

REVIEW

**THE ENERGETIC FUNCTIONS OF PLANT MITOCHONDRIA UNDER
STRESS**

O.I. Grabelnych

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Division of the Russian Academy of
Sciences, Irkutsk*

tel.: (395-2)42-50-09, fax: (395-2)51-07-54, e-mail: grolga@sifibr.irk.ru;

Received July 20, 2005

Received in revised form August 4, 2005

Abstract — This article reviews the involvement of the mitochondrial systems, which maintain the balance of cell energy at different stress conditions. It is shown the functioning of the alternative oxidase, free fatty acids, uncoupling proteins, the rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases, the ADP/ATP-antiporter, the permeability transition pore and ATP-sensitive potassium channel (K^+_{ATP}). It is discussed data about physiological role of these systems in plant cell.

Key words: stress - plant mitochondria - nonphosphorylative pathways - thermogenesis - oxidative stress

REVIEW

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ РАСТЕНИЙ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

О.И. Грабельных

Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского Отделения Российской Академии наук. 664033 Иркутск, а/я1243, ул. Лермонтова, 132

tel.: (395-2)42-50-09, fax: (395-2)51-07-54, e-mail: grolga@sifibr.irk.ru;

Поступила в редакцию 20 июля 2005 г.

В обзоре рассмотрены имеющиеся на настоящее время сведения о митохондриальных системах, функционирование которых позволяет растениям поддерживать энергетический баланс в клетке в стрессовых условиях. Даны современные представления о функционировании альтернативной оксидазы, свободных жирных кислот, разобщающих белков, ротенон-нечувствительных НАД(Ф)Н дегидрогеназ, АДФ/АТФ-антипортера, митохондриальной проницаемой поры, и АТФ-чувствительного калиевого канала ($K^+_{\text{АТФ}}$). Обсуждаются данные о физиологической роли этих систем в растительной клетке.

Key words: stress - plant mitochondria - nonphosphorylative pathways - thermogenesis - oxidative stress.

Митохондрии растений, будучи одним из центров регуляции энергетического метаболизма, играют ключевую роль в ответе растений на стрессовые воздействия биотической и абиотической природы, а также выступают в качестве центральных органелл в процессе программированной клеточной смерти. Реакция растений направлена на перестройку метаболических реакций, конечным этапом которой является защита от стрессового фактора. Такая защита возможна благодаря существованию у растений широкого спектра нефосфорилирующих путей транспорта электронов. У растений обнаружены альтернативная цианид-резистентная оксидаза, «внешняя» и «внутренняя» ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н дегидрогеназы, разобщающие белки. Из семейства митохондриальных переносчиков также следует выделить АДФ/АТФ-антипортер, который участвует в разобщении окислительного фосфорилирования жирными кислотами. Заслуживает внимание и рассмотрение АТФ-чувствительного калиевого канала ($K^+_{\text{АТФ}}$), который регулирует потоки калия и также способен к диссипации энергии в растениях. В обзоре также представлены данные о существовании митохондриальной поры в растениях, открытие которой сопровождается увеличением проницаемости внутренней

митохондриальной мембраны и диссипацией мембранного потенциала.

Изучение механизмов функционирования обозначенных систем в стрессовых условиях является важным моментом в области понимания стресс-физиологии растительной клетки и лежащих в ее основе сигнальных механизмов.

Альтернативная цианидрезистентная оксидаза

Альтернативная цианидрезистентная оксидаза (АО) была открыта исторически первой из систем, функционирование которой приводит к диссипации энергии в митохондриях растений. Альтернативный или несопряженный путь переноса электронов ответвляется от основной (цитохромной) дыхательной цепи на уровне убихинона, минуя, таким образом, два из трех пунктов запасаения энергии (механизм I на рисунке), которая высвобождается в виде тепла. Установлено, что альтернативная оксидаза катализирует четырехэлектронное восстановление кислорода до воды, но природа ее каталитического сайта остается до конца не выясненной (Siedow *et al.*, 1995; Affourtit *et al.*, 2001). АО к настоящему времени обнаружена у всех исследованных видов растений, многих эукариотических водорослей, грибов, дрожжей, а также в митохондриях некоторых простейших. Вопрос о структуре и функциях АО в последнее

время широко обсуждается в литературе. Он освещен в обзорах, как зарубежных (Moore and Siedow, 1991; McIntoch, 1994; Siedow and Umbach, 1995; Wagner and Krab, 1995; Vanlerberge and McIntoch, 1997; McIntoch *et al.*, 1998), так и отечественных (Шугаев, 1991; Меденцев и др., 1999) авторов.

