Many

Кондакова Марина Александровна

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

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории физиологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Уколова Ирина Владимировна

Официальные оппоненты:

Таланова Вера Викторовна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, главный научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений

Тимофеев Максим Анатольевич, доктор биологических наук; директор научноисследовательского института биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Иркутский государственный университет»; заведующий лабораторией «Проблемы адаптации биосистем» НИИ биологии ФГБОУ ВПО «ИГУ»; профессор кафедры гидробиологии и зоологии беспозвоночных биолого-почвенного факультета ФГБОУ ВПО «ИГУ»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Защита диссертации состоится «25» мая 2017 г. в 10^{00} часов на заседании диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317.

Факс: (3952) 510754; e-mail: matmod@sifibr.irk.ru; веб-сайт: http://www.sifibr.irk.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук

Автореферат разослан «»	2017 г.	
Ученый секретарь		
диссертационного совета		
Д 003.047.01,	0,	
кандидат биологических наук	Applied -	Г.П. Акимова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время благодаря развитию и применению современных методов исследований появляются новые данные об фосфорилирования организации системы окислительного (OXPHOS) изменили митохондрий, которые кардинально существовавшее представление о ее структуре и функциях. Накопленная за последние годы информация указывает на то, что дыхательные ферменты и АТФ-синтаза организованы в более сложные динамичные структуры, так называемые суперкомплексы, которые в свою очередь могут ассоциировать и образовывать длинные цепочки – мегакомплексы. Предполагается, что подобная организация OXPHOS митохондрий способствует более стабильному и эффективному электрон-транспортной цепи, функционированию a также образования опасных интермедиатов реакций (Chaban et al., 2014). Показано, что олигомеризация АТФ-синтазы в митохондриях приводит к формированию изгиба крист (Kuhlbrandt, Davies, 2016), а также усилению локального протонного градиента, необходимого для синтеза ATФ (Strauss et al., 2008).

Несмотря на то, что организация OXPHOS митохондрий растений активно изучается на разных фазах развития, в разных органах, а также у разных видов, имеющейся информации недостаточно и она носит порой характер, т.к. получена с использованием различных противоречивый неионогенных детергентов. Исследования по влиянию факторов среды на состав и активность суперкомплексов пока немногочисленны. В частности, есть данные о действии таких стрессовых факторов, как гипоксия, низкие значения аноксия, тепловой шок, гербициды, кратковременное охлаждение. Результаты этих исследований показывают, что гипоксия, низкие значения рН и аноксия приводят к снижению содержания и активности суперкомплексов, причем эти показатели восстанавливаются до нормы после возвращения растений в оптимальные условия (Millar et al., 2004; Ramirez-Aguilar et al., 2011). В то же время существенных изменений в содержании ассоциаций тепловой дыхательных ферментов В ответ на шок, гербициды кратковременное охлаждение не обнаружено (Taylor et al., 2005). Влияние содержание активность гипотермии состав, И суперкомплексов окислительного фосфорилирования в растительных митохондриях практически не исследовано. В связи с этим, для расширения представления о стрессовом состоянии системы трансформации энергии растительных митохондрий в целом, и в частности, для изучения возможных изменений статуса OXPHOS в низкотемпературной адаптации И стресса изучили гипотермии различной интенсивности на состав, содержание и активность суперкомплексов и комплексов окислительного фосфорилирования, используя в качестве модельного объекта органеллы этиолированных проростков гороха (Pisum sativum L.) сорта "Аксайский усатый 55", нативная организация OXPHOS которых пока слабо изучена.

Целью работы явилось изучение надмолекулярной организации системы окислительного фосфорилирования митохондрий этиолированных проростков гороха и ее изменений в условиях гипотермии различной интенсивности.

Задачи исследования: 1) изучить нативную организацию ОХРНОЅ митохондрий этиолированных проростков гороха; 2) исследовать влияние стрессовых низких температур и закаливания на состав, содержание и активность суперкомплексов и комплексов окислительного фосфорилирования этих органелл; 3) оценить физиологическое состояние проростков гороха в изучаемых условиях (устойчивость к промораживанию и степень развития окислительного стресса), а также изучить влияние гипотермии на интактность и функциональную активность митохондрий.

Положения, выносимые на защиту.

- 1) Система окислительного фосфорилирования митохондрий гороха имеет более сложную надмолекулярную организацию, чем считалось прежде.
- **2**) Гипотермия вызывает снижение содержания и активности большинства суперкомплексов, при этом увеличивается содержание отдельных комплексов I и III_2 . Активность несвязанной формы комплекса I резко возрастает при стрессе.
- 3) Частичная потеря суперкомплексной организации OXPHOS митохондрий проростков гороха является одной из причин снижения функциональной активности органелл в условиях низких температур.

Научная новизна. В результате проведенной работы впервые показано, что в состав OXPHOS митохондрий этиолированных проростков гороха входят как ранее обнаруженные в других растительных видах респирасомы I+III₂+IV_n, так и новые прежде недетектируемые суперкомплексы, такие как: мажорная респирасома I+NDA+III₂+IV, суперкомплекс NDA+NDB+III₂+IV, мегакомплекс $(II+III_2+IV)_n$ и две ATФ-синтасомы а и b-форм – Va(b)+NDA+NDB+AOX. Ассоциация альтернативных ферментов с растительными суперкомплексами выявлена впервые и может способствовать увеличению адаптационных возможностей системы трансформации энергии митохондрий. Установлено, что основная часть внутренних (NDA) и внешних (NDB) альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ. детектируемых используемыми антителами, ассоциирует с суперкомплексами OXPHOS, а альтернативная оксидаза (AOX) в основном находится в свободной несвязанной форме.

различной обнаружено, условиях Впервые что В гипотермии интенсивности уменьшаются содержание активность большинства И суперкомплексов, таких как $I+III_2+IV_n$ I+NDA+III₂+IV Va(b)+NDA+NDB+AOX, что, по-видимому, связано с развитием процессов ПОЛ. Также впервые показано, что в стрессовых условиях распад ассоциаций приводит к накоплению и увеличению активности комплексов I и III и меньшего по размеру суперкомплекса III₂+IV, что сопровождается дальнейшим ростом продукции ΑФК В митохондриях приводит И функциональной активности и интактности органелл. При закаливании распад суперкомплексов сопровождается сохранением активности монокомплекса І на уровне контроля, что совместно с другими факторами способствует переходу OXPHOS митохондрий в менее интенсивный режим работы, позволяет снизить концентрацию АФК в митохондриях и сохранить высокую интактность митохондриальных мембран.

