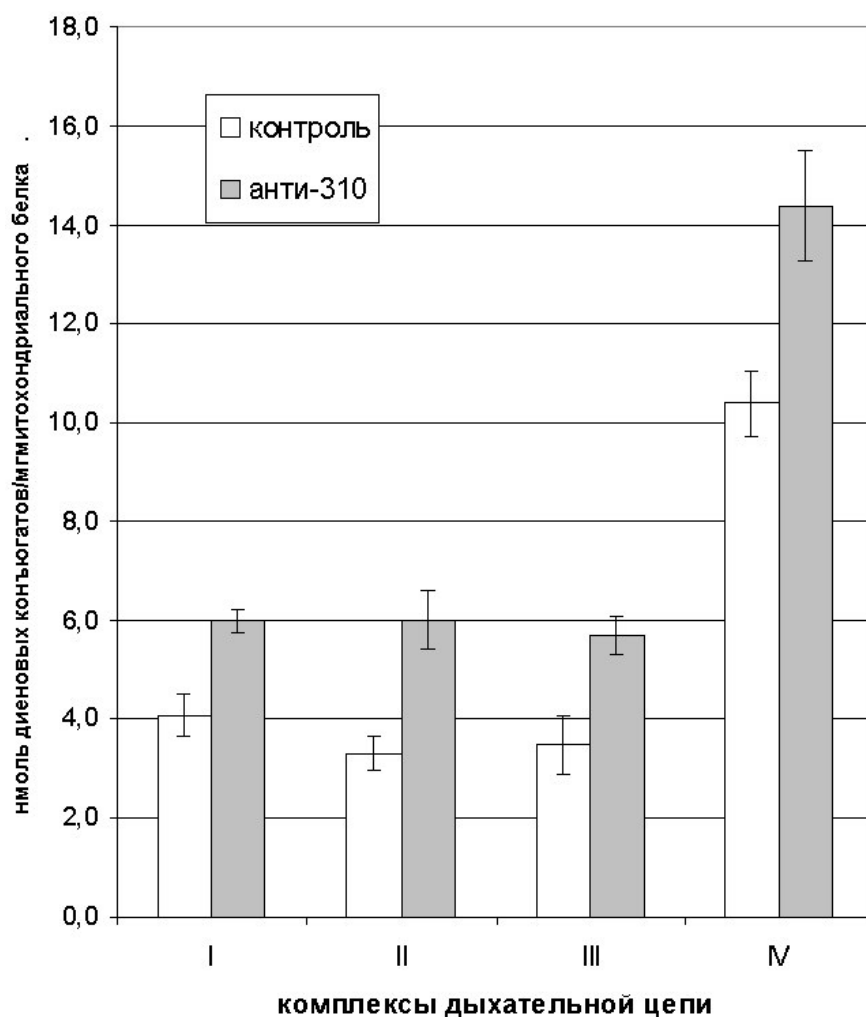


Рис. 62. Влияние антисыворотки против БХШ 310 (2 мг/мл) на ПОЛ в митохондриях при функционировании различных комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из стрессированных (4⁰С, 1 час) проростков кукурузы, во время инкубации в течение 20 мин при 27⁰С.

Сравнение влияния сыворотки против БХШ 310 на интенсивность ПОЛ в митохондриях, изолированных из контрольных и стрессированных проростков кукурузы, позволяет заключить, что у стрессированных проростков в присутствии антисыворотки активность реакций ПОЛ значительно выше, чем у контрольных проростков.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что в митохондриях кукурузы низкотемпературный стресс вызывает индукцию ПОЛ при функционировании всех комплексов дыхательной цепи митохондрий по сравнению с контрольными митохондриями.

Антисыворотка против БХШ 310 вызывает более сильную индукцию ПОЛ в митохондриях, выделенных из стрессированных проростков кукурузы.

15.6 Влияние низкотемпературного стресса, активации и ингибирования известных разобщающих растительных систем на ПОЛ в проростках озимой пшеницы

Приведенные выше данные свидетельствуют, что ингибирование стрессового белка БХШ 310 в изолированных митохондриях озимой пшеницы во время низкотемпературного стресса индуцирует ПОЛ. Данные о сходном влиянии на ПОЛ были получены и для других известных разобщающих систем митохондрий озимой пшеницы – PUMP (Korshunov et al., 1999; Kowaltowski et al., 1999; Casolo et al., 2000) и альтернативной цианидрезистентной оксидазы (Casolo et al., 2000). Однако известно, что реакция изолированных органелл и целого организма на одно и то же воздействие может различаться. В связи с этим было необходимо изучить влияние активации и ингибирования известных разобщающих митохондриальных систем на перекисное окисление липидов в целых побегах проростков озимой пшеницы.

В ходе эксперимента проростки озимой пшеницы (3 г) были инфильтрованы: 1) водой, 2) пируватом (40 мМ), 3) бензгидроксамовой кислотой (ВНАМ) (25 мМ), 4) линолевой кислотой (40 мМ), 5) прокаином (40 мМ), 6) БХШ 310 (1 мг/мл) и 7) антисывороткой против БХШ 310 (2 мг/мл) в течение 1 часа, упаковывались в бумажные контейнеры и подвергались низкотемпературному стрессу при -4°C в течение 1 часа. Контрольный вариант после инфильтрации водой не подвергался низкотемпературному стрессу.

Полученные в ходе эксперимента данные свидетельствуют, что низкотемпературный стресс вызывал примерно 20% увеличение содержания диеновых конъюгатов в тканях проростков озимой пшеницы (рис. 63).

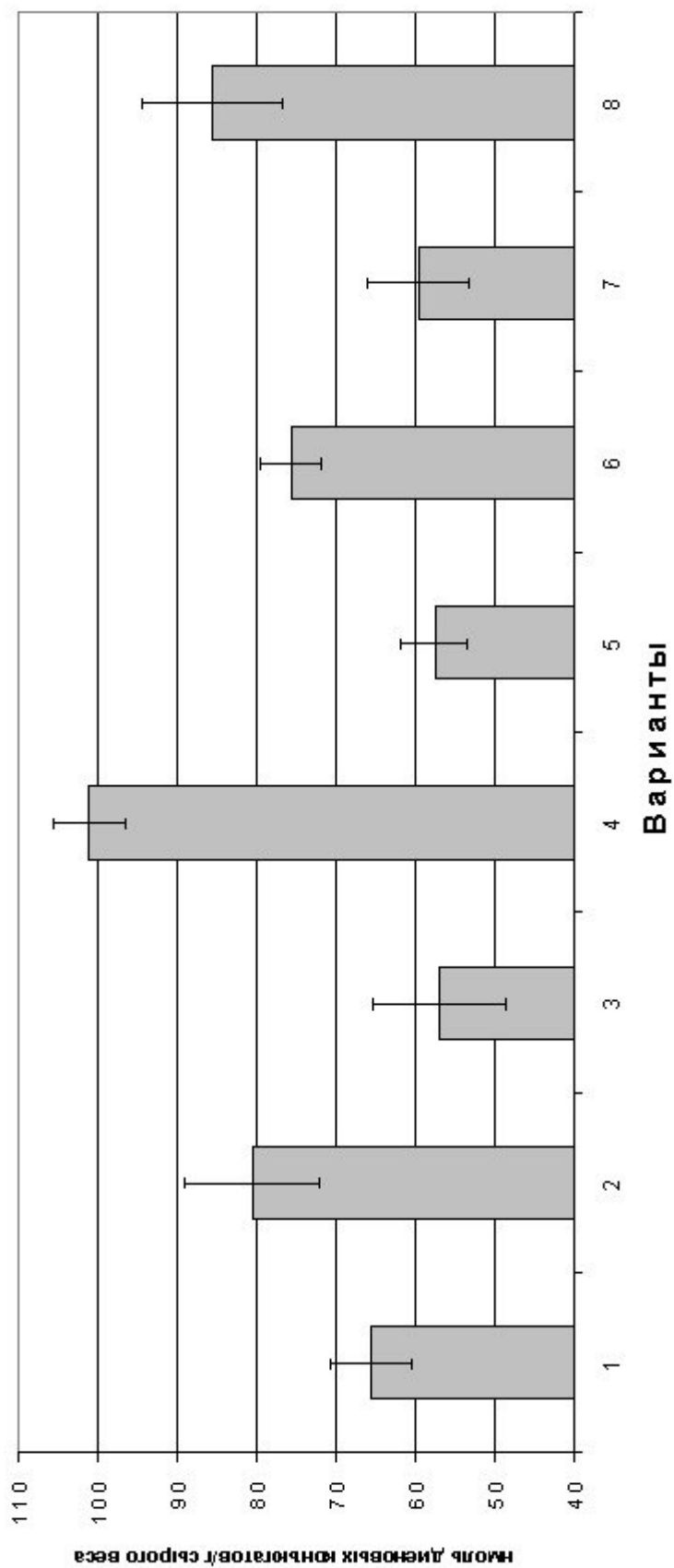


Рис. 63. Влияние активаторов и ингибиторов известных разобщающих окисление и фосфорилирование в митохондриях систем на перекисное окисление липидов в тканях проростков озимой пшеницы во время низкотемпературного стресса. 1- контроль; 2- стресс; 3- пируват; 4- ВНАМ; 5- линолевая к-та; 6- прокаин; 7- БХШ 310; 8- анти-БХШ 310.

Этот результат хорошо соответствует имеющимся в литературе данным о влиянии низкотемпературного стресса на перекисное окисление липидов в тканях растений (Parkin et al., 1989; Loubaresse et al., 1991). При этом во время низкотемпературного стресса было отмечено некоторое увеличение потребления кислорода проростками озимой пшеницы (рис. 64). Инфильтрация проростков озимой пшеницы всеми использованными активаторами митохондриальных разобщающих систем растений (пируватом, активирующим альтернативную цианидрезистентную оксидазу, линолевой кислотой, являющейся субстратом разобщающего белка PUMP и БХШ 310) снижала уровень образования диеновых конъюгатов во время низкотемпературного стресса (рис. 63) (Kolesnichenko et al., 2001h, i).

Интересно отметить, что все они вызывали примерно 30 %-ное уменьшение образования диеновых конъюгатов, и эти значения были даже несколько ниже уровня содержания диеновых конъюгатов в нестрессированных проростках озимой пшеницы, хотя статистически и не отличались от него (рис. 63). Изучение влияния этих активаторов на потребление кислорода побегами проростков озимой пшеницы во время низкотемпературного стресса показало, что все они вызывали увеличение потребления кислорода проростками (рис. 64). Необходимо отметить, что, если инфильтрация проростков пируватом и БХШ 310 вызывало 20-25%-ное увеличение потребления кислорода, то инфильтрация линолевой кислотой вызывала почти 100%-ное увеличение потребления кислорода (Kolesnichenko et al., 2001h, i). Эти данные позволяют предположить, что инфильтрация проростков озимой пшеницы линолевой кислотой не только сильно активирует растительные разобщающие белки типа PUMP (Jezek et al., 1997, 2000; Jezek, 1999), но и сами по себе свободные жирные кислоты способны вызывать разобщение в митохондриях (Войников и др., 1983) и являться дыхательным субстратом (Грабельных и др., 2003).

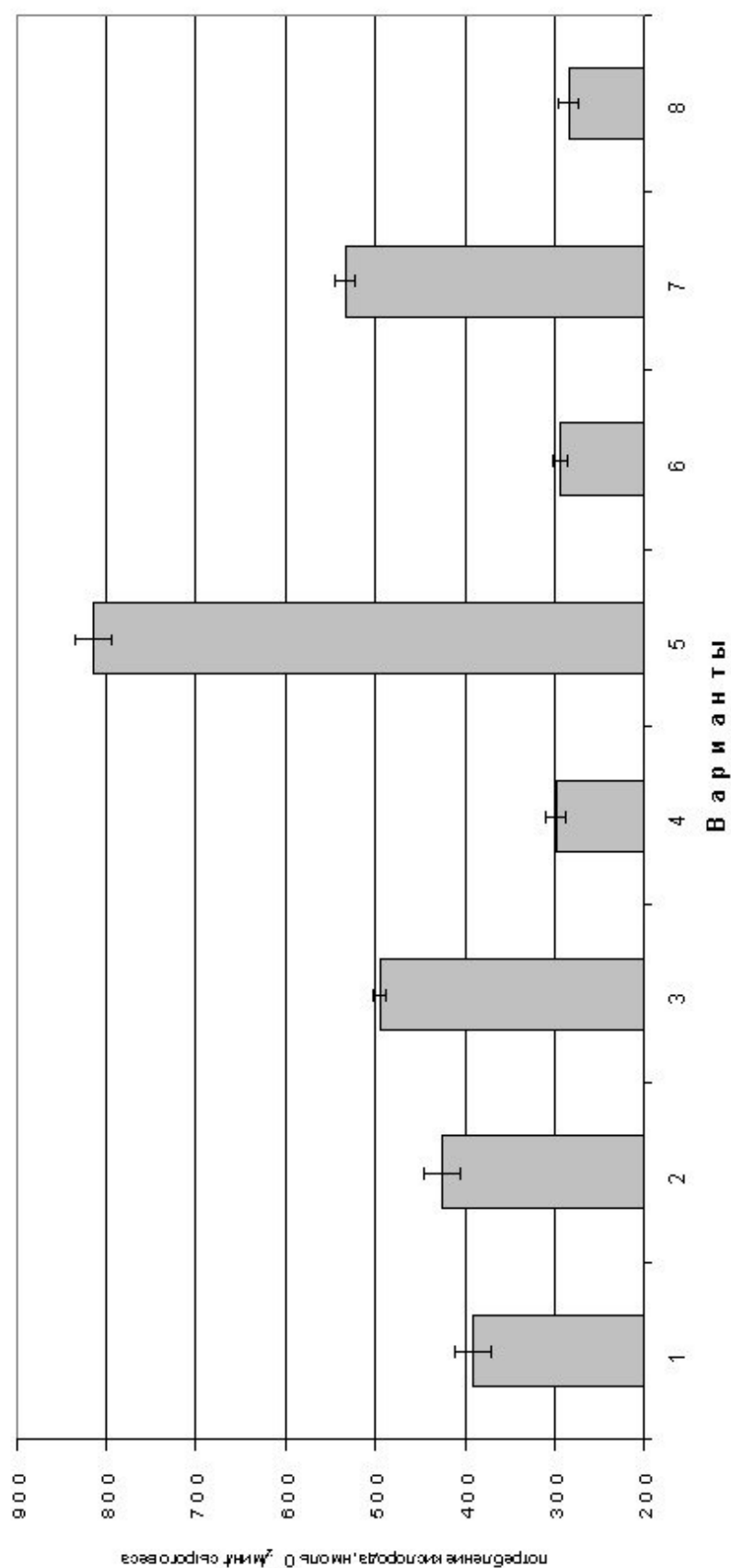


Рис. 64. Влияние активаторов и ингибиторов известных разобщающих окисление и фосфорилирование в митохондриях систем на потребление кислорода в тканях проростков озимой пшеницы во время низкотемпературного стресса. 1- контроль; 2- стресс; 3- пируват; 4- ВНАМ; 5- линолевая к-та; 6- прокаин; 7- BHXH 310; 8- анти-BXHШ 310.

В то же время ингибиторы растительных митохондриальных разобщающих систем (ВНАМ, ингибирующая альтернативную оксидазу, прокаин, ингибирующий фосфолипазу A_2 и, следовательно, снижающий содержание свободных жирных кислот (Scherphor et al., 1972), и антисыворотка против БХШ 310, ингибирующая разобщающее действие БХШ 310 в митохондриях озимой пшеницы различались по их влиянию на перекисное окисление липидов в проростках озимой пшеницы (рис. 63). Если инфильтрация проростков озимой пшеницы ВНАМ вызывала значительное (около 30%) увеличение содержания диеновых конъюгатов, инфильтрация проростков прокаином и антисывороткой против БХШ 310 не вызывала достоверного увеличения образования диеновых конъюгатов (рис. 63). В то же время, в отличие от их влияния на перекисное окисление липидов, все эти ингибиторы вызывали примерно 25%-ное уменьшение потребления кислорода проростками озимой пшеницы (рис. 64) (Kolesnichenko et al., 2001h, i).

Данные, полученные при изучении влияния линолевой кислоты и прокаина на содержание диеновых конъюгатов в проростках озимой пшеницы, представляют определенный интерес. В связи с тем, что линолевая кислота является одним из субстратов перекисного окисления липидов, можно было бы предположить, что инфильтрация ею проростков должна вызывать увеличение образования диеновых конъюгатов. Однако полученные данные свидетельствуют, что в условиях физиологического стресса увеличение концентрации линолевой кислоты в клетках растений вследствие инфильтрации вызывало уменьшение образования первичных продуктов перекисного окисления липидов, т.е. вызывала эффект, сходный с ее влиянием на изолированные митохондрии (Korshunov et al., 1999; Kowaltowski et al., 1999). В то же время снижение концентрации свободных жирных кислот под действием прокаина вследствие ингибирования фосфолипазы A_2 не оказывало значительного влияния на

уровень ПОЛ в проростках озимой пшеницы во время низкотемпературного стресса. По-видимому, этот факт можно объяснить тем, что ингибирование растительного разобщающего белка РУМР, происходящее при снижении содержания свободных жирных кислот в клетке при ее инфильтрации прокаинам, не вызывает увеличения образования АФК митохондриями, либо, возможно, активирует другие антиоксидантные системы растительной клетки. По-видимому, здесь также может играть определенную роль и снижение содержания свободных жирных кислот, являющихся субстратами ПОЛ в клетке.