Первые попытки выделения альтернативной оксидазы позволили идентифицировать ее как хинолоксидазу (Huq and Palmer, 1978; Rich, 1978). Получение антител против альтернативной оксидазы, изолированной из *Sauromatum guttatum* (Elthon *et al.*, 1989), позволило выделить первый клон кДНК, соответствующий гену альтернативной оксидазы Aox1 (Rhoads and McIntosh, 1992, 1993). Considini с соавт. (2002) показано, что альтернативная оксидаза у растений кодируется субсемействами двух генов (Aox1 и Aox2) и состоит из одного или трех белков, что зависит от вида растения. В то же время у сои было идентифицировано три различных гена Aox (Whelan *et al.*, 1996). Aox1 индуцируется различными стрессовыми условиями (Vanlerberghe and McIntosh, 1997; Considini *et al.*, 2002) и присутствует как у однодольных, так и двудольных растений, в то время как экспрессия Aox2 происходит или конститутивно, или во время развития только двудольных растений (Considini *et al.*, 2002).

Альтернативная цианидрезистентная оксидаза 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 and McIntosh, 1992, 1993). 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 (Moore and Siedow, 1991). Тот факт, что альтернативная оксидаза ведет себя как интегральный белок внутренней мембраны, привел к предположению, что белок «заякорен» в мембране этими гидрофобными участками, образующими трансмембранные домены (Moore and Siedow, 1991).

В дальнейшем при изучении структуры и механизмов регуляции альтернативной оксидазы было установлено, что у растений, в отличие от грибов, альтернативная оксидаза функционирует в виде димера (Umbach and Siedow, 1993; Siedow and Umbach, 2000). В ходе изучения путей регуляции активности альтернативной оксидазы было установлено, что *in vivo* активность фермента очень сильно зависит от содержания белка альтернативной оксидазы, а, следовательно, и степени экспрессии его гена, а также от концентрации его субстрата – восстановленного убихинона (Vanlenberge *et al.*, 1999; Siedow and Umbach, 2000; Millenaar *et al.*, 2003). В последние

годы большое внимание уделялось изучению механизмов посттрансляционной регуляции активности данного фермента. В частности у растений было установлено, что когда субъединицы альтернативной оксидазы ковалентно связаны дисульфидным мостом, то фермент практически неактивен (Umbach and Siedow, 1993; Vanlenberge *et al.*, 1999). Восстановление дисульфидных связей резко повышает активность фермента (Umbach and 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 и, наоборот, присутствие восстановленной формы белка не является достаточным для проявления значительной активности АО *in vivo* в отсутствие пирувата (Vanlenberge *et al.*, 1999; Siedow and 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 низкими температурами (Knutson, 1974; McCaig, 1977; Stewart *et al.*, 1990a, b; Vanlerberghe and McIntosh, 1992; Purvis and Shewfelt, 1993; Gonzalez-Meler *et al.*, 1999; Ribas-Cardo *et al.*, 2000; Takumi *et al.*, 2002; Calegario *et al.*, 2003; Grabelnych *et al.*, 2004), условиями окислительного стресса (Maxwell *et al.*, 1999; Szal *et al.*, 2003; Polidoros *et al.*, 2005), ограничением элементов питания, в частности фосфата и азота (Parsons *et al.*, 1999; Sieger *et al.*, 2005), различными инфекциями (Lennon *et al.*, 1997; Lacomme and Roby, 1999; Simons *et al.*, 1999; Maxwell *et al.*, 2002), в ответ на обработку гербицидами, в частности ингибитором ацетоллактат синтазы (Gaston *et al.*, 2003). Показано, что при инфицировании патогенами сигналом в индукции АО могут служить молекулы салициловой кислоты (СК) (Rhoads and McIntosh, 1992, 1993; Lennon *et al.*, 1997; Maxwell *et al.*, 2002) или этилена (Simons *et al.*, 1999). Следует заметить, что СК представляет собой важную сигнальную молекулу в растениях, необходимую для индукции систематически приобретенной устойчивости против широкого ряда патогенов, включая грибы, бактерии и вирусы (Dempsey *et al.*, 1999). Индукция альтернативной оксидазы в ответ на различные типы стрессов предполагает, что данный белок должен играть важную физиологическую роль этих условиях. Действительно, анализ литературных данных и собственные данные

подтверждают это. Из-за того, что выполняемые альтернативной оксидазой функции достаточно широки, автор ограничивается рассмотрением только некоторых из них.