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

Личное участие автора. Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспериментов, в статистической обработке, обобщении и интерпретации полученных данных, а также в подготовке печатных работ. В диссертационной работе использованы экспериментальные материалы, полученные лично автором, а также совместно с сотрудниками СИФИБР СО РАН.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены и обсуждались на Всероссийской научной конференции "Механизмы регуляции растительных органелл" 2014), (Иркутск, биоэнергетической конференции "ЕВЕС 2014" (Лиссабон, Португалия, 2014), VIII Съезде Всероссийского общества физиологов растений и Всероссийской научной конференции с международным участием и школе для молодых "Растения условиях глобальных vчёных локальных природноантропогенных воздействий" (Петрозаводск, климатических И Международной молодежной научно-практической конференции "Россия – Всероссийской Монголия" (Иркутск, 2016), научной конференции "Факторы устойчивости международным участием растений микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде" (Иркутск, 2016).

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

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, объект и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы, включающий 236 работ, и приложения. Работа изложена на 167 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц, 16 рисунков и 6 приложений.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В разделе описываются компоненты OXPHOS растительных митохондрий, рассматриваются современные представления о её надмолекулярной организации, функциональной роли суперкомплексов и возможных механизмах их стабилизации. Представлены данные по влиянию стрессовых факторов среды на содержание и активность суперкомплексов

OXPHOS. Описаны основные физиолого-биохимические механизмы адаптации растительных митохондрий к низкой температуре.

2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали этиолированные проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта "Аксайский усатый 55". Контрольные проростки выращивали 6 суток в темноте при 20 °C. Закаливание пятисуточных этиолированных проростков проводили при 7 °C в течение 7 суток; для мягкого стресса 6-ти суточные проростки дополнительно выдерживали при 2 °C, 7 суток; для жесткого стрессового воздействия проростки промораживали 1,5 часа при минус 7 °C.

Относительную морозоустойчивость проростков определяли по их отрастанию после промораживания.

Определение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) проводили по методу Hodges с соавторами (Hodges et al., 1999).

Митохондрии выделяли согласно ранее описанным (Войников, 1980; Stupnikova et al., 2006) и очищали в градиенте перколла 1985; Guillot-Salomon et al., 1997). Целостность изолированных митохондрий оценивали при помощи электронной микроскопии, теста на доступность цитохрома c и полярографического анализа активности митохондрий. Подготовку образцов для электронной микроскопии проводили согласно Уикли (Уикли, 1975). Образцы просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе TECNAI G2 (FEI) и ТЭМ LEO 906E ("Zeiss", Германия). Микрофотографии получены цифровой камерой NA-Orius Япония). Целостность внешней митохондриальной (Gatan, мембраны Benamar (Benamar методу c коллегами Окислительную и фосфорилирующую активность очищенных митохондрий определяли на полярографе Oxytherm system ("Hansatech Inst.", Англия) в ячейке объемом 1,5 мл при температуре 20 °C. Субстратом для дыхания служил 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата. Дыхательный контроль (ДК) определяли как отношение скорости окисления в присутствии АДФ к скорости окисления после исчерпания АДФ (Побежимова и др., 2004).

Митохондриальные нативные белки солюбилизировали по методике Sunderhaus с соавторами (Sunderhaus et al., 2007). Концентрацию белка, как в суспензии свежевыделенных митохондрий, так и в образцах солюбилизированного митохондриального белка для 1D BNE определяли по методу Bradford (Bradford, 1976).

Одномерный и двумерный голубой нативный электрофорез (1D BNE, 2D BNE/BNE) проводили согласно Sunderhaus с коллегами (Sunderhaus et al., 2007), используя прибор Protean II хі Cell ("Bio-Rad", США). Разделение субъединиц дыхательных комплексов во второй денатурирующей мере (2D BN/SDS) осуществляли в системе Трицин-SDS-PAGE согласно Schagger (Schagger, 2001) и Wittig (Wittig, Schagger, 2007).

Вестерн-блоттинг проводили по методу Timmons и Dunbar (Timmons, Dunbar, 1990), используя прибор для полусухого переноса Trans-Blot SD Semi-

Dry Electrophoretic Transfer Cell ("Bio-Rad", США). Инкубацию с антителами осуществляли согласно рекомендациям изготовителя.

Ферментативную активность дыхательных комплексов в геле, как индивидуальных, так и находящихся в составе суперкомплексов, детектировали, используя методики Sabar с соавторами (Sabar et al., 2005) и Ramirez-Aguilar с коллегами (Ramirez-Aguilar et al., 2011).

Для количественной оценки содержания нативных митохондриальных белков и их ассоциаций, а также оценки активности ферментов использовали денситометрический анализ гелей в программе Image J. Значения содержания и активности по вариантам рассчитывали в процентах от контроля.

Анализ белковых пятен на 2D BNE/SDS проводили методом MALDI-TOF. Для идентификации полученных масс-спектров использовали базу данных NCBI.

Статистические расчеты осуществляли с помощью программного пакета SigmaPlot 12.5. Эксперименты проводили в 3-6 биологических повторностях (n), в каждой из которых было не менее трех аналитических. Данные представлены как средняя арифметическая или медиана, а разброс значений в виде стандартного отклонения или интерквартильной широты [25%; 75%] процентиль]. В случае нормального распределения для доказательства различий значимых между средними использовали однофакторный дисперсионный анализ, а при распределении, отличающемся от нормального, применяли Н-критерий Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением средних по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $P \le 0.05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чистота и качество изучаемых фракций митохондрий

Анализ митохондриальной фракции при помощи электронной микроскопии показал высокую степень чистоты выделенных органелл с небольшим загрязнением (менее 5%) микросомальной фракцией (рис. 1).

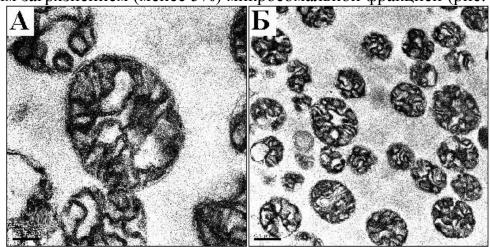


Рис. 1. Митохондрии этиолированных проростков гороха.

A — наиболее типичные органеллы; B — фракция органелл. Масштабные отрезки: A — 200 нм, B — 500 нм.

Согласно тесту на целостность наружной мембраны полярографического анализа, митохондрии имели высокую интактность активно окисляли субстрат и отличались высокой степенью процессов окисления и фосфорилирования (ДК Использование в работе фракций свежевыделенных, функционально активных органелл с высокой степенью чистоты и интактности послужило надежной базой для получения достоверных данных о нативной организации ОХРНОЅ митохондрий.

Организация системы окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха

Прежде чем перейти к изучению влияния гипотермии на состав и **OXPHOS** митохондрий проростков гороха, активность особенности ее организации в органеллах контрольных растений. Для получения полной информации о составе OXPHOS использовали несколько дополняющих друг друга методов исследования: 1D BNE, 2D BNE/BNE с последующей энзимографией И 2DBNE/SDS В комбинации иммуноблоттингом и масс-спектрометрическим анализом. Метод 1D BNE в сочетании с энзимографией и денситометрическим анализом позволил определить локализацию и оценить содержание и активность отдельных ферментов и их ассоциаций в соответствующих электрофоретических зонах (рис. 2, Б) (Кондакова и др., 2014).