Таким образом, основываясь на полученных данных, можно сделать вывод, что, БХШ 310, по-видимому, является редокс-агентом и, несмотря на то, что в определенных условиях способен индуцировать процессы перекисного окисления липидов в митохондриях, в растении данный белок проявляет свойства антиоксиданта, и, следовательно, способен принимать участие в защите растения от окислительного стресса *in vivo*.

16 УСТАНОВЛЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ БХШ 310 И МЕСТОНАХОЖДЕНИЯ ДАННОГО БЕЛКА В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЕРЕНОСЧИКОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ РАСТИТЕЛЬНЫХ МИТОХОНДРИЙ

Поскольку ранее было показано что добавление экзогенного БХШ 310 вызывает наиболее выраженный эффект при окислении митохондриями субстратов первого комплекса дыхательной цепи (Grabelnych et al., 2001a), то представляло интерес установить влияние присутствия эндогенного белка в митохондриях на параметры их энергетической активности. Прежде всего, необходимо было изучить влияние добавления ингибиторов известных митохондриальных путей транспорта электронов на поглощение кислорода митохондриями озимой пшеницы, выделенными из контрольных и стрессированных растений. Как свидетельствуют полученные данные (табл. 21 и 22),

добавление антимицина А (ингибирующего комплекс III дыхательной цепи) и бензгидроксамовой кислоты (БГК) (ингибирующей альтернативную оксидазу) к митохондриям озимой пшеницы, окисляющим как сукцинат, так и НАДН, вызывало почти полное ингибирование потребления ими кислорода. В то же время при окислении ими малата, являющегося субстратом комплекса I дыхательной цепи, как в митохондриях, выделенных из контрольных проростков, так и в митохондриях, выделенных из стрессированных проростков, после добавления ингибиторов сохранялось около 30% от дыхания в состоянии 4. Этот факт свидетельствует о том, что при функционировании первого комплекса дыхательной цепи митохондрий озимой пшеницы функционирует еще один путь переноса электронов, не связанный ни с активацией альтернативной оксидазы, ни с функционированием основного цитохромного пути транспорта электронов через комплекс III.

Таблица 21

Влияние ингибиторов электронтранспортной цепи при использовании субстратов различных комплексов дыхательной цепи на функционирование митохондрий озимой пшеницы, изолированных из контрольных проростков. $M \pm m$, $n=6-12$.

Вариант	Нмоль O_2 /мин/мг белка
Малат+Глутамат (комплекс I)	32,05±3,15
Малат+Глутамат+АнтА+БГК	10,11±2,45
Сукцинат+Глутамат (комплекс II)	60,55±1,78
Сукцинат+Глутамат +АнтА+БГК	3,87±2,77
НАДН (комплекс III)	96,39±5,59
НАДН+ АнтА+БГК	2,24±0,93

Исходя из приведенных ранее в монографии данных, эта утечка электронов может быть объяснена функционированием разобщающего белка БХШ 310. В связи с этим следующей задачей исследования было изучить влияние различных

ингибиторов комплекса I на вызываемое БХШ 310 разобщение в митохондриях.

Таблица 22

Влияние ингибиторов электронтранспортной цепи при использовании субстратов различных комплексов дыхательной цепи на функционирование митохондрий озимой пшеницы, изолированных из стрессированных проростков. $M \pm m$, $n=6-12$.

Вариант	Нмоль O_2 /мин/мг белка
Малат+Глутамат (комплекс I)	46,09 \pm 2,87
Малат+Глутамат+АнтА+ВНАМ	13,88 \pm 1,42
Сукцинат+Глутамат (комплекс II)	63,20 \pm 2,87
Сукцинат+Глутамат+АнтА+ВНАМ	4,54 \pm 1,42
НАДН (комплекс III)	83,60 \pm 6,11
НАДН+ АнтА+ВНАМ	9,08 \pm 2,99

В ходе исследований было изучено влияние двух ингибиторов комплекса I - ротенона, который действует на железосерные центры комплекса I дыхательной цепи (Douce, 1985) и реина (дигидроантрахинон-2-карбоксиловая кислота), который является конкурентным ингибитором НАДН-дегидрогеназы, действуя на участок дыхательной цепи между субстратом и ФМН (Kean et al., 1971) на вызываемое БХШ 310 разобщение митохондрий. Оказалось, что в присутствии ротенона добавление БХШ 310 вызывало некоторое увеличение скорости поглощения кислорода (табл. 23). В то же время в присутствии реина последующее добавление БХШ 310 не приводило к изменению скорости нефосфорилирующего дыхания (табл. 23).

Эти данные позволяют предположить, что в присутствии БХШ 310 электроны переносятся от комплекса I (с участка транспорта электронов между ФМН и железосерными центрами) на стрессовый белок, который ассоциирован с наружной митохондриальной мембраной. Можно полагать, что этот процесс происходит в зоне тесного контакта наружной и

внутренней митохондриальных мембран. Известно, что такое взаимодействие между белками наружной и внутренней мембран происходит во время транспорта цитозольных белков в митохондрии и образования Tim/Tom комплекса (Agarraberes, Dice, 2001; Zhang, Glaser, 2002). Существуют данные о сходном процессе при образовании митохондриальной проницаемой поры, когда также формируется комплекс из компонентов внутренней и наружной мембран (Bernardi et al., 1998; Kowaltowski et al., 2001).

Таблица 23

Влияние ингибиторов комплекса I на скорость дыхания в состоянии 4 изолированных митохондрий озимой пшеницы, инкубированных в присутствии и отсутствии БХШ 310 (0,5 мг/мг митохондриального белка). Субстрат окисления: 10 мМ малат + 10 мМ глутамат. $M \pm m$, $n=3-6$.

Вариант	Нмоль O ₂ /мин/мг белка
Ротенон (3 мкМ)	11,94±1,17
Ротенон (3 мкМ)+ БХШ 310	15,01±0,47
Реин (50 мкМ)	24,13±3,10
Реин (50 мкМ)+ БХШ 310	23,03±1,25

Чтобы определить взаимодействие БХШ 310 с другими комплексами дыхательной цепи были проведены эксперименты по изучению влияния последовательного добавления к инкубируемым митохондриям, в присутствии или отсутствии эндогенного белка, ингибиторов отдельных компонентов дыхательной цепи – антимицина А (ингибитор комплекса III), БГК (ингибитор альтернативной циапидрезистентной оксидазы), антисыворотки против БХШ 310 и KCN (ингибитор комплекса IV). В эксперименте были использованы митохондрии озимой пшеницы, в клетках которой присутствие БХШ 310 было показано, и митохондрии гороха, у которого по данным вестерн-блоттинга субъединицы данного белка отсутствуют.

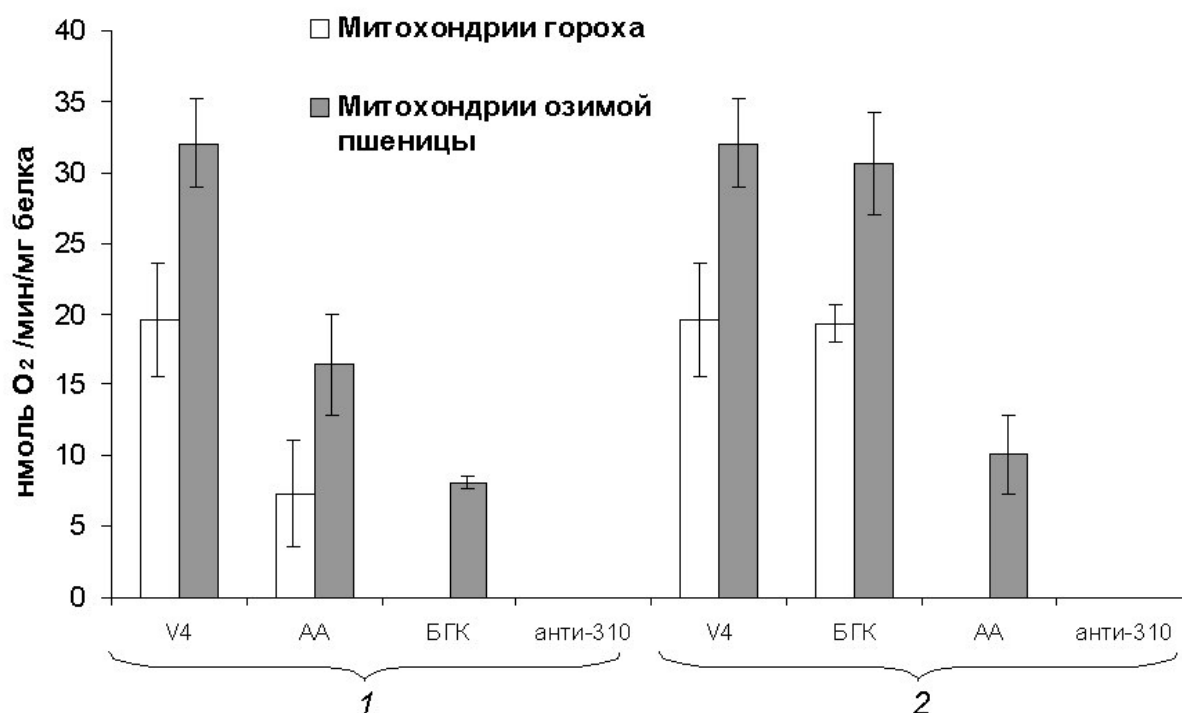


Рис. 65. Влияние ингибиторов дыхательной цепи на скорость поглощения кислорода в состоянии 4 в митохондриях озимой пшеницы и гороха. Субстрат окисления: 10 мМ малат + 10 мМ глутамат. $M \pm m$, $n=6-12$. Ингибиторы добавлены в последовательности слева направо. Концентрации ингибиторов: 20 мкМ антимицин А (АА), 1 мМ БГК и 1 мг/мл антисыворотки против БХШ 310 (анти-310).

Влияние последовательного добавления антимицина А и БГК к изолированным митохондриям гороха находилось в полном соответствии с современными представлениями о транспорте электронов в растительных митохондриях - электроны от комплекса I поступают на убихинон и далее на комплекс III-IV или альтернативную оксидазу. Действительно, добавление антимицина А к митохондриям гороха в состоянии 4 вызывало значительное снижение скорости поглощения кислорода, а последующее добавление БГК полностью ингибировало дыхание (рис. 65, 1). В реципрокном эксперименте, когда первой добавляли БГК, а затем антимицина А внесение обоих ингибиторов также вызывало полное снижение скорости поглощения кислорода (рис. 65, 2).

В отличие от митохондрий гороха, митохондрии озимой пшеницы реагировали на добавление антимицина А и БГК в

меньшей степени. Последовательное добавление этих ингибиторов к митохондриям озимой пшеницы при тех же условиях не приводило к полному блокированию поглощения кислорода (рис. 65, 1). Остаточное дыхание после добавления АА и БГК составляло более 25% от скорости дыхания в состоянии 4. Однако это дыхание полностью блокировалось добавлением антисыворотки против БХШ 310 или KCN. Реципрокные эксперименты также показали сходную картину. Добавление БГК и АА не вызывало полного ингибирования поглощения кислорода (рис. 65, 1). Величина неингибируемого дыхания и в прямом, и в реципрокном экспериментах была близка.

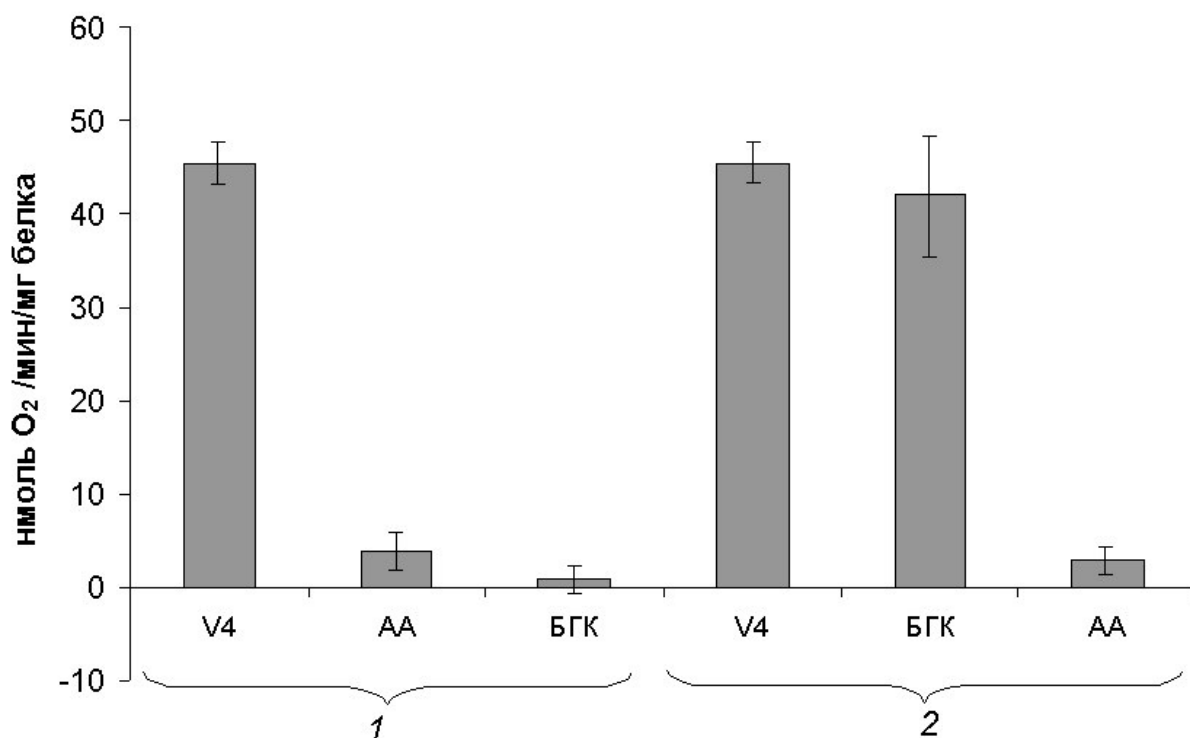


Рис. 66. Влияние ингибиторов дыхательной цепи на скорость поглощения кислорода в состоянии 4 в митохондриях озимой пшеницы. Субстрат окисления: 8 мМ сукцинат + 5 мМ глутамат. $M \pm m$, $n=6-12$. Ингибиторы добавлены в последовательности слева направо. Концентрации ингибиторов: 20 мкМ антимицин А (АА), 1 мМ БГК и 1 мг/мл антисыворотки против БХШ 310 (анти-310).

Дополнительным подтверждением участия комплекса I в механизме разобщения, вызываемого БХШ 310, служат данные по влиянию последовательного добавления

ингибиторов на митохондриях озимой пшеницы при окислении сукцината. Последовательное добавление АА и БГК к митохондриям озимой пшеницы, окисляющим сукцинат в качестве субстрата, приводило к практически полному ингибированию поглощения кислорода (рис. 66, 1).

Реципрокные эксперименты также показали, что добавление БГК ингибировало только 8% от скорости поглощения кислорода в состоянии 4, в то время как последующее добавление АА полностью ингибировало дыхание (рис. 66, 2). Интересно отметить, что и в прямом, и в реципрокном экспериментах, при функционировании второго комплекса основной транспорт электронов происходил по цитохромному пути дыхательной цепи митохондрий через комплекс III, транспорт же электронов через альтернативную оксидазу был незначительным.

Основываясь на результатах этих экспериментов, можно предположить, что остаточное поглощение кислорода в митохондриях озимой пшеницы зависит не только от транспорта электронов через комплекс I, но и от транспорта электронов через комплекс IV (поскольку транспорт электронов полностью блокировался не только добавлением антисыворотки против БХШ 310, но и KCN). Поскольку эти результаты получены в присутствии в среде инкубации митохондрий антимицина А, то нами было выдвинуто предположение о существовании альтернативного пути переноса электронов между комплексами I и IV.

Чтобы проверить это предположение, нами был проведен модельный эксперимент с добавлением БХШ 310 к изолированным митохондриям гороха, в белковом спектре которого, как показано ранее (Grabelnuch et al., 2001c), отсутствуют субъединицы БХШ 310. Оказалось, что добавление к ним в состоянии 4 БХШ 310 вызывало 40% увеличение скорости поглощения кислорода (рис. 67). Это увеличение скорости поглощения кислорода не ингибировалось последовательными добавлениями

антимитин А и БГК, но полностью ингибировалось добавлением антисыворотки против БХШ 310 или KCN. Таким образом, можно сделать вывод, что в ходе этого эксперимента в митохондриях гороха создавалась дополнительная электронтранспортная цепь, включающая в себя БХШ 310 и аналогичная цепи, существующей в митохондриях озимой пшеницы.