Основной функцией альтернативной оксидазы, как считалось ранее, является термогенез в специализированных тканях ароидных. Имеется ряд наблюдений, как достаточно старых, так и проведенных в более поздние годы, показывающих, что разница температур между початками лилий и окружающей средой возрастает при падении температуры окружающей среды (Nagy *et al.*, 1972; Knutson, 1974; Seymour and Schlultze-Motel, 1996). Контроль теплопродукция во время цветения ароидных принадлежит салициловой кислоте (Raskin *et al.*, 1987). Интересные данные, свидетельствующие о «включении» и «выключении» термогенеза в зависимости от температуры окружающей среды, были получены Seymour и Blaylock при изучении температуры початков у *Symplocarpus foetidus* (Seymour and Blaylock, 1999). Данные о термогенезе у ароидных (Meeuse, 1975; Leach *et al.*, 1996), об участии альтернативной оксидазы в термогенезе во время созревания плодов манго (Considine *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 1990), а также о влиянии инфильтрации цианидом проростков устойчивых к холоду растений на их температуру во время низкотемпературного стресса (Войников и Корзун, 1984; Vojnikov *et al.*, 1984) позволили предположить, что альтернативная оксидаза может принимать участие и в генерации тепла в так называемых «нетермогенных» растениях при гипотермии (Vojnikov *et al.*, 1984; Ordentlich *et al.*, 1991; Moynihan *et al.*, 1995; Grabelnych *et al.*, 2003). При этом так же как и у термогенных растений, значительная роль в этом процессе может принадлежать молекулам салициловой кислоты (Raskin *et al.*, 1987, 1989; Van Der Straeten *et al.*, 1995). Хотя некоторые авторы считают, что это не может приводить к физиологически значимому увеличению теплопродукции (Breidenbach *et al.*, 1997), по-видимому, альтернативная оксидаза принимает участие в защите растения от низкотемпературного стресса и путем регулируемого термогенеза. Таким образом, альтернативная оксидаза вовлечена в термогенные процессы, связанные с защитой растения от воздействия низкой температуры окружающей среды. Интересно также отметить, что термогенез у закаленных проростков озимой пшеницы, в отличие от незакаленных, во время низкотемпературного стресса был менее выражен (Kolesnichenko *et al.*, 2003). Эти данные позволяют предполагать, что термогенез у растений во время низкотемпературного стресса является не побочным продуктом метаболизма, а, как и у животных, является одним из способов защиты от низкотемпературного стресса.

Другой функцией АО в растительных клетках является ее антиоксидантная роль, которая была

впервые предположена в 1993 г. (Purvis and Shewfelt, 1993). В дальнейшем было показано участие альтернативной оксидазы в снижении образования активных форм кислорода (АФК) (Popov *et al.*, 1997; Purvis, 1997; Maxwell *et al.*, 1999; Moller, 2001). Низкая экспрессия АО в корнях ячменя после гипоксии может объяснять наблюдаемые симптомы окислительного стресса (Albrecht and Wiedenroth, 1994; Biemelt *et al.*, 1998). Значительное уменьшение продуктов ПОЛ при функционировании АО во время последующего низкотемпературного стресса также наблюдали в проростках озимой пшеницы (Kolesnichenko *et al.*, 2001b).

Изучение альтернативной оксидазы, как части антиоксидантной защитной системы растений, позволило определить ее роль в программированной клеточной смерти. Показано, что предварительная обработка клеток сои аноксией, во время которой происходила активация АО, приводила к устойчивости клеток к программированной клеточной смерти, вызванной H₂O₂, в то время как ингибиторы АО снижали эту устойчивость (Amor *et al.*, 2000). По мнению некоторых авторов, индукция АО, может представлять важный механизм, предотвращающий активацию программированной клеточной смерти и даже вводят понятие для АО, как митохондриального белка «выживания», который защищает против клеточной смерти (Robson and Vanlerberghe, 2002; Vanlerberghe *et al.*, 2002).