Активность комплекса I была обнаружена в 6-и суперкомплексах и в зоне отдельно расположенного НАДН-дегидрогеназного комплекса с предполагаемой молекулярной массой 1000–1300 кДа (рис. 2, В). Согласно данным денситометрического анализа около 90% этого фермента входит в состав суперкомплексов.

Детекция активности комплекса II выявила наличие сукцинатдегидрогеназы в мегакомплексе ($R_{\rm f}$ 0,01), а также свободную, не связанную с другими дыхательными комплексами форму фермента с массой около 220 кДа (рис. 2, Γ). Денситометрический анализ показал, что эта форма является мажорной, то есть фермент присутствует во внутренней мембране митохондрий в основном в неассоциированном состоянии.

Метод детекции комплекса III в геле пока не разработан в связи отсутствием подходящего хромогена (Sabar et al., 2005).

Энзимография комплекса IV показала, что он входит в состав мегакомплекса (R_f 0,01) и 7-и суперкомплексов, а также присутствует во внутренней митохондриальной мембране в виде монокомплексов IVa, IVb и IVc с предполагаемыми массами 480, 430 и 340 кДа соответственно (рис. 2, Д). Согласно результатам денситометрического анализа форма фермента IVb является мажорной в митохондриях гороха.

Обнаружены две мономерные формы АТФ-синтазы — минорная форма Va и мажорная Vb с массами 780 и 700 кДа соответственно (рис. 2, E). Димер этого фермента V_2 выделяется при солюбилизации в следовых количествах.

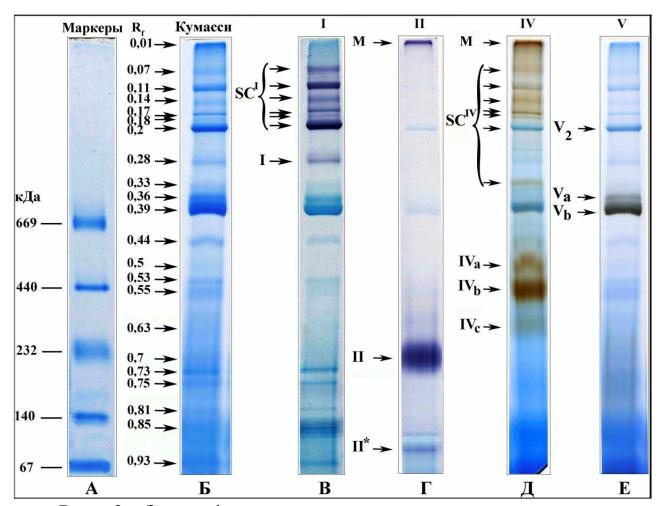


Рис. 2. Зимография митохондриальных дыхательных комплексов проростков гороха в градиентном геле 1D BNE.

1D BNE гель 3,5–16%. А — массы белков-стандартов; Б — спектр нативных митохондриальных белков, окрашенных коллоидным Кумасси; В, Г, Д, Е — энзимограммы дыхательных комплексов I, II, IV и V в геле соответственно. Обозначения: R_f — электрофоретическая подвижность белковых комплексов и их ассоциаций; SC^I , SC^{IV} — суперкомплексы, в которых детектируется активность комплексов I и IV соответственно; М — мегакомплекс, в состав которого входят комплексы II и IV; I, II — комплексы I и II; II* — субъединицы SDH1 и SDH2 комплекса II; IVa, IVb, IVc — формы a, b, с комплекса IV; V_2 — димерный комплекс V; Va, Vb — формы a, b комплекса V.

Более детальное изучение структуры обнаруженных суперкомплексов с применением 2D BNE/BNE и детекцией активности ферментов ОХРНОЅ во второй мере подтвердило и расширило результаты, полученные при помощи одномерного 1D BNE. Так, показано, что формы IVa и IVb в отличие от формы IVc имеют схожий состав (Кондакова и др., 2014). Вероятно, различия в массах монокомплексов IVa и IVb могут быть связаны с наличием дополнительной регуляторной субъединицы, что согласуется с данными Eubel с коллегами (Eubel et al., 2003). Кроме того, во второй нативной мере комплексы II и IV распадаются на отдельные субкомплексы, а самой стабильной оказалась АТФ-синтаза.

Дальнейшее изучение субъединичного состава компонентов OXPHOS, а также нативных митохондриальных белков при помощи 2D BNE/SDS в

сочетании с масс-спектрометрией и иммунохимическим анализом гелей позволило идентифицировать 45 белковых пятен из видимых 136, среди которых обнаружены субъединицы всех комплексов ОХРНОS, альтернативных ферментов и других митохондриальных белков (рис. 3). Это окончательно определило состав суперкомплексов и обнаружило новые особенности организации системы трансформации энергии митохондрий проростков гороха (рис. 3).

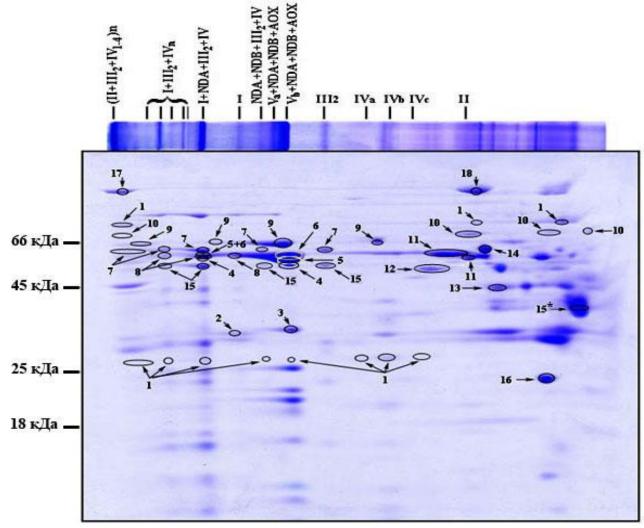


Рис. 3. Двумерное разделение (2D BNE/SDS) суперкомплексов и нативных белков, выделенных из митохондрий проростков гороха.