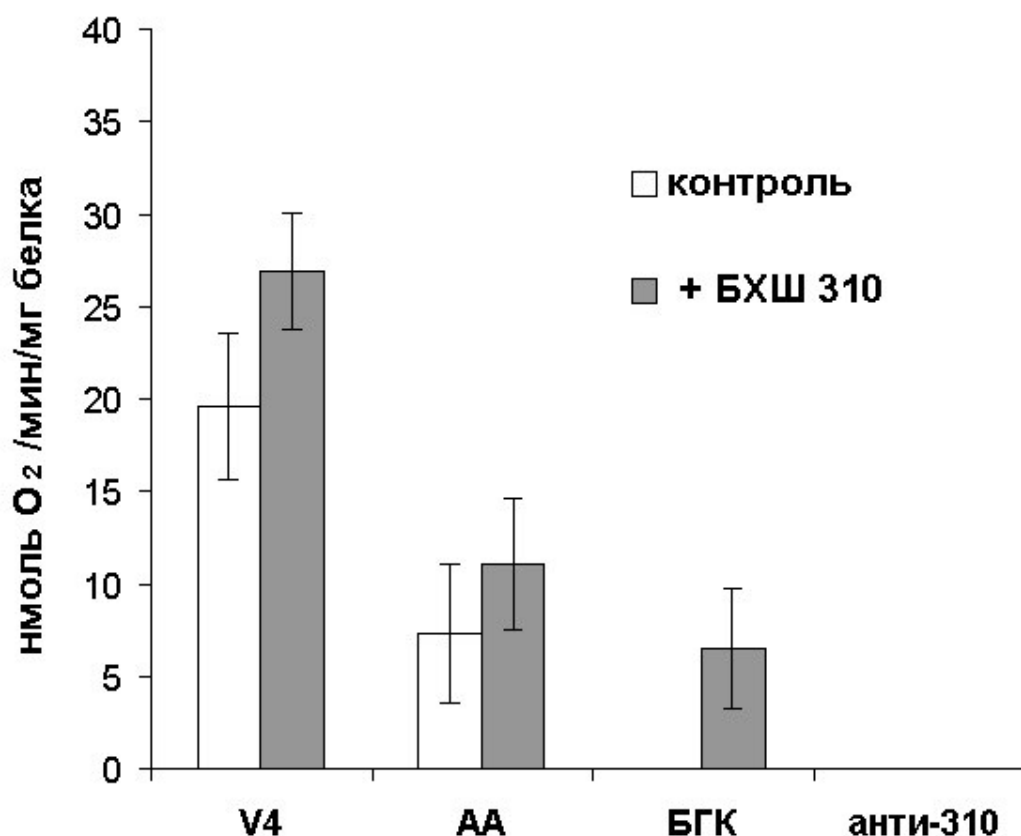


Рис. 67. Влияние ингибиторов дыхательной цепи на скорость поглощения кислорода в состоянии 4 в митохондриях гороха, инкубируемых в присутствии БХШ 310 (0,5 мг/мг митохондриального белка). Субстрат окисления: 10 мМ малат + 10 мМ глутамат. $M \pm m$, $n=6-12$. Ингибиторы добавлены в последовательности слева направо. Концентрации ингибиторов: 20 мкМ антимицин А (АА), 1 мМ БГК и 1 мг/мл антисыворотки против БХШ 310 (анти-310).

В то же время все имеющиеся в настоящее время данные указывают на то, что разобщение, вызываемое БХШ 310 ингибируется добавлением KCN, который блокирует функционирование комплекса IV. Этот факт позволяет предполагать, что, наряду с комплексом I, функционирование

БХШ 310 связано и с комплексом IV. Так как активность БХШ 310 не блокируется антимицином А, мы полагаем, что данный белок переносит электроны на мобильный переносчик цитохром с, вызывая его восстановление. Чтобы проверить это предположение необходимо было в модельном эксперименте *in vitro* установить возможность БХШ 310 восстанавливать окисленный цитохром с. Полученные данные показали, что стрессовая форма БХШ 310 действительно обладает способностью восстанавливать окисленный цитохром с.

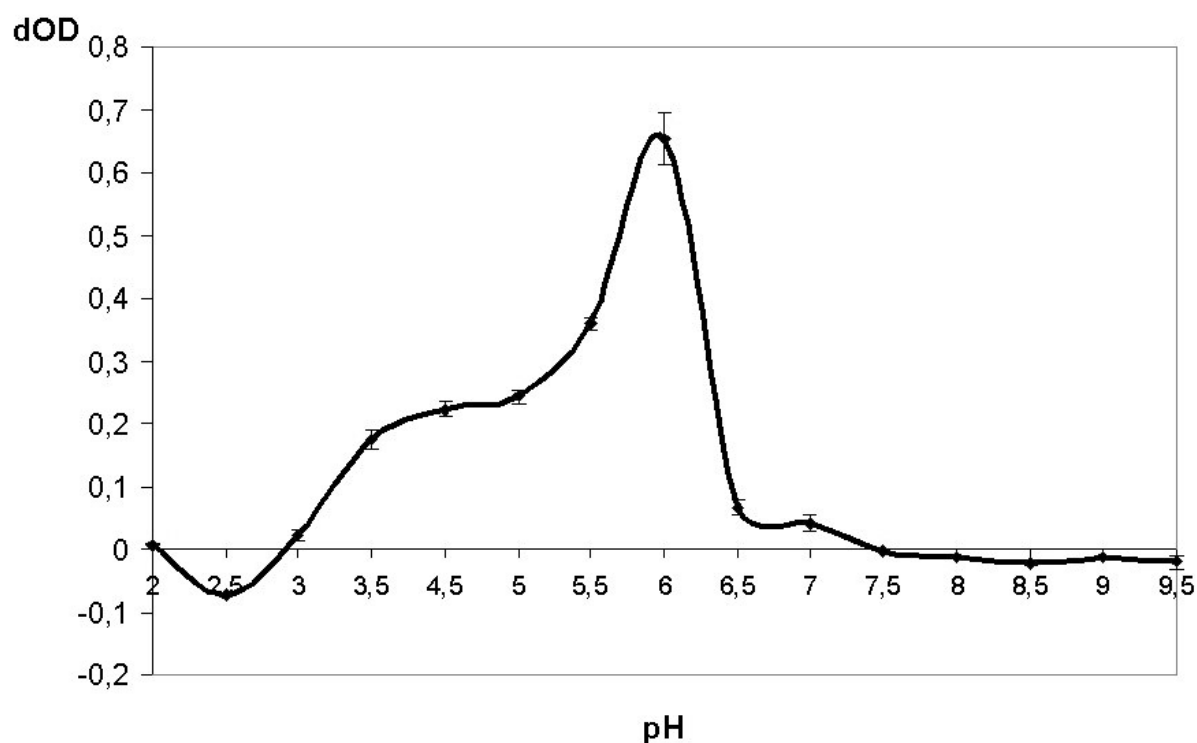


Рис. 68. Изменение оптической плотности (dOD) окисленного цитохрома с (50 мкМ) в присутствии БХШ 310 при различных значениях pH. Концентрация добавленного БХШ 310 составляла 1,25 мг/мл. Длина волны 550 нм.

Изменение степени восстановления цитохром с определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности препарата при 550 нм. Используя широкий диапазон значений pH буфера (2,0–9,5), было установлено, что способность данного белка восстанавливать окисленный цитохром с зависит от значения pH реакционной среды. В

диапазонах рН 2.0-3.0 и 7.5-9.5 БХШ 310 не был способен восстанавливать окисленный цитохром с (рис. 68). Начиная со значения рН 3.0 было отмечено постепенное увеличение оптической плотности, максимальная величина которого достигала при рН 6.0 (рис. 68). Затем с увеличением рН эффект действия БХШ 310 резко снижался и после значения рН 7.5 совсем исчезал (рис. 68).

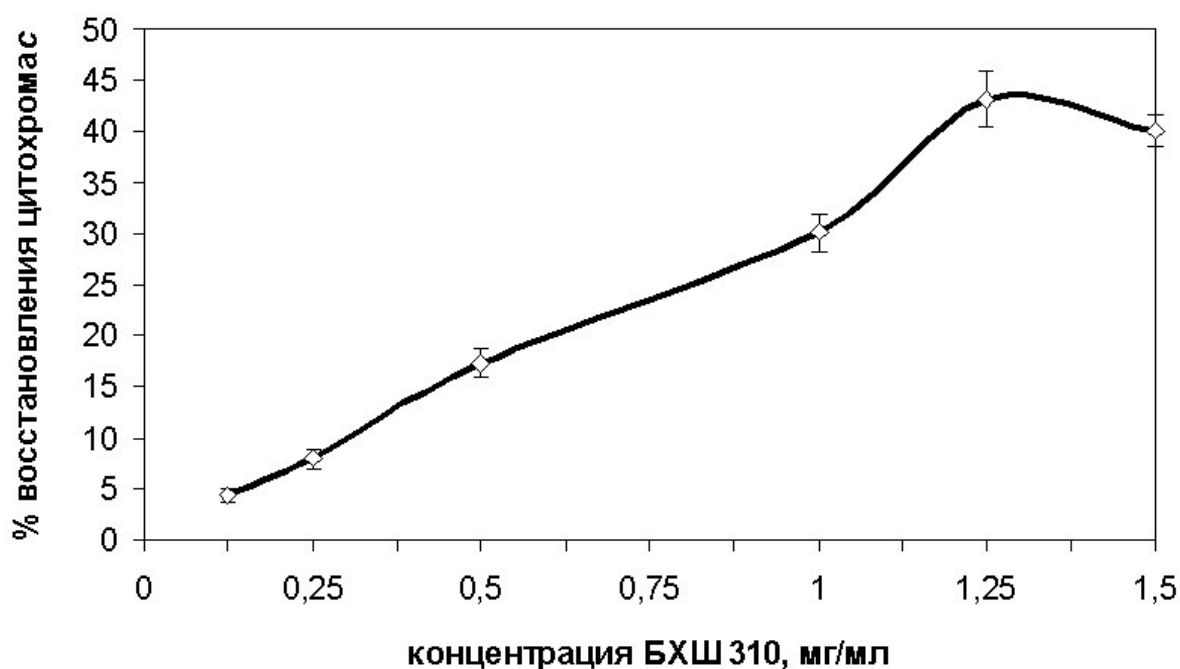


Рис. 69. Восстановление окисленного цитохрома с (30 мкМ) в зависимости от концентрации БХШ 310 при рН 6.0. Длина волны 550 нм.

Следующей задачей было изучение влияния концентраций БХШ 310 и цитохрома с в среде на характер реакции. Изучение зависимости восстановления цитохрома с от концентрации БХШ 310 в условиях *in vitro* выявило, что при повышении концентрации добавленного БХШ 310 происходило увеличение степени восстановления цитохрома с, которое носило линейный характер. Следует заметить, что при минимальной концентрации БХШ 310 (0.125-0.25 мг/мл) восстановления окисленного цитохрома с почти не происходило, в то время как при концентрациях БХШ 310 выше 0.5 мг/мл восстановление цитохрома с было более интенсивным (рис. 69).

Для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация БХШ 310, равная 1.25 мг/мл. На рис. 70 представлено изменение оптической плотности разных концентраций окисленного цитохрома с в присутствии БХШ 310 при рН 6.0. Показано, что при низких концентрациях цитохрома с (5 – 15 мкМ) видимого восстановления цитохрома с белком не наблюдается. При насыщении реакционной среды увеличивающимися концентрациями цитохрома с происходило значительное изменение оптической плотности, которое достигало максимума при 30 мкМ (рис. 70). При дальнейшем насыщении реакционной среды цитохромом с (до 50 мкМ) наблюдали выход на плато.

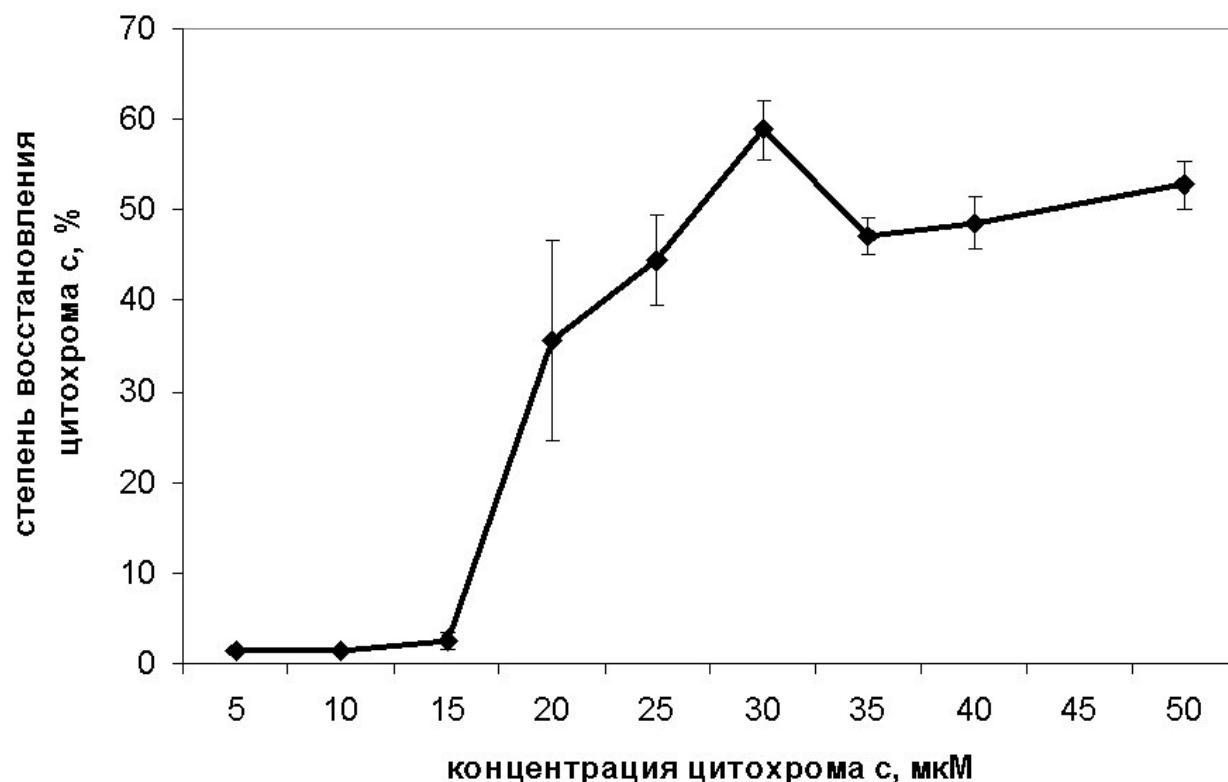


Рис. 70. Изменение оптической плотности (dOD) разных концентраций окисленного цитохрома с в присутствии БХШ 310 при рН 6.0. Концентрация добавленного БХШ 310 составляла 1.25 мг/мл. Длина волны 550 нм.

Опыты по восстановлению цитохрома с стрессовым белком БХШ 310 *in vitro* были подтверждены в опытах *in organello*. В этих опытах была предпринята попытка создания

искусственной трансмембранной электронтранспортной цепи в митохондриях при помощи ассоциации с ними БХШ 310 и добавления к ним экзогенного цитохрома *c*. Известно, что добавление к интактным митохондриям цитохрома *c* не вызывает изменений их энергетических параметров, поскольку цитохром *c* не может преодолевать наружную мембрану митохондрий. Действительно, добавление цитохрома *c* к митохондриям, изолированным из побегов озимой пшеницы и гороха, не вызывало значительных изменений в скорости поглощения кислорода (табл. 24).

Таблица 24

Влияние БХШ 310 и цитохрома *c* на скорость поглощения кислорода в состоянии 4 митохондриями озимой пшеницы и гороха. Субстрат окисления: 10 мМ малат + 10 мМ глутамат. $M \pm m$, $n=3$.

Вариант опыта	Нмоль O ₂ /мин/мг белка				
	V ₄	V _{цит c}	V _{БХШ 310}	V _{БХШ310/цит c}	V _{анти310}
Пшеница	32,41±5,18	30,82±3,02	41,48±0,16	50,08±0,91	32,41±0,22
Горох	31,84±2,17	30,55±2,17	42,22±0,04	46,39±2,42	31,84±2,42

Примечание: V_{цит c} – скорость поглощения кислорода в состоянии 4 после добавления цитохрома *c*; V_{БХШ 310} – скорость поглощения кислорода в состоянии 4 после добавления БХШ 310; V_{БХШ310/цит c} – скорость поглощения кислорода в состоянии 4 после добавления БХШ 310 и цитохрома *c*; V_{анти310} – скорость поглощения кислорода в состоянии 4 после добавления БХШ 310, цитохрома *c* и антисыворотки против БХШ 310.

Добавление БХШ 310 вызывало увеличение скорости нефосфорилирующего дыхания в митохондриях этих растений (на 28% у пшеницы и на 33% у гороха), что указывает на разобщение окислительного фосфорилирования. В то же время, в отличие от интактных митохондрий, в присутствии БХШ 310 последующее добавление цитохрома *c* приводило к усилению потребления кислорода – на 21% в митохондриях

пшеницы и на 10% в митохондриях гороха. Добавление к митохондриям антисыворотки против БХШ 310 снижало скорость поглощения кислорода до скорости дыхания в состоянии 4 до добавления белка (табл. 24).

Полученные данные можно интерпретировать как трансмембранную утечку электронов с комплекса I дыхательной цепи через стрессовый белок БХШ 310 на экзогенно добавленный цитохром с. Последующее добавление к митохондриям антисыворотки против БХШ 310 блокировало утечки через этот белок, как на цитохром с, расположенный в межмембранном пространстве, так и на экзогенно добавленный цитохром с.