Разобщающие белки растений из семейства митохондриальных белков переносчиков

Митохондриальные разобщающие белки (англ. “UnCoupling Proteins” - UCP) были открыты при изучении бурого жира млекопитающих, и первый разобщающий белок носит название термогенина, UCP или UCP1 (Скулачев, 1989; Klingerberg, 1990; Miroux *et al.*, 1993; Klingenberg and Huang, 1999). В настоящее время разобщающие белки обнаружены в митохондриях животных и человека (UCP2, UCP3, UCP4 и UCP5 или BMCP1) (Fleury *et al.*, 1997; Jezek and Garlid, 1998; Samec *et al.*, 1998; Bouillaud *et al.*, 2001; Jezek, 2002), птиц (Raimbault *et al.*, 2001), растений (Jezek *et al.*, 1998, 2000), дрожжей (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2000) и у некоторых простейших (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1999; Sluse and Jarmuszkiewicz, 2002).

Разобщающие белки, как предполагают, являются филогенетически специализированными протеинами, с помощью которых осуществляется регулируемое разобщение процессов окисления и фосфорилирования (Bouillaud *et al.*, 2001). Все известные разобщающие белки принадлежат к семейству митохондриальных белков-переносчиков и являются белками внутренней мембраны органелл (англ. “Mitochondrial Anion Carrier Proteins”, MACP) (Jezek *et al.*, 1998, Laloi, 1999; Garlid *et al.*, 1998, 2001)

UCP1 является «классическим» митохондриальным разобщающим белком, специфичным для митохондрий бурой жировой ткани млекопитающих, мол. масса которого у всех исследованных видов животных и человека приблизительно равна 33 кДа (Palou *et al.*, 1998; Nicholls and Rial, 1999; Klingenberg, 1999; Klingenberg and Huang, 1999; Stuart *et al.*, 1999; Ricquier and Bouillaud, 2000a,b). Согласно принятой в настоящее время большинством исследователей модели, UCP1 выступает посредником, облегчающим трансмембранный перенос анионов жирных кислот (Palou *et al.*, 1998; Garlid *et al.*, 1998; Jezek, 1999; Skulachev, 1999; Stuart *et al.*, 2001). Согласно этой гипотезе «циклического оборота жирных кислот», жирные кислоты выступают как циклические протонофоры (Скулачев, 1989; Jezek *et al.*, 1998; Jezek and Garlid, 1998; Jezek, 1999; Skulachev, 1999).

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 (англ. «Plant Uncoupling Mitochondrial Protein», PUMP) (Laloi *et al.*, 1997; Vercesi *et al.*, 1995; Vercesi, 2001). Растительный разобщающий митохондриальный белок PUMP вначале был выделен из клубней картофеля (Vercesi *et al.*, 1995), 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 *et al.*, 1997; Jezek *et al.*, 1998). Скрининг библиотеки генов картофеля привел к открытию белка *StUCP*, который на 44% гомологичен UCP1 (Laloi *et al.*, 1997). Впоследствии анализ геномов многих растений показал присутствие в них генов, кодирующих PUMP, в частности, такие гены были обнаружены у арабидопсиса (*AtPUMP*) (Maia *et al.*, 1998; Vorecky *et al.*, 2001). Этот предсказанный полипептид был на 81% идентичен *StUCP* картофеля и имел мотив, общий для всех митохондриальных белков переносчиков. Было обнаружено, что ген *AtPUMP* экспрессируется во всех тканях и его экспрессия сильно индуцируется холодной обработкой, в связи, с чем было предположено, что этот белок может принимать участие в защите растения от низкотемпературного стресса при помощи термогенеза (Maia *et al.*, 1998). При дальнейшем изучении генома арабидопсиса был обнаружен еще один ген, кДНК которого имела все характеристики известных UCP-подобных белков (Watanabe *et al.*, 1999). В то же время было установлено, что этот ген, в отличие от генов других растительных разобщающих белков, не индуцировался холодом, что позволило предположить, что у растений, так же как и у животных, семейство UCP-подобных белков мультигенно (Watanabe *et al.*, 1999). Две индуцируемые холодом кДНК, кодирующие