Цифры обозначают белковые субъединицы, идентифицированные при помощи иммунохимии или масс-спектрометрического анализа. На треке 1D BNE (сверху) отмечено расположение комплексов и суперкомплексов ОХРНОЅ митохондрий проростков гороха. 1D BNE гель 3,5–16%, а для 2D использовали 10%-ый ПААГ. Обозначения: $\mathbf{1}$ — COXII — субъединица II цитохром c оксидазы; $\mathbf{2}$ — прохибитин 1; $\mathbf{3}$ — AOX; $\mathbf{4}$ — NDA; $\mathbf{5}$ — α -субъединица компонента \mathbf{F}_1 АТФ-синтазного комплекса; $\mathbf{6}$ — β -субъединица компонента \mathbf{F}_1 АТФ-синтазного комплекса (граница мРР) (субъединица комплекса III ЭТЦ); $\mathbf{8}$ — субъединица 51 кДа комплекса I; $\mathbf{9}$ — NDB; $\mathbf{10}$ — субъединица сукцинатдегидрогеназы SDH1-1; $\mathbf{11}$ — дегидрино-подобные белки; $\mathbf{12}$ — фумараза; $\mathbf{13}$ — E1- α -субъединица пируватдегидрогеназного комплекса; $\mathbf{14}$ — Δ -1-пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназа; $\mathbf{15}$ — α -субъединица МРР (субъединица комплекса III ЭТЦ); $\mathbf{15}$ * — α -субъединица МРР (субъединица комплекса III ЭТЦ); $\mathbf{15}$ — α -субъединица МРР (субъединица комплекса III ЭТЦ); $\mathbf{15}$ — α -субъединица МРР (субъединица комплекса III ЭТЦ); $\mathbf{15}$ — α -субъединица мРР (субъединица супероксиддисмутаза; $\mathbf{17}$ — E1-субъединица 2-оксоглутарат-дегидрогеназного комплекса; $\mathbf{18}$ — глициндегидрогеназа.

Идентификация субъединиц комплекса III, α - и β -субъединиц MPP с массами 55 и 60 кДа соответственно, при помощи масс-спектрометрии позволила доказать его наличие в составе мегакомплекса, всех суперкомплексов, обнаружить ассоциацию III $_2$ +IV, которая не детектировалась предыдущими методами, а также показать наличие свободной формы фермента, не связанной с другими дыхательными комплексами.

Иммунохимическая детекция альтернативных ферментов при помощи антител, любезно предоставленных профессором A. G. Rasmusson, показала, что внутренние (NDA) и внешние (NDB) ротенон-резистентные $HAД(\Phi)H$ -дегидрогеназы с массами 50 и 60 кДа в основном ассоциируют с суперкомплексами OXPHOS (рис. 4). На иммуноблотах NDA локализуется в области $AT\Phi$ -синтазного комплекса и суперкомплексов $I+III_2+IV$ (R_f 0,2) и III_2+IV , а NDB — в районе $AT\Phi$ -синтазы и суперкомплекса III_2+IV . Причем минорные количества NDB присутствуют и в свободной форме.

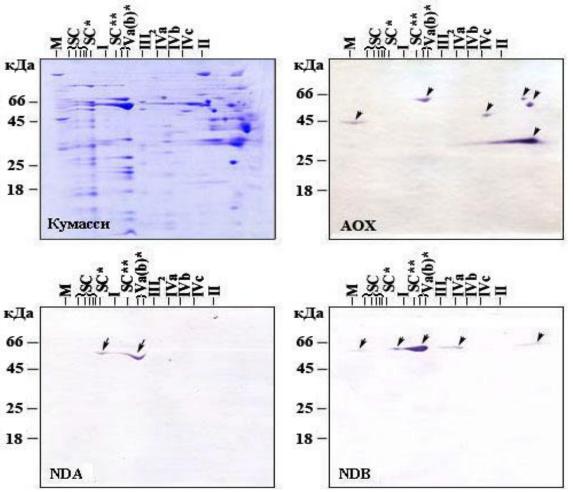


Рис. 4. Иммунохимическая детекция альтернативных $HAД(\Phi)H$ -дегидрогеназ и AOX.

На рисунке гель 2D BNE/SDS, окрашенный Кумасси, и иммуноблоттинги с антителами на NDA, NDB и AOX. Слева от геля, окрашенного Кумасси, и от мембран указаны молекулярные массы маркерных белков. **Обозначения:** М — мегакомплекс; SC — суперкомплексы $I+III_2+IV_n$ SC* — суперкомплекс $I+NDA+III_2+IV$; SC** — суперкомплекс NDA+NDB+ III_2+IV ; Va(b)*— суперкомплекс Va(b)+NDA+NDB+AOX; I, II, III_2 , IVa, IVb, IVc — соответствующие комплексы OXPHOS.

Иммунохимический анализ обнаружил также мономерные и димерные формы АОХ с массами от 33 до 66 кДа, которые присутствуют в митохондриях в основном в несвязанной с суперкомплексами форме, что согласуется с данными Eubel с соавторами (Eubel et al., 2003). Однако небольшое количество димера АОХ, по-видимому, ассоциирует с АТФ-синтазой. Разнообразие АОХ, вероятно, связано с тем, что используемые антитела (Agrisera) реагируют с различными изоформами АОХ, включая АОХ1А, АОХ1В, АОХ1С, АОХ1D и АОХ2, и указывает на наличие нескольких изоформ митохондриальной АОХ у гороха.

Полученная информация позволила предположить присутствие растительных митохондриях новых, ранее не детектируемых суперкомплексов, респирасома I+NDA+III₂+IV, квножвм суперкомплекс NDA+NDB+III₂+IV, мегакомплекс (II+III₂+IV)_n и две АТФ-синтасомы а и bформ – Va(b)+NDA+NDB+AOX (Кондакова и др., 2016б). Ассоциации альтернативными ферментами дыхательных комплексов с обнаружены впервые, т.к. ранее считалось, что последние не входят в состав дыхательных надмолекулярных структур в митохондриях растений (Eubel et al., 2003; Klodmann et al., 2011).

Таким образом, дыхательная цепь митохондрий этиолированных проростков гороха в нативном состоянии представлена мегакомплексом $(II+III_2+IV)_n$ с предполагаемой молекулярной массой около 10000 кДа; I+NDA+III₂+IV; суперкомплексом респирасомами, мажорным **ОИТКП** включающими разное количество копий комплекса IV $(I+III_2+IV_n);$ суперкомплексом NDA+NDB+III₂+IV; а также двумя ATФ-синтасомами – Va и Vb, ассоциированными с NDA, NDB и AOX. Все дыхательные комплексы присутствуют и в виде монокомплексов, а комплекс IV имеет три формы – IVa, IVb и IVc.

Влияние низких температур на состав, содержание и активность компонентов системы окислительного фосфорилирования проростков гороха

Получив представление о нативной организации OXPHOS митохондрий проростков гороха в оптимальных температурных условиях, перешли к изучению влияния на нее гипотермии. Прежде всего, выяснили, как меняется физиологическое состояние растений в изучаемых условиях. Для этого оценили устойчивость проростков к промораживанию и уровень развития окислительного стресса (табл. 1), который определяли по содержанию ТБК-реактивных продуктов.