Полученные в этих опытах данные являются доказательством того, что БХШ 310 может участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, протекающих во внутренней мембране митохондрий и передавать электроны на цитохром с. Следовательно, поскольку данный белок может как принимать электроны с комплекса I, так и отдавать электроны на цитохром с, то он должен являться редокс-агентом и находиться в клетке либо в окисленной, либо в восстановленной форме. В этом случае можно предположить, что, если добавление БХШ 310 к изолированным митохондриям в присутствии какого-либо субстрата окисления должно вызвать увеличение скорости дыхания в состоянии 4, наблюдающееся вплоть до полного исчерпания субстрата окисления либо кислорода в среде инкубации митохондрий, то его добавление к изолированным митохондриям в отсутствие какого-либо субстрата окисления должно вызвать кратковременное изменение в поглощении кислорода за счет принятия или отдачи им электронов в электронтранспортную цепь митохондрий.

Действительно в следующем эксперименте добавление БХШ 310 к митохондриям озимой пшеницы, окисляющим малат, в состоянии 4 вызывало увеличение скорости дыхания в состоянии 4 и снижение коэффициента ДК, наблюдавшееся

вплоть до истощения кислорода в среде инкубации митохондрий.

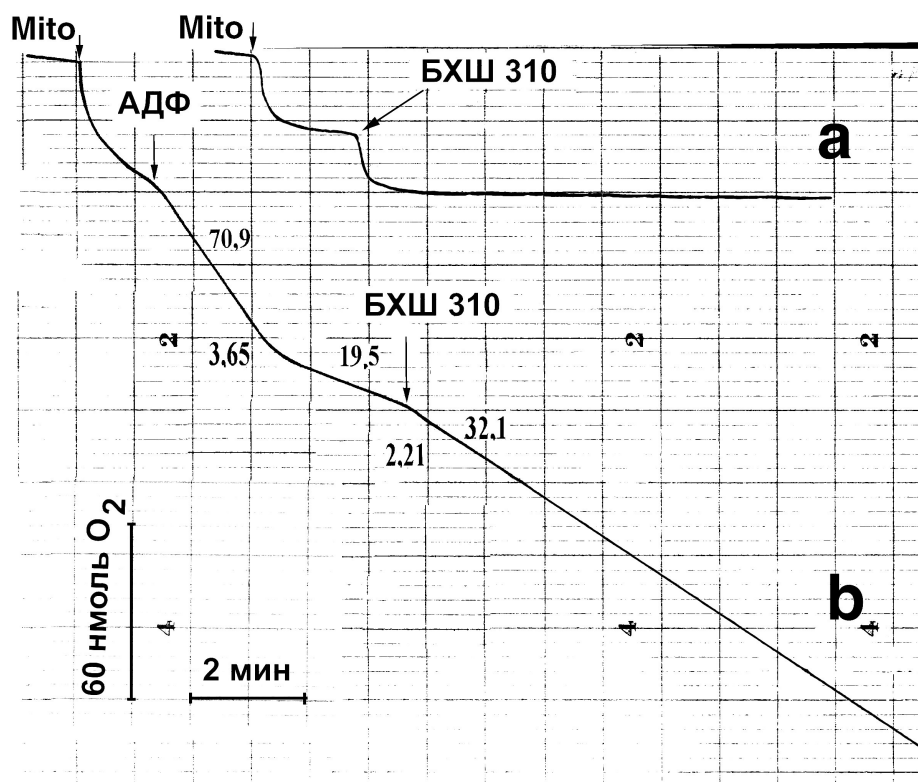


Рис. 71. Влияние БХШ 310 (0.5 мг/мг митохондриального белка) на энергетическую активность митохондрий. Линия **a** – в отсутствие субстрата окисления в среде инкубации; линия **b** – в присутствии 10 мМ малата + 10 мМ глутамата в среде инкубации. Стрелки показывают добавление митохондрий (Mito), АДФ и БХШ 310. Цифры над линией показывают скорости потребления кислорода митохондриями. Цифры под линией показывают коэффициент дыхательного контроля.

В отсутствии же какого-либо субстрата окисления (метаболическое состояние 1) добавление БХШ 310 к митохондриям озимой пшеницы вызывало поглощение кислорода митохондриями, но уже после 1 мин инкубации этот эффект исчезал и скорость потребления кислорода митохондриями падала до нуля (рис. 71). Следовательно, можно заключить, что в отсутствии субстрата окисления восстановленная форма БХШ 310 окисляется и отдает электроны в электронтранспортную цепь, в то время как в присутствии субстрата окисления БХШ 310 функционирует не

только как донор электронов для комплекса IV, но и как акцептор электронов для комплекса I, в связи с чем и наблюдается его постоянное разобщающее действие. Кроме того, эти данные указывают на то, что БХШ 310 из стрессированных растений существует как стабильная восстановленная форма.

Таким образом, все полученные к настоящему времени данные указывают на то, что БХШ 310 способен шунтировать поток электронов по основному цитохромному пути таким образом, что электроны с комплекса I в обход убихинона и комплекса III могут идти через БХШ 310 на цитохром c и комплекс IV.

17 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За прошедшие с открытия стрессовых белков растений и начала данной работы два десятилетия достигнут несомненный прогресс в изучении стрессовых белков и понимании их физиологической роли. К настоящему времени усилиями большого числа исследователей установлено, что, как ответ растительного организма на низкотемпературный стресс, так и формирование закаленного состояния растения начинается непосредственно с момента начала охлаждения и протекает при участии определенных, стрессовых, белков. Кроме значительного числа вовлеченных в эти процессы ферментов, к настоящему времени выделено несколько семейств белков, специфически связанных с этими процессами (Колесниченко и др., 2000б). Это шапероны и дегидрины (Close, 1996, 1997), антифризные белки (Griffith et al., 1997; Antikainen, Griffith 1997), многофункциональные белки, регулирующие процессы трансляции и транскрипции (Ladomery, 1997) и белки, разобщающие во время низкотемпературного стресса окисление и фосфорилирование (Vercesi et al., 1995; Maia et al., 1998; Vercesi, 2001; Voinikov et al., 1998), к числу которых и принадлежит изучаемый нами белок БХШ 310.

Как было установлено при помощи электрофореза нативных белков, содержания этого белка наиболее сильно возрастает во время низкотемпературного стресса у проростков озимой ржи, у которой во время стресса данный белок становится одним из преобладающих цитоплазматических нативных белков. Наличие данного белка или иммунохимически родственных ему нативных белков установлено и у всех других изученных злаков. Показано, что молекулярная масса нативного белка равна 310 кДа, при этом белок состоит из двух типов субъединиц с молекулярными массами 56 и 66 кДа (Колесниченко и др., 1996). Этот стрессовый белок обозначен как БХШ 310 (белок холодового шока с молекулярной массой 310 кДа) (Колесниченко и др.,

1996, 1997). Использование линий нехолодостойкого сорта озимой пшеницы Безостая 1 с замещением хромосом от холодостойкого сорта Альбидум 114 позволило установить, что конститутивный синтез этого белка контролируется 1 и 6 хромосомами D-генома мягкой пшеницы (Войников и др., 1998). Получение специфической антисыворотки против БХШ 310 позволило провести работы по установлению его внутриклеточной локализации и изучить изменения в его содержании в растениях при действии низкой температуры.

Показано, что понижение стрессирующей температуры вызывает повышение в содержании данного белка. Наибольшее содержание БХШ 310 установлено при температуре 3°C (Колесниченко и др., 1996). Интересно отметить неравномерность изменения содержания этого белка при длительном воздействии на растения низкой положительной температуры (закаливании). Значительное увеличение его содержания происходит в течение первого часа гипотермии. Затем в течение первых суток воздействия закалывающей температуры содержание БХШ 310 снижается. По данным рокет-иммуноэлектрофореза, отмечается повторное увеличение содержания БХШ 310 после третьих суток воздействия закалывающей температуры (Колесниченко и др., 1997).

Необходимо отметить, что в ходе дальнейших исследований было установлено, что у закаленных растений термогенез (одна из основных функций БХШ 310) выражен в значительно меньшей степени, чем у незакаленных (Kolesnichenko et al., 2001e). Поскольку при изучении функционирования БХШ 310 в митохондриях выявлено различие разобщающей способности конститутивно синтезируемой и стрессовой форм данного белка (Pobezhimova et al., 2001), то можно предполагать, что синтезирующаяся у закаленных растений конститутивная форма БХШ 310 не переходит в стрессовую. В таком случае, функции БХШ 310 в ходе закаливания растений к низкой температуре должны

отличаться от тех, которые он выполняет во время кратковременной гипотермии.

Содержание БХШ 310 в незакаленных проростках высокоустойчивых сортов и генотипов озимой пшеницы выше, чем у неустойчивых (Колесниченко, 1988; Колесниченко и др., 1990). Этот факт позволяет утверждать, что уровень конститутивного синтеза БХШ 310 оказывает влияние на устойчивость сорта озимой пшеницы к действию низкой температуры. Это можно также связать с наличием двух форм данного белка, причем конститутивно синтезируемая форма в данном случае выступает как «депо», позволяющее более устойчивым сортам быстрее отвечать на воздействие низкой температуры (Kolesnichenko et al., 2001g).

Поиск белков, иммунохимически родственных БХШ 310, в клеточных фракциях показал, что у озимой ржи имеется целый ряд иммунохимически родственных БХШ 310 нативных белков, состоящих из двух типов субъединиц с мол. массами 56 и 66 кДа. Изучение состава этих белков в цитоплазматической, митохондриальной и ядерной фракциях показало, что состав высокомолекулярных белков этого семейства различен в этих фракциях. Если белки с мол. массами 230, около 140 и 56 и 66 кДа обнаружены во всех клеточных фракциях, то в цитоплазме присутствовали также белки с мол. массами 470 и 310 кДа, в ядерной фракции - белки с мол. массами 470 и 320-330 кДа, а в митохондриальной фракции - белок с мол. массой 310 кДа. Окраска гелей бромистым этидием позволила установить, что цитоплазматический белок с молекулярной массой 310 кДа и ядерные белки с мол. массами 320 - 330 кДа и 470 кДа являются нуклеопротеинами (Kolesnichenko et al., 2000a; Kolesnichenko et al., 2001g).

Под действием холодового шока в цитоплазме происходит увеличение содержания высокомолекулярных белков, и в то же время значительно уменьшается содержание низкомолекулярных иммунохимически родственных БХШ 310

белков. Подобная картина наблюдается и в ядерной и митохондриальной фракциях. То, что по данным вестерн-блоттинга с антителами на БХШ 310, содержание низкомолекулярных иммунохимически родственных ему белков во всех клеточных фракциях резко снижается под действием холодового шока (Kolesnichenko et al., 2000a) позволяет нам предполагать, что они являются своего рода «депо», обеспечивающим быстрое увеличение содержания высокомолекулярных белков во время стресса.

Показано отсутствие *in vivo* разобщающей активности БХШ 310 в митохондриях двудольных растений (Grabelnych et al., 2001c). В модельных экспериментах на митохондриях гороха продемонстрирован разобщающий дыхание и фосфорилирование эффект добавления к ним БХШ 310 и возможность элиминировать этот эффект добавлением антисыворотки против БХШ 310 (Войников и др., 2001a). Отсутствие *in vivo* разобщающего эффекта БХШ 310 у исследованных двудольных растений (Grabelnych et al., 2001c) позволяет утверждать, что механизм разобщения окисления и фосфорилирования во время низкотемпературного стресса с участием этого белка является специфичным для злаков и представляет собой относительно недавнее эволюционное приобретение.

Полученные при изучении влияния низкотемпературного стресса на состав и характеристики белков семейства БХШ 310 данные представляют интерес в связи с тем, что бактериальные белки холодового шока (CSPs), по существующим в настоящее время представлениям, являются РНК-шаперонами и принимают участие в регуляции и обеспечении функционирования процессов трансляции во время низкотемпературного стресса (Jiang et al., 1997). В связи с этим можно предположить, что цитоплазматический белок с мол. массой 470 кДа, который под действием низкотемпературного стресса начинает связывать нуклеиновые кислоты, также может участвовать в

регулировании процессов трансляции во время низкотемпературного стресса. В то же время тот факт, что некоторые белки семейства БХШ 310 под действием низкотемпературного стресса высвобождают нуклеиновые кислоты, связанные с ними ранее, позволяет выдвинуть предположение, что эти нуклеиновые кислоты могут быть «маскированными» РНК, синтез белков с которых происходит во время низкотемпературного стресса. Полученные данные также позволяют говорить о существовании в цитоплазме озимой ржи двух форм стрессового белка БХШ 310 – «конститутивно синтезируемой», связанной с нуклеиновой кислотой и «стрессовой», не связанной с нуклеиновой кислотой (Pobezhimova et al., 2001; Kolesnichenko et al., 2001g). Этот вывод подтверждает также тот факт, что при исследовании влияния этих двух форм БХШ 310 на энергетическую активность митохондрий было показано различие в способности разобщать окисление и фосфорилирование в митохондриях этих двух форм белка БХШ 310 (Pobezhimova et al., 2001).

Стрессовый белок БХШ 310 в растительной клетке во время кратковременной гипотермии является посредником в ядерно-митохондриальных взаимодействиях, разобщая окисление и фосфорилирование в митохондриях и, следовательно, вызывая термогенез (Побежимова и др., 1996; Voinikov et al., 1998). При изучении влияния данного белка на функционирование митохондрий растений показано, что БХШ 310 по-разному воздействует на комплексы дыхательной цепи митохондрий. Наиболее сильное увеличение нефосфорилирующего дыхания отмечено при функционировании первого комплекса дыхательной цепи. На остальные комплексы митохондриальной дыхательной цепи этот белок влияет в значительно меньшей степени (Grabelnych et al., 2001a). При этом стрессовый белок БХШ 310, синтезирующийся у трехсуточных проростков озимой ржи конститутивно, обладает более слабой разобщающей

активностью, чем находящийся в клетке во время низкотемпературного стресса (Pobezhimova et al., 2001).

При инкубации изолированных митохондрий с данным белком при 0 °C происходит быстрая и сильная ассоциация БХШ 310 с митохондриями (Kolesnichenko et al., 2001c), причем зафиксирован эффект термогенеза, вызываемый добавлением к митохондриям БХШ 310 (Voinikov et al., 2001).

К настоящему времени в митохондриях растений обнаружен целый ряд белков, при функционировании которых также происходит разобщение окисления и фосфорилирования. В связи с этим необходимо было установить, является ли БХШ 310 белком, родственным этим известным белкам, либо он является их активатором, либо данный стрессовый белок является белком с отличным от известных механизмом функционирования. При изучении влияния ингибиторов известных растительных разобщающих белков (PUMP и StUCP) на разобщающую активность БХШ 310 установлено, что бычий сывороточный альбумин в концентрациях, связывающих свободные жирные кислоты и полностью подавляющих активность известных разобщающих белков, не оказывает влияния на разобщающую активность БХШ 310 (Войников и др., 2001a). В то же время показано, что БХШ 310 не является активатором альтернативной циаидрезистентной оксидазы, поскольку вызванные его добавлением увеличение нефосфорилирующего дыхания и термогенез ингибируется KCN (Войников и др., 2001б). В связи с этим выдвинуто предположение, что механизм разобщающего действия БХШ 310 отличается от механизма действия известных разобщающих растительных белков.

Необходимо отметить то, что добавление к изолированным митохондриям злаков антисыворотки против БХШ 310 позволяет устранить разобщающий эффект этого стрессового белка (Войников и др., 2001a; Kolesnichenko et al., 2001c). Поскольку известно, что антитела могут преципитировать антиген только на поверхности наружной мембраны

митохондрий, то данный факт позволяет сделать вывод, что БХШ 310, вызывающий разобщение окисления и фосфорилирования, ассоциирован с митохондриями с наружной стороны наружной мембраны органелл (Kolesnichenko et al., 2001c). Следовательно, уже локализация БХШ 310 в митохондриях отличается от всех остальных белков, оказывающих влияние на степень сопряжения окисления и фосфорилирования, являющихся интегральными белками внутренней мембраны митохондрий.

Ингибиторный анализ показал, что разобщающее действие данного белка блокируется ингибиторами начального (комплекс I) и конечного (комплекс IV) участков дыхательной цепи митохондрий. В то же время было обнаружено, что на его функционирование не оказывает влияние блокирование промежуточного звена дыхательной цепи (комплекса III) антимицином А. Следовательно, локализуясь в наружной мембране митохондрий, БХШ 310 связан с начальным и конечным участком дыхательной цепи, по-видимому, шунтируя пункт сопряжения в комплексе III, и, возможно, в комплексе I. Можно полагать, что его взаимодействие с комплексом I происходит в зоне тесного контакта наружной и внутренней митохондриальных мембран. Известно, что такое взаимодействие между белками наружной и внутренней мембран происходит во время транспорта цитозольных белков в митохондрии и образования Tim/Tom комплекса (Agarraberes, Dice, 2001; Zhang, Glaser, 2002). Существуют данные о сходном процессе при образовании митохондриальной проницаемой поры, когда также формируется комплекс из компонентов внутренней и наружной мембран (Bernardi et al., 1998; Kowaltowski et al., 2001).

Так как активность БХШ 310 не блокируется антимицином А, но блокируется KCN, то было предположено, что данный белок переносит электроны на мобильный переносчик цитохром с, вызывая его восстановление.

Действительно, в модельном эксперименте *in vitro* была установлена способность БХШ 310 восстанавливать окисленный цитохром с. Эти данные, полученные *in vitro*, были подтверждены в опытах *in organello*. В этих экспериментах, было установлено что, если добавление БХШ 310 к изолированным митохондриям в присутствии какого-либо субстрата окисления вызвало увеличение скорости дыхания в состоянии 4, наблюдающееся вплоть до полного исчерпания субстрата окисления либо кислорода в среде инкубации митохондрий, то его добавление к изолированным митохондриям в отсутствие какого-либо субстрата окисления вызвало лишь кратковременное изменение в поглощении кислорода за счет отдачи им электронов в электронтранспортную цепь митохондрий. Более того, в присутствии БХШ 310 последующее добавление экзогенного цитохрома с к окисляющим малат митохондриям приводило к усилению потребления кислорода вследствие образования дополнительной трансмембранной цепи переноса электронов.

Таким образом, на основании всей совокупности полученных данных, можно предположить следующую схему функционирования БХШ 310 в дыхательной цепи митохондрий злаков (Рис. 72). В месте тесного контакта внутренней и наружной митохондриальных мембран происходит перенос электронов с комплекса I дыхательной цепи на стрессовый белок БХШ 310, по-видимому, находящийся в ассоциации с какими-либо интегральными белками наружной мембраны (возможно поринами). Далее электроны переносятся на мобильный переносчик цитохром с, который в свою очередь передает их на комплекс IV дыхательной цепи митохондрий. Таким образом, в результате электроны минуют второй пункт сопряжения и наблюдается разобщение процессов окисления и фосфорилирования. Энергия, выделяющаяся при этом, рассеивается в виде тепла.

На основании полученных нами данных можно утверждать, что функции, выполняемые стрессовым белком

БХШ 310 в злаках, в основном совпадают с теми, которые специализированные разобщающие митохондриальные белки выполняют у животных и растений. Эти функции следующие: термогенез и регуляция образования АФК в митохондриях.

БХШ 310

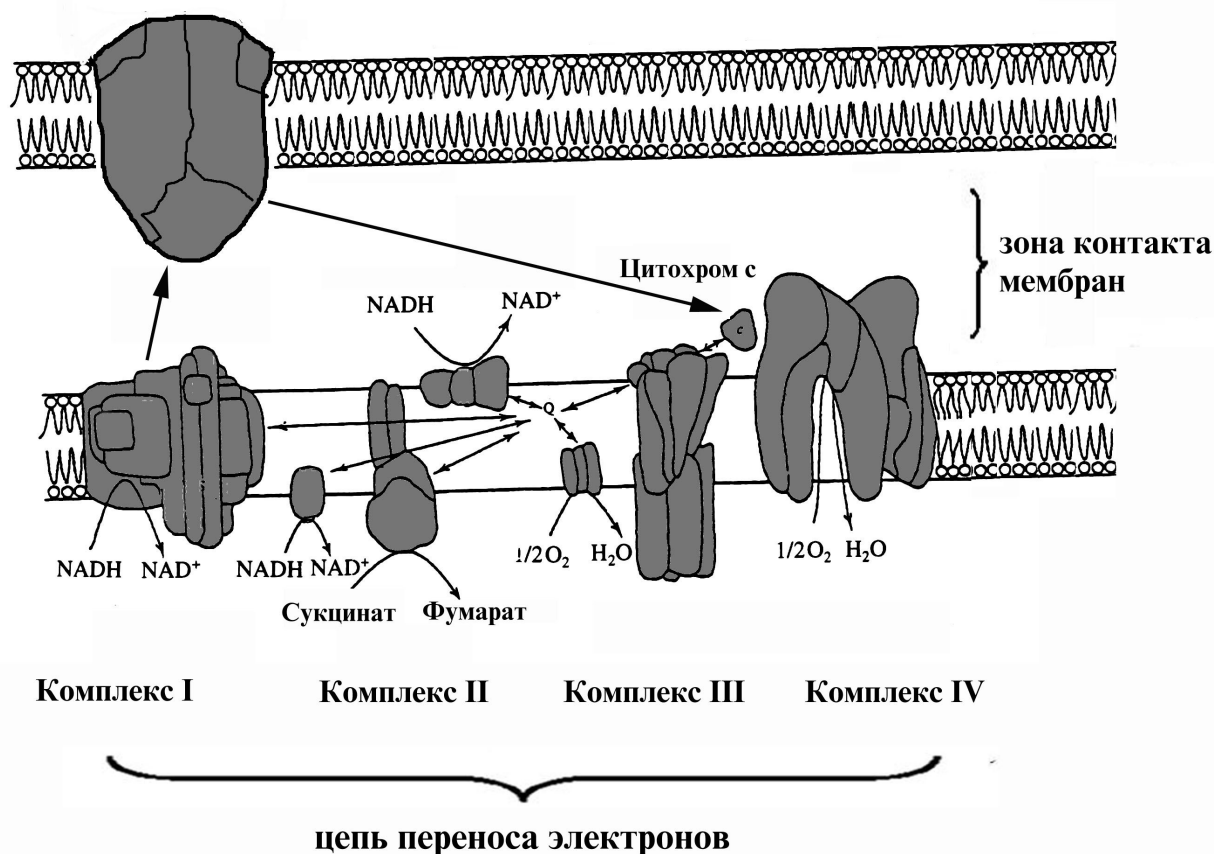


Рис. 72. Предлагаемая схема функционирования стрессового белка БХШ 310 в качестве звена, шунтирующего дыхательную цепь митохондрий растений

В опытах *in organello* установлено, что добавление к БХШ 310 митохондриям озимой пшеницы вызывает термогенез и, как следствие этого термогенеза, повышение температуры по сравнению с контрольными митохондриями (Войников и др., 2001б; Voinikov et al., 2001). Добавление к митохондриям антисыворотки против БХШ 310, преципитирующей эндогенный БХШ 310 и повышающей степень сопряжения

окисления и фосфорилирования митохондрий, вызывало снижение температуры в ячейке по сравнению с контрольными митохондриями.

Опыты *in vivo* также подтвердили термогенную функцию БХШ 310. Инфильтрация проростков данным белком вызывало увеличение разницы температур между живыми и убитыми проростками во время низкотемпературного стресса. Инфильтрация же проростков озимой пшеницы антисывороткой против БХШ 310 вызывала уменьшение этой разницы (Войников и др., 2001в; Kolesnichenko et al., 2001f). Сравнение влияния инфильтрации БХШ 310 и антисыворотки против БХШ 310 на разницу температур между живыми и убитыми проростками озимой пшеницы, а также отсутствие влияния неиммунной сыворотки на температуру проростков (Kolesnichenko et al., 2003) позволяет сделать вывод, что ингибирование термогенеза, вызываемое антисывороткой против БХШ 310, не является артефактом, а происходит вследствие элиминации термогенного действия БХШ 310 (Войников и др., 2001в; Kolesnichenko et al., 2001f).

Данные о влиянии интенсивности холодового шока на температуру проростков озимой пшеницы свидетельствуют об увеличении выработки тепла побегами проростков озимой пшеницы (Войников, Корзун, 1984; Vojnikov et al., 1984; Kolesnichenko et al., 2001e). Этот факт позволяет утверждать, что процесс генерации тепла проростками озимой пшеницы является одним из физиологически регулируемых механизмов защиты растения от низкотемпературного стресса, а не является вторичным эффектом изменения метаболизма растительной клетки во время низкотемпературного стресса. При этом необходимо отметить, что образование льда в убитых незакаленных проростках озимой пшеницы происходило при той же температуре, что и у живых проростков, но быстрее. Следовательно, можно предположить, что генерация тепла проростками озимой пшеницы позволяет

им получить дополнительное время на подготовку к повреждающему действию образующегося льда.

Сопоставляя полученные нами данные с имеющимися в литературе, можно утверждать, что у озимой пшеницы во время холодового шока функционируют по меньшей мере три термогенные системы, связанные с функционированием митохондрий – альтернативная цианидрезистентная оксидаза, растительные UCP-подобные митохондриальные разобщающие белки (PUMP) и дополнительная термогенная система, связанная с функционированием БХШ 310.

Присутствие трех термогенных систем, связанных с разобщением окисления и фосфорилирования в митохондриях, в проростках холодоустойчивых озимых злаков, по-видимому, связано с особенностями их жизненного цикла, поскольку они вынуждены переживать осенние и весенние заморозки, когда температура в течение короткого промежутка времени падает до 0°C и даже ниже. Озимые злаки имеют многочисленные защитные системы, которые позволяют им во время холодового шока эффективно выкачивать воду из цитоплазмы в апопласт (Левитт, 1983; Касперска-Палач, 1983) и, следовательно, избегать образования кристаллов льда внутри их клеток, а также много других защитных систем, связанных с синтезом различных классов стрессовых белков. Тем не менее, для активации всех этих систем во время низкотемпературного стресса необходимо определенное время. В этом случае быстрое разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях и связанный с этим процессом термогенез позволяет растению выиграть время, необходимое для активации этих систем. В связи с этим присутствие трех термогенных систем у озимых злаков является приспособлением к озимому образу жизни и способом защиты от заморозков и переохлаждения.

Хотя основной физиологической функцией разобщающих белков у животных считается участие в терморегуляции посредством термогенеза, но они также выполняют в

организме и другие функции в связи с защитой от стресса. В частности, одной из наиболее активно изучаемых в настоящее время функций является регуляция образования АФК в митохондриях.

В связи с тем, что одним из наиболее важных последствий образования активных форм кислорода в митохондриях является протекание процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), то исследование влияния БХШ 310 на процессы генерации АФК в митохондриях проводилось путем изучения уровня ПОЛ.

Интересно отметить, что, в отличие от UCP-подобных разобщающих растительных белков (Kowaltowski, Vercesi, 1999), добавление экзогенного БХШ 310 к митохондриям вызывало индукцию ПОЛ в условиях искусственно вызванного окислительного стресса (Зыкова и др., 2000; Zyкова et al., 2000). В то же время необходимо отметить, что стрессовый белок БХШ 310 не оказывал индуцирующего влияния на ПОЛ в неактивных митохондриях и в модельном эксперименте с индукцией ПОЛ в эмульсии линолевой кислоты, что позволяет предположить, что этот белок не обладает прямой прооксидантной активностью, а оказывает влияние на ПОЛ в митохондриях вследствие того, что он является редокс-агентом (Kolesnichenko et al., 2001i; Zyкова et al., 2001a,b). Полученные в ходе экспериментов результаты позволяют предположить, что БХШ 310 обладает апоптической активностью, и что одна из функций БХШ 310 состоит, возможно, в «разборке» определенной части митохондрий, наиболее пострадавших от действия температурного стресса, путем активации ПОЛ и последующих митоптоза и апоптоза (Скулачев, 1998). В связи с этим необходимо отметить, что в растениях реализуется несколько отличный от животных вариант программируемой клеточной смерти, определяемый как «программируемый онкозис» (Jones, 2000). В то же время известно, что необходимым условием апоптоза является выход из митохондрий в цитоплазму цитохрома c (Reed, 1997),

который является «апоптическим фактором – 2» (Араф-2) (Jones, 2000). Следовательно, можно предположить, что БХШ 310 в растении связывается с мембранными белками и образует комплекс, подобный известной митохондриальной поре.

Несмотря на то, что при изучении влияния экзогенного БХШ 310 на ПОЛ в изолированных митохондриях был установлен факт возможности определенного прооксидантного действия экзогенного БХШ 310, эксперименты с изучением влияния на ПОЛ антисыворотки против данного белка, преципитирующей эндогенный БХШ 310 и устраняющей его разобщающую активность, показали, что добавление к митохондриям антисыворотки против БХШ 310 значительно индуцирует ПОЛ в митохондриях (Kolesnichenko et al., 2001d). Причем в митохондриях, изолированных из проростков озимой пшеницы и кукурузы, подвергнутых низкотемпературному стрессу, сыворотка вызывает более сильную индукцию ПОЛ (Kolesnichenko et al., 2001d; Zyкова et al., 2001a,b).

Эксперименты *in vivo* показали, что инфильтрация проростков стрессовым белком БХШ 310 вызывает значительное уменьшение уровня ПОЛ в проростках во время последующего низкотемпературного стресса (Kolesnichenko et al., 2001i; Zyкова et al., 2001b), что свидетельствует о том, что из двух активностей (прооксидантной и антиоксидантной) в целом растении во время низкотемпературного стресса превалирует антиоксидантная активность.

Эти результаты позволяют сделать вывод, что эндогенный БХШ 310 в митохондриях так же, как и известные к настоящему времени растительные УСР-подобные разобщающие белки (Kowaltowski, Vercesi, 1999), оказывает антиоксидантный эффект за счет общего снижения содержания кислорода в растительной клетке вследствие разобщения окисления и фосфорилирования в митохондриях. В этом случае можно считать, что, в соответствии с гипотезой

В.П. Скулачева (1994, 1998), любые белки, разобщающие окисление и фосфорилирование в митохондриях во время низкотемпературного стресса, являются частью антиокислительной защиты клетки.

В целом, полученные результаты позволяют утверждать, что митохондриальные разобщающие белки принимают участие в защите незакаленных растений от холодового шока – быстрого снижения температуры. При этом происходит в первую очередь активация существующих систем (альтернативной оксидазы, митохондриального разобщающего белка PUMP за счет увеличения количества свободных жирных кислот и стрессового белка БХШ 310 за счет перехода из неактивной в активную форму), вызывающих термогенез и локальное повышение температуры. Это повышение температуры позволяет растениям выиграть время для адаптационной перестройки метаболизма – изменению состава и структуры мембран, транспорту необходимых метаболитов через мембраны, синтезу стрессовых белков (в том числе разобщающих белков), дегидратации клетки и т.д., что позволяет растению адаптироваться к воздействию низкой температуры. В то же время у закаленных к действию низкой температуры растений адаптационная перестройка метаболизма уже проведена, в связи с чем им нет необходимости тратить энергетические ресурсы организма на повышение температуры растения.

Таким образом растения, ведущие, в отличие от животных, прикрепленный образ жизни и вследствие этого не имеющие возможности реализовать стратегию «избегания» воздействия стрессового фактора, вынуждены развивать большое число адаптационных биохимических механизмов, позволяющих им выживать в этих условиях. Ярким примером этого является наличие в митохондриях злаков не одной системы регулируемого разобщения, как у животных, а как минимум трех, одной из которых является изученный нами стрессовый белок БХШ 310.

18 ЛИТЕРАТУРА

Абелев Г.И. Модификация метода преципитации в агаре при сравнении двух систем антиген-антитело // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1969. №3. С.118-121.

Авхадиева Г.И., Карасев Г.С., Хохлова Л.П. Влияние холодового закаливания и криостресса на полипептидный состав митохондрий озимой пшеницы // Казан. ун-т. Казань, 1993. 14 С.:ил. Библиогр.,: 11 назв. Рус. ДЕП. в ВИНТИ 27.01.93, N181-B93.

Авхадиева Г.И., Хохлова Л.П., Карасев Г.С. Состав полипептидов митохондрий озимой пшеницы при адаптации к низким температурам // Физиология растений. 1995. Т.42, №N1. С.100-106.

Азарашвили Т.С., Кудин А.П., Полтева Н.А., Кудзина Л.Ю., Евтодиенко Ю.В. Полипептидный состав субмитохондриальных фракций нормальной ткани печени и гепатомы Зейделя // Биохимия. 1997. Т.62. С.833-841.

Акимова Г.П., Родченко О.П. Изменение активности пероксидазы в клетках корня кукурузы в условиях низкой температуры // Физиолого-биохимические аспекты устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды. Иркутск, 1976. С.4-5.

Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992. 148 с.

Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи современной биологии. 1991. Т.111. Вып.6. С.66-78.

Барашкова Э.А. Динамика компонентного состава легкорастворимых белков и изоферментов некоторых ферментов озимой пшеницы после промораживания // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. 1979. Т.64, №3. С.147-153.

Барашкова Э.А. Изменение электрофоретического спектра растворимых белков озимой пшеницы в период перезимовки // Бюл. Всесоюз. ин-та растениеводства. 1971. Вып.20. С.21-23.

Беличенко Н.И., Грязина Т.И. Некоторые стороны метаболизма белков зимостойких и слабозимостойких пшениц // Изв. Сев.-Кавк. науч. центра высш. шк. Естеств. науки. 1980. №4. С. 86-88.

Браун Г.Н. Механизм белкового синтеза в связи с морозостойкостью растений // Холодостойкость растений. М.: Колос, 1983. С.124-131.

Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в растительных мембранах // М., 1972. 252 с.

Войников В.К. Температурный стресс и митохондрии растений. Н.: Наука. Сиб. Отд-ние, 1987. 136 с.

Войников В.К. Участие свободных жирных кислот в регуляции митохондриальной активности у озимой ржи при охлаждении // Физиол. и биохим. культ. раст. 1980. Т.12, №5. С.474-479.

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

Войников В.К., Грабельных О.И., Побежимова Т.П., Корзун А.М., Сумина О.Н., Турчанинова В.В., Колесниченко А.В. Стрессовый разобщающий растительный белок БХШ 310 индуцирует термогенез в митохондриях пшеницы при гипотермии *in vitro* // ДАН. 2001б. Т.377, №4. С.565-567.