Закаливание растений увеличивало устойчивость проростков гороха к промораживанию, В результате чего количество выживших растений возрастало в среднем на 20% (табл. 1). Мягкий и жесткий стрессы существенно снижали выживаемость проростков: мягкий стресс – в среднем на 40%, а Содержание ТБК-реактивных жесткий стресс на 68%. продуктов увеличивалось после всех изучаемых условий гипотермии, но в закалённых проростках в гораздо меньшей степени (в среднем на 8,5%), чем при стрессе (в среднем на 30%) (табл.1). Эти данные указывают на правильность выбранных обработок и позволяют предположить, что при закаливании происходят адаптивные перестройки метаболизма, направленные на индукцию холодостойкости и снижение уровня окислительного стресса, а воздействие низких стрессирующих положительных и отрицательных температур, напротив, приводит к его развитию.

Таблица 1 Выживаемость и содержание ТБК-реактивных продуктов в этиолированных проростках гороха после изучаемых низкотемпературных обработок

Контроль	Жесткий стресс	Закаливание	Мягкий стресс			
Выживаемость, %						
74 ^{а, б, в}	32 а, г, д	94 ^{б, г, е}	60 ^{в, д, е}			
[73;74]	[29;34]	[90;100]	[54; 70]			
ТБК-реактивные продукты, нмоль/г сырой массы						
14,1 a, б, в	18,4 ^{а, г}	15,3 ^{б, г, е}	18,3 ^{B, e}			
[12,9; 15,3]	[16,6; 21,4]	[14,1; 16,1]	[16,6; 20,0]			

Примечание: выживаемость рассчитывалась как процент выживших после промораживания при минус 7 °C в течение 1,5 ч растений от их общего количества. Ме [25%;75%], n=4-5, $^{a, \, 6, \, B, \, \Gamma, \, d, \, e}$ – различия между контролем и жестким стрессом (a), контролем и закаливанием (b), контролем и мягким стрессом (b), жестким стрессом и закаливанием (c), жестким стрессом и мягким стрессом и закаливанием (e) статистически значимы (e). Статистическую значимость различий определяли по критерию Краскела-Уоллиса.

Изменение физиологического статуса растения связано, прежде всего, с функциональным состоянием митохондрий, жизненно важных органелл клетки. В связи с этим необходимо было выяснить, как меняются интактность и функциональная активность митохондрий в условиях гипотермии различной интенсивности. Тест на доступность цитохрома с показал, что митохондрии, выделенные из закаленных проростков, имели высокую целостность наружной мембраны, практически такую же, как и органеллы из контрольных растений. Мягкий и жесткий стрессы существенно снижали этот показатель, причем жесткий – сильнее (табл. 2). Это говорит о повреждающем действии выбранных стрессирующих температур, особенно отрицательной. Кроме того, все низкие температуры, как закаливающие, так и стрессирующие, вызывали снижение степени сопряжения процессов окисления фосфорилирования митохондриях (табл. 2).

Таким образом, представленные данные показывают, что закаливание вызывает ряд адаптационных перестроек, в результате которых сохраняется эластичность митохондриальных мембран, а ферментативная система окислительного фосфорилирования переходит в менее интенсивный режим работы, направленный на поддержание энергией клеточного гомеостаза и

снижение образования АФК. В стрессовых условиях происходит, по всей видимости, ухудшение состояния мембран, которое может быть вызвано набуханием органелл с последующими локальными разрывами наружной мембраны, а также развитием окислительного стресса, и сопровождается разобщением дыхания и фосфорилирования в митохондриях.

Таблица 2 Целостность мембран и дыхательный контроль митохондрий этиолированных проростков гороха

Контроль	Жесткий стресс	Закаливание	Мягкий стресс		
Целостность, %					
$98.7 \pm 0.9^{a, b}$	$90.6 \pm 1.8^{a, r, \pi}$	98,0 ± 0,6 ^Γ	$96.8 \pm 0.7^{\text{ B}, \text{ A}}$		
Коэффициент дыхательного контроля					
$3,3 \pm 0,2^{\text{ a, 6, B}}$	$2.8 \pm 0.2^{\mathbf{a},\mathbf{\pi}}$	2,8 ± 0,2 ^{6, e}	$2,5 \pm 0,3^{\text{ B, A, e}}$		

Примечание: в качестве субстрата окисления использовали малат (10 мМ) в присутствии глутамата (10 мМ). В таблице приведены средние арифметические и стандартные отклонения. n=3-6. $a, 6, B, \Gamma, J, e$ — как в табл. 1.

Обнаруженные изменения в интактности митохондриальных мембран и функциональной активности митохондрий позволяют предположить также и возможные перестройки в надмолекулярной организации OXPHOS органелл в период гипотермии.

Изучение состава, содержания и активности суперкомплексов и комплексов окислительного фосфорилирования показало, что гипотермия различной интенсивности существенно не меняет спектр нативных митохондриальных белков и их ассоциаций, но приводит к изменениям в содержании и активности компонентов OXPHOS (табл. 3, рис. 5).

Установлено, что все низкотемпературные обработки вызывают существенное количества суперкомплексов $I+III_2+IV_n$ снижение I+NDA+III₂+IV, Va+NDA+NDB+AOX и Vb+NDA+NDB+AOX (табл. (Кондакова и др., 2016а). Мегакомплекс (II+III₂+IV)_п деградирует только под действием низких отрицательных температур, а при закаливании, наоборот, происходит его накопление (табл. 3). Снижение содержания суперкомплексов $I+III_2+IV_n$ и $I+NDA+III_2+IV$ сопровождается ростом популяций свободных форм комплексов I и III₂. Причем в условиях жесткого стресса наблюдается резкое увеличение количества монокомплекса І, в среднем на 48,5%, что значительно превышает уровни содержания этого фермента при холодовом закаливании и мягком стрессе. Количество комплекса III₂, не связанного с другими дыхательными ферментами, существенно возрастает при всех изучаемых условиях гипотермии (табл. 3). Вероятно, снижение содержания суперкомплексов I+III₂+IV_n и I+NDA+III₂+IV и накопление монокомплексов I и III_2 могут являться результатом распада этих респирасом.

Таблица 3 Изменение содержания дыхательных комплексов и суперкомплексов при закаливании и в условиях низкотемпературного стресса

По		Название	Относительное содержание белка, % от контроля			
ло R _f комплекса или суперкомплекса	Контроль	Жесткий стресс	Закаливание	Мягкий стресс		
1 0,01 (II+III ₂ +IV ₁₋₄) _n	100 a, 6	80,9 а, г, д	116,2 б, г, е	102,0 д, е		
	$(11+111_2+1 V_{1-4})_n$	[100; 100]	[79,4; 86,6]	[111,7; 143,5]	[93,6; 107,8]	
2 0,07 I+III	$I+III_2+IV_n$	100 а, б, в	56,1 ^a	81,2 ⁶	74,9 ^B	
	1+111 ₂ +1 V _n	[100; 100]	[41,9; 74,1]	[67,7; 96,3]	[67,1; 87,5]	
3 0,11	I+III ₂ +IV _n	100 a, б, в	80,9 ^a	91,7 ⁶	94,7 ^в	
		[100; 100]	[77,2; 93]	[84,2; 99,2]	[83,2; 97,7]	
4 0,14 I+	$I+III_2+IV_n$	100 a, б, в	38,3 ^a	73,4 ⁶	80,3 ^B	
	0,14	1+1112+1 V n	[100; 100]	[33,1; 79,7]	[66,1; 80,3]	[61,9; 88,3]
5	$5 \mid 0,17 \mid I+III_2+IV_n$	100 a, б, в	76,9 ^{а, г, д}	86,7 ^{6, г}	91,8 ^{в, д}	
3 0,17	17111271 V n	[100; 100]	[73,5; 81]	[78,7; 93,2]	[87,9; 94,7]	
6	$6 \mid 0.18 \mid I+III_2+IV_n$	$I+III_2+IV_n$	100 a, б, в	82,4 ^a	86,0 ⁶	96,8 ^в
0 0,18	1+1112+1 V n	[100; 100]	[73,6; 83]	[74,3; 88,3]	[85,6; 98]	
7 0,2 I+1	I+NDA+III ₂ +IV	100 a, б, в	89,5 ^a	92,6 ⁶	89,3 ^B	
		[100; 100]	[85,3; 95,1]	[91,6; 96,7]	[86,4; 94,5]	
8 0,28	I	100 a, б, в	148,5 ^{а, г, д}	102,9 ^{б, г}	104,1 ^{в, д}	
		[100; 100]	[135; 161,2]	[99,7; 104,6]	[99,7; 133,2]	
9 0,36 Va	Va+NDA+NDB+	100 a, б, в	90,7 ^a	90,1 ⁶	92,6 ^B	
	0,50	AOX	[100; 100]	[81,2; 96,0]	[86,6; 95,8]	[90,1; 96,6]
10 0,39	Vb+NDA+NDB+	100 a, б, в	94,8 ^a	98,1 ⁶	98,4 ^B	
	0,57	AOX	[100; 100]	[85,6; 96,9]	[94,8; 99,3]	[92,3; 101,6]
11 0,44	0.44	4 III $_2$	100 a, б, в	126,2 ^a	114,4 ⁶	117,3 ^B
	1112	[100; 100]	[115,9; 147,2]	[109,6; 120,9]	[103,2; 122,5]	

Примечание: в таблице приведены результаты обсчета 11-и электрофоретических полос на гелях 1D BNE, окрашенных Кумасси. Полосы представляют собой суперкомплексы и комплексы ОХРНОЅ митохондрий проростков гороха. Ме [25%;75%], n=3-5, a, b, b, r, d, e - k в табл. 1. Статистическую значимость различий определяли по критерию Краскела-Уоллиса.

Изменения в содержании дыхательных ферментов отражаются на их активности, детектируемой в гелях. Так, показано, что в условиях гипотермии уменьшение количества ассоциаций, содержащих комплексы I и IV ($R_{\rm f}$ 0,07–0,2), сопровождается снижением активности этих дыхательных ферментов в указанных респирасомах (рис. 5, A и B).

Одновременно наблюдается увеличение активности свободной несвязанной формы комплекса I в стрессовых условиях, причем более интенсивное под действием отрицательной температуры (рис. 5, A). Учитывая

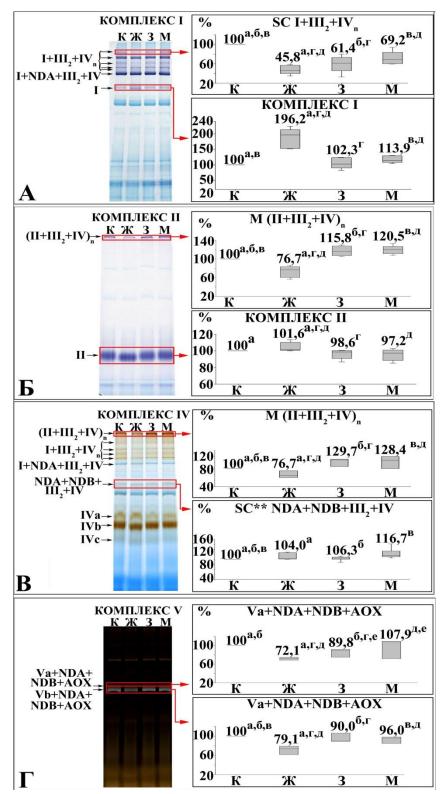


Рис. 5. Влияние гипотермии на активность комплексов OXPHOS митохондрий проростков гороха

А, Б, В, Γ – детекция ферментативной активности комплексов I, II, IV и V соответственно. **Обозначения:** К – контроль, Ж – жесткий стресс, З – закаливание, М – мягкий стресс. Черные стрелки показывают локализацию суперкомплексов и монокомплексов ОХРНОЅ. Красные стрелки указывают на результаты денситометрического анализа относительной активности ферментов в соответствующих зонах детекции по вариантам, которые представлены в виде графиков. Ме [25%;75%], бары показывают минимальные и максимальные значения, n=3-4, a, b, b, r, d, e - kak в табл. 1. Статистическую значимость различий определяли по критерию Краскела-Уоллиса.

то, что прирост активности свободной НАДН-убихинон-оксидоредуктазы в этих условиях почти в два раза больше, чем прирост её содержания, можно предположить, что повышение активности фермента связано не только с увеличением содержания белка, но и с дополнительной его активацией (табл. 3, полоса 8, и рис. 5, А). В условиях гипотермии также отмечено небольшое увеличение активности ассоциации NDA+NDB+III₂+IV (рис. 5, B). Снижение содержания сукцинатдегидрогеназы и цитохром с оксидазы в составе мегакомплекса ($II+III_2+IV_{1-4}$)_п в условиях жесткого стресса приводят к соответствующему падению активности этих ферментов, и, следовательно, всей ассоциации (табл. 3, полоса 1, и рис. 5, Б и В). Закаливание проростков гороха, способствует накоплению И vвеличению активности этой надмолекулярной структуры. Интересно, что при мягком стрессе рост активности мегакомплекса не связан с увеличением его содержания.

Функциональное состояние монокомплекса II остается неизменным при закаливании и мягком стрессе, а под действием отрицательной температуры даже немного увеличивается (рис. 5, Б). Активность свободных форм цитохромоксидазы, а также двух форм АТФ-синтазного комплекса в ассоциации с альтернативными ферментами подавляются в разной степени практически при всех низкотемпературных обработках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы получены принципиально новые данные об организации системы окислительного фосфорилирования митохондрий из этиолированных проростков гороха и её реакции на низкотемпературный стресс и холодовую адаптацию.