Войников В.К., Грабельных О.И., Побежимова Т.П., Корзун А.М., Турчанинова В.В., Колесниченко А.В. Влияние различных термогенных систем митохондрий на температуру проростков озимой пшеницы во время холодового шока // ДАН. 2001в. Т.378, №5. С.700-702.

Войников В.К., Колесниченко А.В., Побежимова Т.П., Варакина Н.Н. Первая и шестая хромосомы D-генома озимой мягкой пшеницы контролируют экспрессию белка холодового шока с молекулярной массой 310 кД // Физиология растений. 1998. Т.45, №5. С.688-692.

Войников В.К., Константинов Ю.М., Негрук В.И. Генетические функции митохондрий растений. Новосибирск: Наука, 1991. 183 с.

Войников В.К., Корзун А.М. Температура тканей побегов озимой пшеницы при холодовом шоке // Известия СО АН СССР, Сер. биол. 1984. №2. С.22 – 25.

Войников В.К., Кoryтов М.В. Низкотемпературная индукция синтеза стрессовых белков в клетках озимой пшеницы // 3 съезд Всерос. об-ва физиологов растений (24-29 июня, 1993 г., Санкт-Петербург): Тез. докл. СПб, 1993. С.518.

Войников В.К., Кoryтов М.В. Синтез стрессовых белков в проростках озимой пшеницы при закаливании к холоду // Физиология растений. 1991. Т.38, №5. С.960-969.

Войников В.К., Лузова Г.Б., Кравец В.С. Разобщающее действие свободных жирных кислот при «старении» изолированных митохондрий пшеницы // Известия СО АН СССР. 1983. №5. С.81-85.

Войников В.К., Побежимова Т.П., Варакина Н.Н., Жиров Е.Г. Влияние отдельных хромосом морозоустойчивой мягкой пшеницы на морозоустойчивость растений и энергетическую активность митохондрий при гипотермии // Генетика. 1987. Т.23, №2. С.287-294.

Войников В.К., Рудиковский А.В., Побежимова Т.П., Варакина Н.Н. Влияние белков, выделенных из проростков кукурузы после теплового шока, на энергетическую активность митохондрий кукурузы // Физиология растений. 1988. Т.35, №5. С.837-840.

Гималов Ф.Р., Вахитов В.А., Чемерис А.В. Индукция белков холодового шока у пшеницы // Генет. механизмы устойчивости раст. к неблагоприят. факторам среды: Тез. сообщ., Иркутск. 8-12 июля, 1991. Новосибирск, 1991. С.90.

Гималов Ф.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Специфичность синтеза белков холодового шока в проростках отдельных представителей трибы *Triticeae* семейства злаковых // Физиология растений. 1996. Т.43, №2. С.262-266.

Грабельных О.И., Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Сумина О.Н., Пивоварова Н.Ю., Войников В.К. Изучение возможности свободных жирных кислот выступать в качестве субстрата окисления в митохондриях озимой пшеницы // Вестник

Харьковского национального аграрного университета, Серия Биология. 2003. №5(3). С.7-15.

Дорофеев Н.В. Влияние накопления сахаров на формирование морозостойкости озимой пшеницы в Восточной Сибири в зависимости от возраста растений // Зерновые культуры. 1998. №1. С.17-19.

Дрейпер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // Генная инженерия растений. М.: Мир. 1991. С.236–276.

Жиров В.К., Мерзляк М.Н., Кузнецов Л.В. Перекисное окисление мембранных липидов холодостойких растений при повреждении отрицательными температурами // Физиология растений. 1982. Т.29, №6. С.1045-1053.

Зыкова В.В., Грабельных О.И., Владимирова С.В., Королева Н.А., Колесниченко А.В., Войников В.К. Стрессовый разобщающий белок БХШ 310 индуцирует перекисное окисление липидов в митохондриях пшеницы при гипотермии // Доклады РАН. 2000. Т.372, №4. С.562-564.

Карасев Г.С., Красавцев О.А., Трунова Т.И. Роль белков в адаптации растений к морозу // 3 съезд Всерос. об-ва физиологов растений (24-29 июня, 1993 г., Санкт-Петербург): Тез.докл..6.СПб, 1993. С.601.

Карасев Г.С., Нарлева Г.И., Боруах К.К., Трунова Т.И. Изменение состава и содержания полипептидов в процессе адаптации озимой пшеницы к низким отрицательным температурам // Физиол. и биохим. культ. раст. 1991. Т.23, №5. С.480-486.

Карасев Г.С., Нарлева Г.И., Яценко И.А., Трунова Т.И. Биосинтез белка при адаптации озимых злаков в связи с их морозостойкостью // Влияние внеш. факторов на устойчивость, рост и развитие раст. / Кар. науч. центр РАН. Ин-т биол. Петрозаводск, 1992. С.32-51.

Касперска-Палач А. Механизм закаливания травянистых растений // Холодостойкость растений. М.: Колос, 1983. С.112-123.

Климов С.В., Давыденко С.В., Новицкая Г.В., Астахова Н.В., Карасев Г.С., Суворова Т.А., Трунова Т.И. О причинах

различий в морозостойкости озимой ржи и пшеницы. 2. Влияние холодового закаливания на ультраструктуру хлоропластов, фотосинтез, белковый, липидный и жирнокислотный состав первого листа // Физиология растений. 1993. Т.40, №4. С.627-635.

Колесниченко А.В. Иммунохимическое сравнение белков различающихся по холодоустойчивости генотипов озимой пшеницы.// 3 Всесоюзная конференция молодых ученых по физиологии растительной клетки. Петрозаводск, 18-22 апреля 1988 г. Тез. докл. М., 1988. С.123.

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

Колесниченко А.В., Боровский Г.Б., Войников В.К., Мишарин С.И., Антипина А.И. Характеристика белка из озимой ржи, накапливающегося при гипотермии // Физиология растений. 1996. Т.43, №6. С.894–899.

Колесниченко А.В., Войников В.К. Белки низкотемпературного стресса растений // Отв. ред. В.К. Войников; СО РАН. Сибирский Институт Физиологии и Биохимии растений (СИФИБР). Иркутск: Арт-Пресс, 2003. 196 с.

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

Колесниченко А.В., Грабельных О.И., Побежимова Т.П., Войников В.К. Влияние стрессового белка БХШ 310 на активность цианидрезистентной альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы // Вестник Башкирского университета. 2001. №2 (1). С.26-28.

Колесниченко А.В., Мишарин С.И., Антипина А.И., Войников В.К. / Способ определения морозоустойчивости сортов озимой пшеницы: А.С. 1607087 СССР, МКИ5.А01 G7/00; Сиб. институт физиол. и биохим. растений.- N4668791/30-13; Заявл. 28.03.89; зарегистрир. 15.07.90.

Колесниченко А.В., Остроумова Е.А., Зыкова В.В., Войников В.К. Белки четырех видов злаков, иммунохимически

родственные стрессовому белку 310 кД // Физиология растений. 2000а. Т.47, №2. С.199-202.

Колесниченко А.В., Побежимова Т.П., Войников В.К. Характеристика белков низкотемпературного стресса растений // Физиология растений. 2000б. Т.47, №4. С.624-630.

Колоша О.И., Костенко И.И. Морозостойкость озимых зерновых культур в связи с водным режимом и ходом метаболических процессов // Устойчивость растений к неблагоприятным температурным условиям среды. Киев: Наук. думка, 1976. С.5-19.

Колоша О.И., Петрова О.В., Мишустина П.С. Синтез белка при отрицательных температурах у различных по морозостойкости сортов озимой пшеницы // Докл. АН УССР. Сер. биол. 1978. №10. С.938-941.

Константинов Ю.М., Луценко Г.Н., Подсосонный В.А., Зыкова В.В. Возможный механизм нарушения транскрипции ДНК в митохондриях кукурузы при перекисном окислении мембранных липидов // Физиол. и биохим. культ. раст. 1989б. Т.21, №5. С.484-486.

Константинов Ю.М., Луценко Г.Н., Подсосонный В.А., Зыкова В.В. Исследование перекисного окисления липидов в растительных митохондриях в связи с проблемой температурного стресса // Стрессовые белки растений. Н.: Наука, 1989а. С.88-113.

Кравец В.С. Развитие представлений об адаптации растений к низким температурам // Физиол. и биохим. культ. раст. 1996. Т.28, №3. С.167-182.

Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова Л.И. Перекисное окисление липидов и холодовой фактор // Новосибирск: Наука, 1988. 192 с.

Левитт Дж. Повреждения и выживание после замораживания и связь с другими повреждающими воздействиями // Холодостойкость растений. Москва: Колос, 1983. С.10-22.

Марков Е.Ю., Хавкин Э.Е. Иммунохимический анализ сложных белковых смесей // Электрофоретические методы анализа белков. Новосибирск: Наука, 1981. С.68-97.

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

Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. физиол. раст. / ВИНТИ, 1989. Т.6. С.1-168.

Мишарин С.И., Антипина А.И., Войников В.К. Влияние холодового шока на антигенный состав озимой ржи и пшеницы // Физиол. и биохим. культ. раст. 1997. Т.29, №3. С.215-219.

Мишарин С.И., Колесниченко А.В., Антипина А.И., Войников В.К. Влияние низких температур на синтез белков озимой ржи и пшеницы // 2 Съезд Всерос. о-ва физиол. раст., Минск, 24-29 сент., 1990: Тез. докл. Ч.2. М. 1992. С139.

Новожилова О.А., Арефьева Л.П., Кириченко Е.Б., Прусаков А.Н., Семихов В.Ф. Изменение полипептидного состава белков узла кущения пшеницы в процессе зимовки // Бюл. гл. ботан. сада РАН. 1994. №169. С. 6-40.

Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. Москва: Наука, 1983. 304 с.

Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.

Петрова О.В. Изменения в белковой системе озимой пшеницы в процессе низкотемпературной адаптации и криострессе // Устойчивость растений к действию отрицательных температур. Киев: Наук. думка, 1984. С.90-109.

Пешкова А.А., Дорофеев Н.В. Формирование зимостойкости озимой пшеницы в зависимости от условий вегетации и уровня минерального питания // Агрохимия. 1998. №6. С.26-33.

Побежимова Т.П., Войников В.К. Биохимические и физиологические аспекты функционирования убихинона // Биологические мембраны. 1999. Т.16, №5. С.485-491.

Побежимова Т.П., Грабельных О.И., Сумина О.Н., Колесниченко А.В., Войников В.К. Локализация белков, иммунохимически родственных субъединицам стрессового белка

310 кД, в митохондриях озимой пшеницы // Физиология растений. 2001. Т.48, №2. С.204-209.

Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Войников В.К., Варакина Н.Н., Боровский Г.Б. Стрессовый белок 310 кД при гипотермии влияет на энергетическую активность растительных митохондрий // Доклады РАН. 1996. Т.350. С.715 - 718.

Родченко О.П. Рост и реакции адаптации к низким температурам // Рост и устойчивость растений. Новосибирск: Наука, 1988. С.144-154.

Самыгин Г.А. О причинах гибели растительных клеток от мороза // В кн.: Физиология приспособления и устойчивости растений при интродукции / Новосибирск: Наука, 1969. С.71-85.

Самыгин Г.А. Причины вымерзания растений. М. 1974. 191 с.

Скулачев В.П. Возможная роль активных форм кислорода в защите от вирусных инфекций // Биохимия. 1998. Т.63. С.1691-1694.

Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 1989. 564 с.

Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С.63-64.

Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. М.: Наука, 1979. 352 с.

Усманов И.Ю., Рахманкулова З.Ф., Кулагин А.Ю. Экологическая физиология растений: Учебник. / М.: Логос, 2001. 224 с.

Шугаев А.Г. Некоторые особенности структурной организации и окислительной активности дыхательной цепи митохондрий растений // Успехи современной биологии. 1991. Т.111, №2. С.178-191.

Abromeit M., Askman P., Sarnighausen E., Dorffling K. Accumulation of high-molecular-weight proteins in response to cold hardening and abscisic acid treatment in two winter wheat varieties with different frost tolerance // J. Plant Physiol. 1992. V.140, N5. P.617-622.

Agarraberes F.A., Dice J.F. Protein translocation across membranes // BBA. 2001. V.1513. P.1-24.

Almeida A.M., Jarmuszkiewicz W., Khomsi H., Arruda P., Vercesi A.E., Sluse F.E. Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling protein sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit // Plant Physiol. 1999. V.119. P.1323-1329.

Anderson J.V., Li Qin-Bao, Haskel D.W., Guy C.L. Spinach BiP and an HSP 70 are differentially regulated during cold acclimation: Jt. Annu. meet. Amer. Soc. Plant Physiol., Can. Soc. Plant Physiol., Minneapolis, Minn., July 31 Aug. 4, 1993: Sci. program; Abstr. Pap. // Plant Physiol. 1993. V.102, N1. Suppl. P.149.

Anderson L., Borg H., Mikaelsson M. Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gels of graded porosity // FEBS Lett. 1972. V.20. P.199-202.

Antikainen M., Griffith M., Zhang J., Hon W.C., Yang D.S.C. PihakaskiMaunsbach K. Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns, and roots by tissue printing // Plant Physiol. 1996. V.110, N3. P.845-857.

Antikainen M., Griffith M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals // Physiol. Plantarum. 1997. V.99, N3. P.423-432.

Arora R., Wisniewski M.E., Davis G. 60 kD Polypeptide in cold acclimated bark tissue of peach is heatstable and related to dehydrin family of proteins: In. Annu.meet. Amer. Soc. Plant Physiol., Can. Soc. Plant Physiol., Minneapolis, Minn., July 31 - Aug. 4, 1993: Sci. program; Abstr. Pap. // Plant Physiol. 1993. V.102, N1. Suppl. P.84.

Atici O., Nalbantoglu B. Antifreeze proteins in higher plants // Phytochem. 2003. V.64. P.1187-1196.

Bacon B.R., Britton R.S. The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? // Hepatology. 1990. V.11. P.127-133.

Bernardi P., Basso E., Colonna R., Costantini P., Di Lisa F., Eriksson O., Fontaine E., Forte M., Ichas F., Massari S., Nicolli A., Petronilli V., Scorrano L. Perspectives on the mitochondrial permeability transition // BBA. 1998. V.1365. P.200-206.

Bouillaud F., Coulpan E., Pecqueur C., Ricquier D. Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4 // BBA. 2001. V.1504. P.107-119.

Boveris A., Cadenas E. Superoxide Dismutates / Ed. L.W. Oberley // V.2, CRC Press, Boca Ration, 1982. P.15-30.

Boveris A., Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxid. General properties and effect of hyperbaric oxygen // Biochem. J. 1973. V.134. P.707-716.

Cadenas E., Boveris A. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protonophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria // Biochem. J. 1980. V.188. P.31-37.

Cadenas E., Boveris A., Ragan C.I., Stoppani A.O.M. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome *c* reductase from beaf-heart mitochondria // Arch. Biochem. Biophys. 1977. V.180. P.248-257.

Casolo V., Braidot E., Chiandussi E., Macri F., Vianello A. The role of mild uncoupling and non-coupled respiration in the regulation of hydrogen peroxide generation by plant mitochondria // FEBS Lett. 2000. V.474. P.53-57.

Castilho R.F., Kowaltowski A.J., Meinicke A.R., Vercesi A.E. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate or t-butyl hydroperoxide in the presence of Ca^{2+} : effect of coenzyme Q redox state // Free Radic. Biol. Med. 1995. V.18. P.55-59.

Castilho R.F., Meinicke A.R., Almeida A.M., Hermes-Lima M., Vercesi A.E. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate is potentiated by Ca^{2+} and induces lipid peroxidation and alterations in membrane proteins // Arch. Biochem. Biophys. 1994. V.308. P.158-163.

Chakraborti T., Das S., Mondal M., Roychoudhury S., Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview // Cell. Signal. 1999. V.11. P.77-85.

Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs // Physiol. Rev. 1979. V.59. P.527-605.

ChapotChartier M.P., Schouler C., Lepeuple A.S., Gripon J.C., Chopin M.C. Characterization of *cspB*, a cold-shock-inducible gene from *Lactococcus lactis*, and evidence for a family of genes homologous to the *Escherichia coli* *cspA* major cold shock gene // J. Bacteriol. 1997. V.179, N17. P.5589-5593.

Chou M., Chen Y.-M., Lin C.-Y. Thermotolerance of isolated mitochondria associated with heat shock proteins // Plant Physiol. 1989. V.89, N2. P.617-621.

Close T.J. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature // Physiol. Plantarum. 1997. V.100, N2. P.291-296.

Close T.J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins // Physiol. Plantarum. 1996. V.97, N5. P.795-803.

Considine M.J., Daley D.O., Whelan J. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango // Plant Physiol. 2001. V.126. N4. P.1619-1629.

Costa A.D.T., Nantes I.L., Jezek P., Leite A., Arruda P., Vercesi A.E. Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening // J. Bioenerg. Biomembr. 1999. V.31. N5. P.527-533.

Crespi M.D., Zabaleta E.J., Pontis H.G., Salerno G.L. Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat // Plant Physiol. 1991. V.96, N3. P.887-891.

Crosatti C., Rizza F., Cattivelli L. Accumulation and characterisation of the 75 kDa protein induced by low temperature in barley // Plant Sci. 1994. V.97, N1. P.39-46.

Cullen K.E., Sarge K.D. Characterization of hypothermia-induced cellular stress response in mouse tissues // J. Biol. Chem. 1997. V.272, N3. P.1742-1746.