Pahee Taylor с соавторами (Taylor et al., 2005) предпринимали попытку изучения организации дыхательной цепи митохондрий из зеленых растений детергента гороха при помощи более жесткого додецилмальтозида, разбивающего суперкомплексы на отдельные комплексы или их более мелкие ассоциации. В результате исследований авторы обнаружили в составе ЭТЦ только один суперкомплекс I+III₂ и отдельно функционирующие дыхательные ферменты (рис. 6, А). Результаты наших исследований показали, что система трансформации энергии митохондрий гороха имеет гораздо более сложную организацию, чем считалось panee (Taylor et al., 2005). Для получения полной информации о нативной организации OXPHOS использовали свежевыделенные органеллы высокого качества, мягкий неионный детергент дигитонин, а также более щадящие по сравнению с классическими условия нативного голубого электрофореза (BNE) (Sunderhaus et al., 2007). Обнаружено, что в состав OXPHOS изучаемых органелл входят как характерные для некоторых растительных видов респирасомы I+III₂+IV_n, так и впервые описанные нами, ранее не детектируемые суперкомплексы, такие как: мажорная респирасома I+NDA+III₂+IV, суперкомплекс NDA+NDB+III₂+IV, мегакомплекс (II+III₂+IV)_n, и две $AT\Phi$ -синтасомы а и b-форм – Va(b)+NDA+NDB+AOX (рис. 6, Б) (Кондакова и др., 2016б). Помимо ассоциаций во внутренней мембране митохондрий проростков гороха присутствуют также свободные, несвязанные

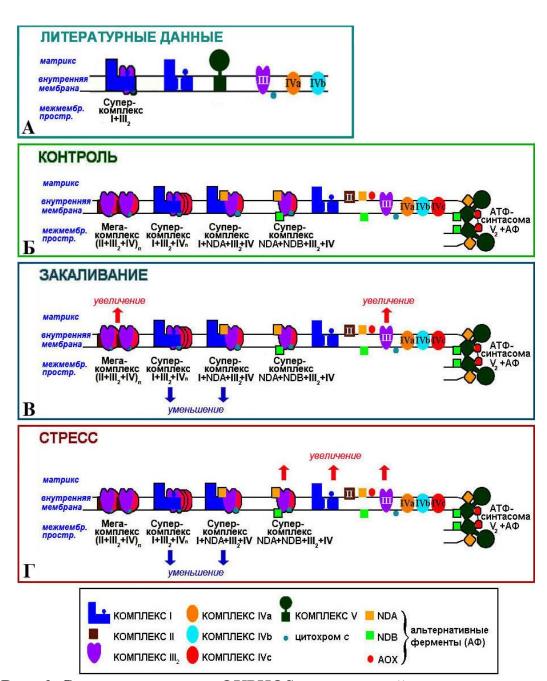


Рис. 6. Схема организации OXPHOS митохондрий проростков гороха и её изменения в условиях холодового закаливания и низкотемпературного стресса.

A — нативная организация дыхательных комплексов и $AT\Phi$ -синтазы в митохондриях зеленых растений гороха по данным Taylor с соавторами (Taylor et al., 2005); B — нативная организация OXPHOS митохондрий проростков гороха в оптимальных условиях; B, Γ — изменения в надмолекулярной структуре OXPHOS изучаемых органелл в условиях низкотемпературного закаливания и стресса соответственно. $AT\Phi$ -синтаза представлена в виде димера, т.к. в митохондриях этот фермент имеет в основном димерную форму, которая при солюбилизации органелл распадается на мономеры (Davies et al., 2012; Chaban et al., 2014).

формы дыхательных ферментов, причём комплекс IV имеет три формы – IVa, IVb и IVc.

Ассоциации альтернативных ферментов с суперкомплексами и АТФсинтазой в растительных митохондриях выявлены впервые. Ранее считалось, что эти ферменты не связаны с дыхательными надмолекулярными структурами (Eubel et al., 2003; Klodmann et al., 2011; Welchen et al., 2011), и имеются пока единичные, по нашим сведениям, данные о связи внутренней альтернативной $HAД(\Phi)H$ -дегидрогеназы Ndi1 с комплексами III_2 и IV, а также Ndi1 с $AД\Phi/AT\Phi$ -транслокатором и переносчиком фосфата в митохондриях $Saccharomyces\ cerevisiae\ (Matus-Ortega\ et al., 2015).$

Наши результаты показали, что основная часть внутренних и внешних альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, детектируемых используемыми суперкомплексами антителами, ассоциирует окислительного cфосфорилирования, а альтернативная оксидаза в основном находится в свободной несвязанной форме. Предполагается, присутствие ЧТО составе альтернативных ферментов В ассоциаций **увеличивать** может адаптационные возможности OXPHOS растительных митохондрий. Так, в условиях, когда активность комплекса І подавляется, например, при стрессе, NDA альтернативно может поддерживать работу комплексов III и IV в составе респирасомы I+NDA+III₂+IV.

Обнаруженная ассоциация NDA и NDB с суперкомплексом III_2+IV также образует респирасомо-подобную структуру, автономную мультиферментную машину, выполняющую весь цикл переноса электронов от $HAД(\Phi)H$ на молекулярный кислород. Присутствие сукцинатдегидрогеназы в составе растительного мегакомплекса ($II+III_2+IV$) $_n$ обнаружено впервые, поскольку считалось, что этот фермент не входит в состав суперкомплексов и имеются лишь единичные сведения о его связи с другими компонентами ЭТЦ митохондрий млекопитающих (Eubel et al., 2003; Millar et al., 2004а). Функциональную значимость нового типа $AT\Phi$ -синтасомы еще предстоит выяснить.

Как отмечалось выше, исследования по влиянию факторов среды на нативное состояние системы трансформации энергии митохондрий пока влияния гипотермии на состав изучение единичны, И суперкомплексов ОХРНОЅ в органеллах растений до настоящего момента практически не проводились. В данной работе использовали три типа закаливание, низкотемпературного воздействия _ мягкую низкотемпературные стрессовые обработки. Это позволило получить новые данные по влиянию различных типов низкотемпературных воздействий на нативное состояние OXPHOS в растительных митохондриях и в целом об расширить представление адаптивном стрессовом состоянии И митохондриальной системы окислительного фосфорилирования.

Результаты исследования впервые показали, что в условиях гипотермии различной интенсивности в митохондриях проростков гороха снижаются содержание и активность большинства обнаруженных суперкомплексов, таких как $I+III_2+IV_n$, $I+NDA+III_2+IV$, Va+NDA+NDB+AOX и Vb+NDA+NDB+AOX, что, предположительно, может быть связано с распадом и частичной деградацией этих структур (рис. 6, В и Г) (Кондакова и др., 2016а). Показано, что в результате распада суперкомплексов, содержащих комплекс I, то есть $I+III_2+IV_n$ и $I+NDA+III_2+IV$, происходит накопление отдельно функционирующих комплексов I и III_2 . При этом в условиях закаливания

активность свободной формы НАДН-убихинон-оксидоредуктазы остается на уровне контроля, а при стрессах — значительно увеличивается. Предполагается, что при стрессах повышение активности фермента связано не только с увеличением содержания белка, но и с дополнительной его активацией. Интересно, что в условиях жесткого стресса увеличение содержания и активности комплекса I существенно выше, чем при мягкой стрессовой обработке, что может указывать на более активный выход фермента из состава суперкомплексов. При гипотермии также отмечено увеличение активности более мелкой ассоциации NDA+NDB+III₂+IV.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными Ramirez-Aguilar с коллегами (Ramirez-Aguilar et al., 2011), которые показали, что при гипоксии и низком значении pH содержание суперкомплексов $I+III_2+IV_{1-3}$ и $I+III_2$ в митохондриях клубней картофеля существенно снижается, что сопровождается выходом комплекса I из их состава и увеличением содержания и активности III_2+IV . Вероятно, более мелкого суперкомплекса частичная потеря организации является общей суперкомплексной реакцией системы окислительного фосфорилирования митохондрий различных видов на изменение условий среды.