Danno S., Nishiyama H., Higashitsuji H., Yokoi H., Xue J.H., Itoh K., Matsuda T., Fujita J. Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress // BBRC. 1997. V.236, N3. P.804-807.

Day D.A., Millar A.H., Wiskich J.T., Whelan J. Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria // Plant Physiol. 1994. V.106. P.1421-1426.

de la Roche I.A., Pomeroy M.K., Andrews C.J. Changes in fatty acid composition in wheat cultivars of contrasting hardness // Criobiology. 1975. V.12, N5. P.506-512.

Douce R. Mitochondria in higher plants: Structure, functions and biogenesis// Academic Press, New York, 1985. 327 p.

Downs C.A., Heckathorn S.A. The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants // FEBS Lett. 1998. V.430. P.246-250.

Elthon T.L., McIntosh L. Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria // Procl. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V.84. P.8399-8403.

El-Wadawi R., Bowler K. The effect of *in vivo* heat treatment on blowfly flight muscle mitochondrial function: effects on partial reactions of the respiratory chain // J. Therm. Biol. 1996. V.21. P.403-408.

Estabrook R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios // Methods in Enzymology. New-York - London: Acad. Press, 1967. V.10. P.41-47.

Fleury Ch., Sanchis D. The mitochondrial uncoupling protein-2: current status // Int. J. Biochem. Cell Biol. 1999. V.31. P.1261-1278.

Fontaine E., Eriksson O., Ichas F., Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. // J. Biol. Chem. 1998. V.273. P.12662-12668.

Franco G.R., Garratt R.C., Tanaka M., Simpson A.J.G., Pena S.D.J. Characterization of a *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of the Y-box binding protein // Gene. 1997. V.198, N1-2. P.5-16.

Fu Ping, Robertson A.I., Weninget A., Wilen R.W., O'Connor B.J., Gusta L.W. Differential expression of dehydrins in spring and winter cereals during cold acclimation: Abstr. Pap. Annu. Meet.

Amer. Soc. Plant Physiologists, Portland, Ore., July 30 - Aug. 3, 1994
// Plant Physiol. 1994. V.105, N1. Suppl. P.169.

Garlid K. D., Jaburek M., Jezek P. Mechanism of uncoupling protein action // Biochem. Soc. Trans. 2001. V.29. PT6. P.803-805.

Garlid K.D., Jaburek M., Jezek P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins // FEBS Lett. 1998. V.438. P.10-14.

Garlid K.D., Jaburek M., Jezek P., Varecha M. How do uncoupling proteins uncouple? // BBA. 2000. V.1459. P.383-389.

Gatenby A.A., Viitanen P.V. Structural and functional aspects of chaperonin-mediated protein folding // Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1994. V.45. P.469-491.

Gilmour S.J., Lin C.T., Thomashow M.F. Purification and properties of *Arabidopsis thaliana* COR (cold-regulated) gene polypeptides COR15AM and COR6.6 expressed in *Escherichia coli* // Plant Physiology. 1996. V.111, N1. P.293-299.

Gonzalez-Meler M.A., Ribas-Carbo M., Giles L., Siedow J.N. The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway // Plant Physiol. 1999. V.120. P.765-772.

Grabelnych O., Pobezhimova T., Kolesnichenko A. Voinikov V. Complex I of winter wheat mitochondria respiratory chain is the most sensitive to uncoupling action of plant stress-related uncoupling protein CSP 310 // J. Therm. Biol. 2001a. V.26, N1, P.47-53.

Grabelnych O.I., Pobezhimova T.P., Kolesnichenko A.V., Voinikov V.K. Stress protein CSP 310 cause oxidation and phosphorylation uncoupling during low-temperature stress only in cereal but not in dycotyledone mitochondria// J. Immunoassay Immunochem. 2001c. V.22, N3. P.275-287.

Graumann P., Marahiel M.A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain // TIBS. 1998. V.23. P.286-290.

Graumann P., Marahiel M.A. Effects of heterologous expression of CspB, the major cold shock protein of *Bacillus subtilis*, on protein synthesis in *Escherichia coli* // Mol. Gen. Gen. 1997. V.253, N6. P.745-752.

Graumann P., Marahiel M.A. Some like it cold: Response of microorganisms to cold shock // Arch. Microbiol. 1996. V.166, N5. P.293-300.

Graumann P., Wendrich T.M., Weber M.H.W., Schroder K., Marahiel M.A. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures // Mol. Microbiol. 1997. V.25, N4. P.741-756.

Grenier G., Tremolieres A., Therrien H.P., Willemot C. Changements dans les lipides de la luzerne en conditions menant a l'endurcissement au froid // Can. J. Bot. 1972. V.50, N8. P.1681-1689.

Grenier G., Willemot C. Lipid changes in roots of frost hardy and less hardy alfalfa varieties under hardening conditions // Cryobiol. 1974. V.11, N4. P.324-331.

Griffith M., Ala P., Yang D.S.C., HonWai-Ching, Moffatt B.A. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves // Plant Physiol. 1992. V.100, N2. P.593-596.

Griffith M., Antikainen M., Hon W.C., PihakaskiMaunsbach K., Yu X.M., Chun J.U., Yang D.S.C. Antifreeze proteins in winter rye // Physiol. Plantarum. 1997. V.100, N2. P.327-332.

Griffith M., Marentes E., Mlynerz A., Brush R.A., Knight C.A. The role of apoplastic protein sin frost tolerance of winter rye: Jt. Annu. meet. Amer. Soc. Plant Physiol., Can. Soc. Plant Physiol., Minneapolis, Minn., July 31 - Aug. 4, 1993: Sci. program; Abstr. Pap. // Plant Physiol. 1993. V.102, N1. Suppl.. P.9.

Guidot D.M., Repine J.E., Kitlowski A.D., Flores S.C., Nelson S.K., Wright R.M., McCord J.M. Mitochondrial respiration scavenges extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism // J. Clin. Invest. 1995. V.96. P.1131-1136.

Guillot-Salomon T., Remy R., Cantrel C., Demandre C., Moreau F. Phospholipids and polypeptides in the outer membrane of maize mitochondria // Phytochem. 1997. V.44. P.29-43.

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

Guy C., Haskell D., Neven L., Klein P., Smelser C. Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach // *Planta*. 1992a. V.188. P.265-270.

Guy C., Huber J.L.A., Huber S.C. Sucrosephosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature // *Plant Physiol*. 1992b. V.100, N1. P.502-508.

Halliwell B., Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance // *Am. J. Clin. Nutr*. 1993. V.57. P.715S-725S.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. - Oxford: Claredon Press, 1989. P.215.

Hendrick J.P., Hartl F.-U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins // *Annu. Rev. Biochem*. 1993. V.62. P.349-384.

Hon W.C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y.C., Yang D.S.C. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins // *Plant Physiol*. 1995. V.109, N3. P.879-889.

Hoshino T., Odaria M., Yoshida M., Tsuda S. Physiological and biochemical significance of antifreeze substances in plants // *J. Plant Res*. 1999. V.112. P. 255-261.

Houde M., Daniel C., Lachapelle M., Allard F., Laliberte S., Sarhan F. Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues // *Plant J*. 1995. V.8, N4. P.583-593.

Houde M., Danyluk J., Laliberte J.F., Passart E., Dhundsa R.S., Sarhan F. Cloning, characterization and expression of cDNA encoding a 50 kD protein specifically induced by cold acclimation in wheat // *Plant Physiol*. 1992. V.99, N4. P.1381-1387.

Huq S., Palmer J.M. Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria // *FEBS Lett*. 1978. V.95. P.217-220.

Iida H., Yahara I. A heat shock-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows constitutive synthesis of two heat shock proteins and altered growth // *J. Cell Biol*. 1984. V.99, N4. P.1441-1450.

Ismail A.M., Hall A.E., Close T.J. Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during

seedling emergence of cowpea // Plant Physiol. 1999. V.120. P.237-244.

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

Jarmuszkiewicz W. Uncoupling proteins in mitochondria of some plants and some microorganisms // Acta Biochim. Pol. 2001. V.48. N1. P.145-155.

Jarmuszkiewicz W., Miyasaka A.A., Sluse-Goffart C.M., Sluse F.E., Vercesi A.E. Linoleic acid-induced activity of plant uncoupling mitochondrial protein in purified tomato fruit mitochondria during resting, phosphorylating, and progressively uncoupled respiration // J. Biol. Chem. 1998. V.273. P.34882-34886.

Jezek P. Fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling proteins // J. Bioenerg. Biomembr. 1999. V.31. P.457-465.

Jezek P., Borecky J., Zackova M., Costa A.D., Arruda P. Possible basic and specific functions of plant uncoupling proteins (pUCP) // Biosci. Rep. 2001. V.21. N2. P.237-245.

Jezek P., Costa A.D.T., Vercesi A.E. Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism // J. Biol. Chem. 1997. V.272, N39. P.24272-24278.

Jezek P., Engstova H., Zackova M., Vercesi A.E., Costa A.D.T., Arruda P., Garlid K.D. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins // BBA. 1998. V.1365. P.319-327.

Jezek P., Garlid K.D. Mammalian mitochondrial uncoupling proteins // Int. J. Biochem. Cell Biol. 1998. V.30. P.1163-1168.

Jezek P., Zackova M., Kosarova J., Rodrigues E.T.S., Madeira V.C.M., Vicente J.A.F. Occurrence of plant-uncoupling mitochondrial protein (PUMP) in diverse organs and tissues of several plants // J. Bioenerg. Biomembr. 2000. V.32. N6. P.549-561.

Jiang W.N., Hou Y., Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone // J. Biol. Chem. 1997. V.272, N1. P.196-202.

Jones A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? // TIPS. 2000. V.5. P.225-230.

Kasperska-Palacz A., Dlugokecka E., Breitenwald J., Weinslinska B. Physiological mechanisms of frost tolerance: possible role of protein in plant adaptation to cold // *Biol. Plant.* 1977a. V.19, N1. P.10-17.

Kasperska-Palacz A., Jasinska M., Sobczyc E.A., Weinslinska B. Physiological mechanisms of frost tolerance: subcellular localisation and some physical-chemical properties of protein fractions accumulated under cold treatment // *Biol. Plant.* 1977b. V.19, N1. P.18-26.

Kean E.A., Gutman M., Singer T.P. Studies on the respiratory chain-linked nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XXII. Rhein, a competitive inhibitor of the dehydrogenase // *J. Biol. Chem.* 1971. V.246. P.2346-2353.

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

Klingenberg M. Uncoupling protein – a useful energy dissipator // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999. V.31, N5. P.419-430.

Klingenberg M., Huang S.-G. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue // *BBA.* 1999. V.1415. P.271-296.

Klingenberg M., Winkler E., Echtay K. Uncoupling protein, H⁺ transport and regulation // *Biochem. Soc. Trans.* 2001. V.29. PT 6. P.806-811.

Kolesnichenko A., Grabelnych O., Pobezhimova T., Voinikov V. The association of plant stress uncoupling protein CSP 310 with winter wheat mitochondria in vitro during exposure to low temperature // *J. Plant Physiol.* 2000c. V.156, N5-6. P.805-807.

Kolesnichenko A., Grabelnych O., Zykova V., Koroleva N., Pobezhimova T., Konstantinov Yu., Voinikov V. Influence of CSP 310 and CSP 310-like proteins from cereals on mitochondrial energetic activity and lipid peroxidation in vitro and in vivo // *BMC Plant Biol.* 2001i. V.1, N1. P.1-6.

Kolesnichenko A., Ostroumova E., Zykova V., Voinikov V. The comparison of proteins with immunochemical affinity to stress protein 310 kD in cytoplasmatic proteins of winter rye, winter wheat, Elymus, and maize // *J. Therm. Biol.* 1999. V.24, N4. P.211-215.

Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Sumina O.N., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K. An influence of antiserum against winter wheat stress uncoupling protein CSP 310 on energetic activity of some plant species mitochondria // J. Immunoassay Immunochem. 2001c. V.22, N 1. P.75-83.

Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Koroleva N.A., Pobezhimova T.P., Korzun A.M., Voinikov V.K. A difference between temperatures of hardened and non-hardened winter wheat seedlings shoots during cold stress // Annual Wheat Newslett. 2001e. V.47. P.158-159.

Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Koroleva N.A., Pobezhimova T.P., Korzun A.M., Zykova V.V., Voinikov V.K. The influence of different plant thermogenic systems on heat generation in shoots of winter wheat seedlings during cold stress // Annual Wheat Newslett. 2001f. V.47. P.169-170.

Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Zykova V.V., Koroleva N.A., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K. An influence of stress protein CSP 310 and antiserum against this protein on lipid peroxidation in cereal mitochondria // J. Immunoassay Immunochem. 2001d. V.22, N2. P.113-126.

Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Zykova V.V., Koroleva N.A., Pobezhimova T.P., Korzun A.M., Voinikov V.K. Influence of stress protein CSP 310 and antiserum against this protein on oxygen uptake, lipid peroxidation, and temperature of winter wheat seedling shoots during cold stress // J. Immunoassay Immunochem. 2003. V.24. P.41–55.

Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Zykova V.V., Tourchaninova V.V., Koroleva N.A., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K. An influence of known plant uncoupling proteins function on lipid peroxidation in winter wheat seedlings shoots during cold stress // Annual Wheat Newslett. 2001h. V.47. P.160-163.

Kolesnichenko A.V., Pobezhimova T.P., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Voinikov V.K. An influence of cold stress on temperature of maize shoots // Maize Genet. Coop. Newslett. 2001b. V.75. P.24

Kolesnichenko A.V., Zykova V.V., Grabelnych O.I., Sumina O.N., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K. Screening of mitochondrial

proteins in winter rye, winter wheat, elymus and maize with an immunochemical affinity to the stress protein 310 kD and their intramitochondrial localization in winter wheat // J. Term. Biol. 2000b. V.25, N3. P.245-249.

Kolesnichenko A.V., Zykova V.V., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Voinikov V.K. The study of an influence of cold stress on lipid peroxidation at different mitochondrial respiratory chain complexes function in maize mitochondria // Maize Genet. Coop. Newslett. 2001a. V.75. P.25.

Kolesnichenko A.V., Zykova V.V., Voinikov V.K. A comparison of the immunochemical affinity of cytoplasmic, mitochondrial and nuclear proteins of winter rye (*Secale cereale* L.) to a 310 kD stress protein in control plants and during exposure to cold stress // J. Term. Biol. 2000a. V.25, N3. P.203-209.

Kolesnichenko A.V., Zykova V.V., Voinikov V.K. Regulation of plant uncoupling protein CSP 310 activity in winter wheat seedlings shoots during cold stress. // Annual Wheat Newslett. 2001g. V.47. P.156-158.

Korshunov S.S., Korkina O.V., Ruuge E.K., Skulachev V.P. Starkov A.A. Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O_2^- and H_2O_2 by mitochondria in the resting state // FEBS Lett. 1999. V.435. P.215–218.

Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // FEBS Lett. 1997. V.416. P.15-18.

Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Bechara E.J.H., Vercesi A.E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alteration induced by Ca^{2+} ions: a proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation // J. Biol. Chem. 1996b. V.271. P.2929-2934.

Kowaltowski A.J., Costa A.D.T., Vercesi A.E. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain // FEBS Letters. 1999. V.425. P.213-216.

Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. Ca^{2+} -Induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state // Am. J. Physiol. 1995. V.269. P.141-147.

Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species // FEBS Lett. 1996a. V.378. P.150-152.

Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress // FEBS Lett. 2001. V.495. P.12-15.

Kowaltowski A.J., Netto L.E.S., Vercesi A.E. The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition: evidence for the involvement of reactive oxygen species in this mechanism // J. Biol. Chem. 1998. V.273. P.12766-12769.

Kowaltowski A.J., Vercesi A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress // Free Radical Biol. Medicine. 1999. V.26. P.463-471.

Kumar S., Patil B.C., Sinha S.K. Cyanide resistant respiration is involved in temperature rise in ripening mangoes // BBRC. 1990. V.168. P.818-822.

Kunclova D., Liska V., Svoboda P., Svobodova J. Cold-shock response of protein, RNA, DNA and phospholipid synthesis in *Bacillus subtilis* // Folia Microbiologica. 1995. V.40, N6. P.627-632.

Labhilili M., Joudrier P., Gautier M.F. Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance // Plant Sci. 1995. V.112, N2. P.219-230.

Ladomery M. Multifunctional proteins suggest connections between transcriptional and post-transcriptional processes // Bioessays. 1997. V.19, N10. P.903-909.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T-4 // Nature. 1970. V.227, N5259. P.680-685.

Laloi M., Klein M., Riesmeier J.W., Muller-Rober B., Fleury C., Bouilland F., Ricquier D. A plant cold-induced uncoupling protein // Nature. 1997. V.389. P.135-136.

Landry J., Berner D., Ghretien P., Nicole L.M., Tanguay R.M., Marceau N. Synthesis and degradation of heat shock proteins during

development and decay of thermotolerance // *Carder Res.* 1982. V.42. P.2457-2461.

Leach G.R., Krab K., Whitehouse D.G., Moore A.L. Kinetic analysis of the mitochondrial quinol-oxidizing enzymes during development of thermogenesis in *Arum maculatum* L. // *Biochem. J.* 1996. V.317. P.313-319.

Lee C.P. Biochemical studies of isolated mitochondria from normal and diseased tissues // *BBA.* 1995. V.1271. P.21-28.

Leenders H.J., Berendes H.D., Helmsing P.J. Nuclear-mitochondrial interactions in the control of mitochondrial respiratory metabolism // *Sub. Cell. Biochem.* 1974. V.3. P.119-147.

Lennon A.M., Neueschwander U.H., Ribas-Carbo M., Giles L., Ryals J.A., Siedow J.N. The effects of salicylic acid and tmv infection upon the alternative oxidase of tobacco // *Plant Physiol.* 1997. V.115. P.783-791.

Li W.W., Hsiung Y.C., Wong V., Galvin K., Zhou Y.H., Shi Y., Lee A.S. Suppression of grp78 core promoter element-mediated stress induction by the dbpA and dbpB (YB-1) cold shock domain proteins // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V.17, N1. P.61-68.

Lindquist S. The heat shock response // *Ann. Rev. Biochem.* 1986. V.55. P.1151-1191.

Liu S.S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria // *Biosc. Rep.* 1997. V.17. P.259-272.

Los D.A., Ray M.K., Murata N. Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes for desaturases in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Mol. Microbiol.* 1997. V.25, N6. P.1167-1175.

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

Maia I.G., Benedetti C.E., Leite A., Turcinelli S.R., Vercesi A.E., Arruda P. AtPUMP: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein // *FEBS Lett.* 1998. V.429. P.403-406.

Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V.96. P.8271-8276.

McCaig T.N., Hill R. Cyanide-insensitive respiration in wheat: cultivar differences and effects of temperature, carbon dioxide and oxygen // Can. J. Bot. 1977. V.55. P.549-555.

McKersie B.D. The role of oxygen free radicals in mediating freezing and desiccation stress in plants / Active Oxygen / Oxidative Stress and Plant Metabolism. // Eds. E. Pell, K. Steffen. Am. Soc. of Plant Physiol. 1991. P.107-118.

Meeuse B.J.D. Thermogenic respiration in aroids // Annu. Rev. Plant Physiol. 1975. V.26. P.117-126.

Meeuse B.J.D., Buggeln R.G. Time, space, light and darkness in the metabolic flare-up of the *Sauromatum* appendix // Acta Bot. Neerl. 1969. V.18. P.159-172.

Millar A.H., Wiskich J.T., Whelan J., Day D.A. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria // FEBS Lett. 1993. V.329. P.259-262.

Minotti G., Aust S.D. An investigation into the mechanism of citrate-Fe²⁺-dependent lipid peroxidation // Free Radic. Biol. Med. 1987. V. 3. P. 379-387.

Molina A., Mena M., Carbonero P., GarciaOlmedo F. Differential expression of pathogen-responsive genes encoding two types of glycine-rich proteins in barley // Plant Mol. Biol. 1997. V.33, N5. P.803-810.

Moore A.L., Proudlove M.O. Mitochondria and sub-mitochondrial particles // Isolation of membranes and organelles from plant cells / Eds. Hall T.L., Moore A.L. London: Acad. Press. 1983. P.153-184.

Moore A.L., Siedow J.N. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria // BBA. 1991. V.1059. P.121-140.

Moynihan M.R., Ordentlich A., Raskin I. Chilling-induced heat evolution in plants // Plant Physiol. 1995. V.108. P.995-999.

Murata N., Los D.A. Membrane fluidity and temperature perception // Plant Physiol. 1997. V.115. P.875-879.

Murayama S., Handa H. Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial uncoupling proteins in wheat: wheat UCP genes are not regulated by low temperature // *Mol. Gen. Genet.* 2000. V.264. P.112-118.

Murcha M.W., Huang T., Whelan J. Import of precursor proteins into mitochondria from soybean tissues during development // *FEBS Lett.* 1999. V.464. P.53-59.

Nantes I.L., Fagian M.M., Catisti R., Arruda P., Maia I.G., Vercesi A.E. Low temperature and aging-promotored expression of PUMP in potato tuber mitochondria // *FEBS Lett.* 1999. V.457. P.103-106.

Negre-Salvayre A., Hirtz C., Carrera G. Cazenave R., Trolly M., Salvayre R., Penicaud L., Casteilla L. A role for the uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial peroxide generation // *FASEB J.* 1997. V.11. P.809-815.

Nicholls D.G., Rial E. A history of the first uncoupling protein, UCP1 // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999. V.31, N5. P.399-406.

Nishiyama H., Itoh K., Kaneko Y., Kishishita M., Yoshida O., Fujita J. A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth // *J. Cell Biol.* 1997. V.137. N4. P.899-908.

Nover L., Hellmund D., Neuman D., Scharf K.-D., Serfling E. Heat shock response of eucaryotic cells // *Biol. Zentrablatt. Band.* 1984. V.103. P.357-435.

Ordentlich A., Linzer R.A., Raskin I. Alternative respiration and heat evolution in plants // *Plant Physiol.* 1991. V.97. P.1545-1550.

Palou A., Pico C., Bonet M. L., Oliver P. The uncoupling protein, thermogenin // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1998. V.30. P.7-11.

Parkin K.L., Marangoni A., Jackman R., Yada R., Stanley D. Chilling injury. A review of possible mechanisms // *J. Food Biochem.* 1989. V.13. P.127-153.

Pastore D., Fratianni A., Di Pede S., Passarella S., Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. // *FEBS Lett.* 2000. V.470. P.88-92.

Petit P.X., Susin S.A., Zamzami N., Mignotte B., Kroemer G. Mitochondria and programmed cell death: back to the future // FEBS Lett. 1996. V.369. P.7-13.

Pfanner N., Craig E.A., Honlinger A. Mitochondrial preprotein translocase // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1997. V.13. P.25 –51.

PihakaskiMaunsbach K., Griffith M., Antikainen M., Maunsbach A.B. Immunogold localization of glucanase-like antifreeze protein in cold acclimated winter rye // Protoplasma. 1996. V.191, N3-4. P.115-125.

Pobezhimova T., Grabelnych O., Kolesnichenko A., Voinikov V. The comparison of uncoupling activity of constitutently synthesized and stress-induced forms of winter rye stress uncoupling protein CSP 310 // J. Therm. Biol. 2001. V.26, N2. P.95-101.

Pobezhimova T.P., Voinikov V.K., Varakina N.N. Inactivation of complex I of the respiratory chain of maize mitochondria incubated *in vitro* by elevated temperature // J. Therm. Biol. 1996. V.21. P.283-288.

Popov V.N., Simonian R.A., Skulachev V.P., Starkov A.A. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria // FEBS Lett. 1997. V.415. P.87-90.

Purvis A. C., Shewfelt R. L., Gegogaine J. W. Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit // Physiol. Plantarum. 1995. V.94. P.743-749.

Reed J.C. Cytochrome *c*: can't live with it – can't live without it // Cell. 1997. V.91. P.559-562.

Rhoads D.M., McIntosh L. The salicylic acid-inducible alternative oxidase gene *aox1* and genes encoding pathogenesis-related proteins share regions of sequence similarity in their promoters // Plant Mol. Biol. 1993. V.21. P.615-624.

Rhoads D.M., McIntosh L. Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression // Plant Cell. 1992. V.4. P.1131-1139.

Rich P. Quinol oxidation in *Arum maculatum* mitochondria and its application to the assay, solubilization and partial purification of the alternative oxidase // FEBS Lett. 1978. V.96. P.252-256.

Rich P.R., Bonner W.D. Jr. The sites of superoxid anion generation in higher plant mitochondria // Arch. Biochem. Biophys. 1978. V.188. P.206-213.

Richter C., Gogvadze V., Laffranchi R., Schlapbach R., Schweizer M., Suter M., Walter P., Yaffee M. Oxidants in mitochondria: from physiology to disease // BBA. 1995. V.1271. P.67-74.

Ricquier D., Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance // J. Physiol. 2000b. V.529. P.3-10.

Ricquier D., Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP // Biochem. J. 2000. V.345. P.161-179.

Robertson A.J., Gusta L.V., Reaney M.J.T., Ishikawa M. Identification of proteins correlated with increased freezing tolerance in bromegrass (*Bromus inermis* Leyss. cv. Manchar) cell cultures.// Plant Physiol. 1988. V. 86, N 2. P. 344-347.

Robertson A.J., Weninger A., Wilen R.W., Fu Ping, Gusta L.V. Comparison of dehydrin gene expression and freezing tolerance in *Bromus inermis* and *Secale cereale* grown in controlled environments, hydroponics, and the field.// Plant Physiol. 1994. V.106, N3. P.1213-1216.

Rougvie A.E., Lis J.T. The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D.melanogaster* is transcriptionally engaged // Cell. 1988. V.54. P.795-804.

Rustin P., Dupont J., Lance C. Involvement of lipid peroxy radicals in the cyanide-resistant electron transport pathway // Physiol. Veg. 1984. V.22, N5. P.643-663.

Sakamoto T., Bryant D.A. Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 // Mol. Microbiol. 1997. V.23, N6, P.1281-1292.

Samec S., Seydoux J., Dulloo A.G. Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: Mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate? // FASEB J. 1998. V.12. P.715-724.

Sarhan F., Chevrier N. Regulation of RNA synthesis by DNA-dependent RNA polymerases and RNAses during cold acclimation in winter and spring wheat // *Plant Physiol.* 1985. V.78, N2. P.250–255.

Sarhan F., Ouellet F., VazquezTello A. The wheat wcs120 gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals // *Physiol. Plantarum.* 1997. V.101, N2. P.439-445.

Sato N., Maruyama K. Differential regulation by low temperature of the gene for an RNA-binding protein, rbpA3, in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* strain M3. // *Plant Cell Physiol.* 1997. V.38. P.81-86.

Sato N., Wada A. Disruption analysis of the gene for a cold-regulated RNA-binding protein, rbpA1, in *Anabaena*: Cold-induced initiation of the heterocyst differentiation pathway // *Plant Cell Physiol.* 1996. V.37, N8. P.1150-1160.

Savitch L.V., Gray G.R., Huner N.P.A. Feedback-limited photosynthesis and regulation of sucrose-starch accumulation during cold acclimation and low-temperature stress in a spring and winter wheat // *Planta.* 1997. V.201, N1. P.18-26.

Scheffler I.E. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives // *Mitochondrion.* 2000. V.1. P.3-31.

Scherphor G.L., Scarpa A., Toorenenbergen A. The effect of localanesthetics on the hydrolysis of free and membrane-bound phospholipids catalysed by various phospholipases. // *BBA.* 1972. V.270. P.226-270.

Sharp P.A., Sugden B., Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose // *Biochemistry.* 1973. V.12. P.3055–3059.

Siedow J.N., Umbach A.L. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity // *BBA.* 2000. V.1459. P.432-439.

Singer, T.P., Ramsay, R.R., Ackrell, B.A.C. Deficiencies of NADH and succinate dehydrogenases in degenerative diseases and miopathies // *BBA.* 1995. V.1271. P.211-219.

Skulachev V.P. Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling // J. Bioenerg. Biomembr. 1999. V.31, N5. P.431-445.

Skulachev V.P. Lowering of the intracellular O₂ concentration as a special function of respiratory systems of the cells // Biochemistry (Moscow), 1994. V.59. P.1910–1912.

Skulachev, V.P. Cytochrome *c* in the apoptotic and antioxidant cascades // FEBS Lett. 1998. V.423. P.275-280.

Skulachev V.P. Why are mitochondria involved in apoptosis? // FEBS Lett. 1996. V.397. P.7-10.

Sluse F.E., Almeida A.M., Jarmuszkiewicz W., Vercesi A.E. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria // FEBS Lett. 1998. V.433. P.237-240.

Smolenska G., Kuiper P.J. Effect of low temperature upon lipid and fatty acid composition of roots and leaves of winterrape plants // Physiol. Plantarum. 1977. V.41, N1. P.29-35.

Strand A., Hurry V., Gustafsson P., Gardestrom P. Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates // Plant J. 1997. V.12, N3. P.605-614.

Stuart J.A., Brindle K.M., Harper J.A., Brand M.D. Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins // J. Bioenerg. Biomembr. 1999. V.31. N5. P.517-525.

Stuart J.A., Cadenas S., Jekabsons M.B., Roussel D., Brand M.D. Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues // BBA. 2001. V.1504. P.144-158.

Sutton H.C., Winterbourn C.C. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in fenton reaction // Free Radic. Biol. Med. 1989. V.6. P.53-60.

Svenning M.M., Rosnes K., Junttila O. Frost tolerance and biochemical changes during hardening and dehardening in contrasting white clover populations // Physiol. Plantarum. 1997. V.101, N1. P.31-37.

Tangeras A., Flatmark T., Bäcktröm D., Ehrenberg A. Mitochondrial iron content not bound in heme and iron-sulfur centers // BBA. 1980. V.589. P.162-175.

Turrens J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain // Biosci. Rep. 1997. V.17. P.3-8.

Turrens J.F., Alexandre A., Lehninger A.L. Ubisemiquinone is the donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria // Arch. Biochem. Biophys. 1985. V.237. P.408-414.

Turrens J.F., Boveris A. Generation of the superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria // Biochem. J. 1980. V.191. P.421-427.

Turrens J.F., Freeman B.A., Crapo J.D. Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes // Arch. Biochem. Biophys. 1982. V.217. P.411-421.

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

Vanlerberghe G.C., McIntosh L. Alternative oxidase: from gene to function // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. V.48. P.703-734.

Vanlerberghe G.C., McIntosh L. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco // Plant Physiol. 1992. V. 100. P. 115-119.

Vanlerberghe G.C., Yip J.Y.H., Parsons H.L. *In organello* and *in vivo* evidence of the importance of the regulatory sulfhydryl/disulfide system and pyruvate for alternative oxidase activity in tobacco // Plant Physiol. 1999. V.121. P.793-803.

Vercesi A. E., Martins I. S., Silva M. A. P., Leite H. M. F., Cuccovia I.M., Chaimovich H. PUMPing plants // Nature. 1995. V.375. P.24.

Vercesi A.E. The discovery of an uncoupling mitochondrial protein in plants // Biosci. Rep. 2001. V.21. N2. P.195-200.

Vercesi A.E., Kowaltowski A.J., Grijalba M.T., Meinicke A.R., Castilho R.F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition // Biosci. Rep. 1997. V.17. P.43-52.

Vierling E. The role of heat shock proteins in plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1991. V.42. P.579-620.

Voinikov V., Grabelnykh O., Pobezhimova T., Korzun A., Sumina O., Tourchaninova V., Kolesnichenko A. Plant stress uncoupling protein CSP 310 caused thermogenesis in winter wheat mitochondria in vitro // J. Plant Physiol. 2001. V.158. P.807-810.

Voinikov V., Pobezhimova T., Kolesnichenko A., Varakina N., Borovskii G. Stress protein 310 kD affects the energetic activity of plant mitochondria under hypothermia // J. Therm. Biol. 1998. V.23. P.1-4.

Vojnikov V., Korzun A., Pobezhimova T., Varakina N. Effect of cold shock on the mitochondrial activity and on the temperature of winter wheat seedlings // Biochem. Physiol. Pflanzen. 1984. V.179. P.327-330.

Watanabe A., Nakazono M., Tsutsumi N., Hirai A. AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. 1999. V.40, N11. P.1160-1166.

Weidner M., Heuel R. Indirect evidence for conformational change in prorelin from wheat seedlings, preadapted to chilling and high temperature // Z. Pflanzenphysiol. 1979. V.94, N5. P.387-398.

Weidner M., Mathee C., Schmitz F.K. Phenotypical temperature adaptation of protein synthesis in wheat seedlings. Qualitative aspects. Involvement of aminoacyl-tRNA-ligases // Plant Physiol. 1982. V.69. P.1281-1288.

Willemot C. Stimulation of phospholipid biosynthesis during frost hardening of winter wheat // Plant Physiol. 1975. V.55, N.2. P.356-359.

Wilson, R.H., Smith B.N. Uncoupling of *Sauromatum spadix* mitochondria as a mechanism of thermogenesis // Z. Pflanzenphysiol. 1971. V.65, N2. P.124-129.

Zhang X-P, Glaser E Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp 70 molecular chaperone // TRENDS Plant Sci. 2002. V.7. P.14-21.

Zoratti M., Szabo I. The mitochondrial permeability transition // BBA. 1995. V.1241. P.139-176.

Zykova V.V., Grabelnych O.I., Antipina A.I., Koroleva N.A., Vladimirova S.V., Kolesnichenko A.V., Pobezhimova T.P., Voinikov V.K. Plant stress-related uncoupling protein CSP 310 caused lipid peroxidation in winter wheat mitochondria under chilling stress // J. Term. Biol. 2000. V.25, N4. P.323-327.

Zykova V.V., Grabelnych O.I., Koroleva N.A., Pobezhimova T.P., Konstantinov Yu.M., Kolesnichenko A.V., Voinikov V.K. An immunochemically related influence to plant stress uncoupling protein CSP 310 proteins in some cereal species on the energetic activity and lipid peroxidation of mitochondria *in vitro* // Annual Wheat Newslett. 2001a. V.47. P.167-169.

Zykova V.V., Kolesnichenko A.V., Grabelnych O.I., Tourchaninova V.V., Voinikov V.K. The influence of cold stress on the peroxidation of lipids in the respiratory chain in the mitochondria of different winter wheats // Annual Wheat Newslett. 2001b. V.47. P.164-165.