Обобщая полученные данные, можно отметить общее снижение содержания и активности респирасом в условиях гипотермии, что, повидимому, является результатом их частичного распада, который связан, прежде всего, с развитием процессов ПОЛ. В стрессовых условиях распад этих ассоциаций приводит к накоплению и увеличению активности комплексов I и важных сайтов продукции АФК, что сопровождается дальнейшим развитием окислительного стресса в митохондриях и приводит к снижению функциональной активности и интактности органелл. При закаливании распад суперкомплексов, по-видимому, сопровождается контролируемой деградацией монокомплекса I и сохранением его активности на уровне контроля, что совместно с другими факторами способствует переходу OXPHOS митохондрий в менее интенсивный режим работы, позволяет снизить концентрацию АФК в митохондриях и сохранить высокую интактность митохондриальных мембран.

Таким образом, представленные в работе данные открывают новые особенности строения OXPHOS митохондрий проростков гороха, а также впервые указывают на частичную потерю суперкомплексной организации этой системы в условиях гипотермии различной интенсивности, которая сопровождается накоплением и увеличением активности монокомплексов I и III_2 .

ВЫВОДЫ

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

- 2) Внутренние и внешние альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы ассоциируют с суперкомплексами OXPHOS, а альтернативная оксидаза в основном находится в свободной, несвязанной форме.
- 3) В условиях гипотермии уменьшаются содержание и активность большинства обнаруженных суперкомплексов, таких как суперкомплексы $I+III_2+IV_n$, $I+NDA+III_2+IV$ и Va(b)+NDA+NDB+AOX.
- 4) В результате распада суперкомплексов $I+III_2+IV_n$ и $I+NDA+III_2+IV$ происходит накопление отдельно функционирующих комплексов I и III_2 . При этом в условиях закаливания активность комплекса I остается на уровне контроля, а при стрессах значительно увеличивается. При гипотермии также отмечено увеличение активности более мелкой ассоциации дыхательных ферментов $NDA+NDB+III_2+IV$.
- 5) В условиях гипотермии распад суперкомплексов происходит на фоне развития процессов перекисного окисления липидов клеточных мембран в проростках гороха. В стрессовых условиях ПОЛ протекает интенсивнее и приводит к снижению интактности митохондриальных мембран.
- 6) При закаливании частичный распад суперкомплексов и сохранение активности комплекса I на прежнем уровне совместно с другими факторами приводят к разобщению процессов окисления и фосфорилирования, снижению продукции АФК и сохранению интактности мембран.
- 7) В условиях стресса распад суперкомплексов и увеличение содержания и активности комплексов I и ${\rm III}_2$, важных сайтов образования АФК, являются одной из причин нарушения функционирования митохондрий и приводят к разобщенному дыханию, дальнейшему росту продукции АФК и снижению интактности мембран.

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

Список работ, опубликованных по теме диссертации Статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ

- 1. Ассоциация дегидринов проростков гороха с суперкомплексами дыхательной цепи митохондрий в период гипотермии / **М. А. Кондакова**, И. В. Уколова, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Журнал стресс-физиологии и биохимии. 2013. Т. 9, № 4. С. 279–288.
- 2. Особенности строения электрон-транспортной цепи митохондрий проростков гороха (*Pisum sativum* L.) / **М. А. Кондакова**, И. В. Уколова, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Вестник ИрГСХА. -2014. Выпуск 65. С. 13-21.
- 3. Влияние гипотермии на содержание суперкомплексов и комплексов системы окислительного фосфорилирования в митохондриях проростков гороха *Pisum sativum* L. / **М. А. Кондакова**, И. В. Уколова, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Вестник ИрГСХА. 2016а. Выпуск 77. С. 71–78.
- 4. Новые суперкомплексы в системе окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха *Pisum sativum* L. / **М. А. Кондакова**, И. В. Уколова, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. − 2016б. − Т. 6, № 3. − С. 143−146.

Статьи в других рецензируемых журналах и материалах конференций

5. Влияние низких температур на состав и активность суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий проростков гороха / **М. А. Кондакова**, И. В. Уколова, А. И. Антипина, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Механизмы регуляции функций растительных

органелл: Материалы Всероссийской научной конференции. – Иркутск: НЦРВХ СО РАМН, 2014. – С. 41–43.

- 6. The composition of pea mitochondrial supercomplexes under cold conditions / I. Ukolova, **M. Kondakova**, G. Borovskii, V. Voinikov // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1837S. P. e32; Corrigendum to "The composition of pea mitochondrial supercomplexes under cold conditions" // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1837. P. 1989.
- 7. Локализация и нативная организация дегидринов в митохондриях проростков гороха в условиях гипотермии / **М. А. Кондакова**, И. В. Уколова, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015. С. 269.
- 8. Надмолекулярная организация и активность дыхательной цепи митохондрий проростков гороха в условиях закаливания и низкотемпературного стресса / И. В. Уколова, М. А. Кондакова, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015. С. 543.
- 9. Нативная организация дыхательной цепи митохондрий проростков гороха *Pisum sativum* L. / **М. А. Кондакова**, И. В. Уколова, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Россия-Монголия: Материалы международной молодежной научно-практической конференции. Иркутск: ИГ СО РАН, 2016. С. 23-25.
- 10. Влияние гипотермии на состав и активность суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий проростков гороха *Pisum sativum* L. / **М. А. Кондакова**, И. В. Уколова, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде: Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых. Иркутск: ИГ СО РАН, 2016. С. 111–112.
- 11. Новые особенности организации дыхательной цепи митохондрий проростков гороха *Pisum sativum* / И. В. Уколова, **М. А. Кондакова**, А. В. Сидоров, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде: Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых. Иркутск: ИГ СО РАН, 2016. С. 172–173.

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода

ДК – коэффициент дыхательного контроля

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПААГ – полиакриламидный гель

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

1D BNE – одномерный голубой нативный электрофорез в полиакриламидном геле

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

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

АОХ – альтернативная антимицин А- и цианид-резистентная оксидаза

МРР – митохондриальная процессинговая пептидаза

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

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

OXPHOS – система окислительного фосфорилирования

SDS – додецилсульфат натрия