растительные разобщающие белки, были изолированы из початков *Symplocarpus foetidus* и обозначены как *SfUCPa* и *SfUCPb* (Ito, 1999). Экспрессия мРНК обоих генов наблюдалась только в початках, но не в листьях, причем она сильно индуцировалась в ответ на низкотемпературный стресс, что указывает на роль *SfUCPa* и *SfUCPb*, наряду с альтернативной оксидазой, в термогенезе в початках *Symplocarpus foetidus* (Ito, 1999). При анализе генома *Arabidopsis thaliana* был выделен ген белка *AtUCP4*, являющегося членом семейства митохондриальных переносчиков анионов и обладающего высокой степенью сродства с UCP4 мозга человека, в то время как белки *AtPUMP* и *StPUMP* обладают более низкой степенью гомологии с ним (Hanak and Jezek, 2001). Эти данные позволяют авторам предполагать большую эволюционную древность данного типа белков.

При помощи вестерн-блоттинга белок PUMP был обнаружен в митохондриях значительного количества исследованных видов как однодольных, так и двудольных растений. Среди исследованных однодольных растений PUMP был обнаружен у пшеницы, овса, кукурузы и лука (Jezek *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), апельсина, папайи, банана и ананаса (Jezek *et al.*, 1998), табака, манго (Jezek *et al.*, 2001), томата (Sluse and Jarmuszkiewicz, 2000). На основании этих фактов было выдвинуто предположение о повсеместном присутствии данного разобщающего белка в растениях.

Изучение механизма функционирования PUMP было проведено путем встраивания изолированного белка PUMP в липосомы и последующего изучения потоков K^+ и H^+ и влияния на них свободных жирных кислот (Jezek *et al.*, 1997). Полученные данные позволяют сделать вывод о функционировании белка PUMP в соответствии с механизмом «циклического оборота жирных кислот» (Jezek *et al.*, 1997) (механизм II на рисунке).

Почти все обнаруженные в митохондриях двудольных UCP-подобные разобщающие белки, в частности *StUCP* (Laloi *et al.*, 1997) и PUMP в клубнях картофеля (Nantes *et al.*, 1999; Calegario *et al.*, 2003), *AtPUMP* (*AtUCP1*) у арабидопсиса (Maia *et al.*, 1998), а также *SfUCPa* и *SfUCPb* в початках *Symplocarpus foetidus* (Ito, 1999) индуцируются холодом, поэтому есть основание предполагать, что PUMP принимает участие в защите растений от низкотемпературного стресса. Хотя имеются данные о том, что у пшеницы и арабидопсиса гены UCP-подобных белков (Watanabe *et al.*, 1999; Murayama and Handa, 2000) не индуцируются в ответ на воздействие низкой температуры. Другие типы стрессов (окислительный, гиперосмотический) также вызывают активацию разобщающего белка в

растениях (Considine *et al.*, 2003; Trono *et al.*, 2004).

Как известно, активность PUMP регулируется количеством свободных жирных кислот (Jezek *et al.*, 1997, 2001; Sluse *et al.*, 1998), содержание которых возрастает во время низкотемпературного стресса (Войников *и др.*, 1980, 1981; Vojnikov *et al.*, 1983). Митохондрии, изолированные из подвергнутых воздействию низкой температуры клубней картофеля (Porov *et al.*, 2002) и проростков озимых злаков (Войников *и др.*, 1980, 1981; Vojnikov *et al.*, 1983), в значительной степени разобщены, причем связывание свободных жирных кислот БСА значительно сопрягает их.

Изучение физиологической роли PUMP показало, что данный белок обладает функциями, сходными с функциями альтернативной оксидазы (Ricquier and Bouillaud, 2000a; Jezek *et al.*, 2001; Vercesi, 2001). Основной физиологической функцией UCP белков у животных считается участие в терморегуляции посредством термогенеза (Ricquier and Bouillaud, 2000a). Показано, что обработка прокаинном фосфолипазы А₂, значительно снижающая содержание свободных жирных кислот в клетках как животных (Scherphor *et al.*, 1972) так и растений (Vojnikov *et al.*, 1983), вызывает уменьшение генерации тепла инфильтрованными проростками озимых злаков во время холодного стресса по сравнению с контрольными неинфильтрованными проростками (Войников *и др.*, 2001b; Grabelnych *et al.*, 2003). Поскольку свободные жирные кислоты являются субстратами белка PUMP, то можно предполагать, что одной из функций митохондриального разобщающего белка PUMP в растениях является термогенез. К этому мнению приходят и другие авторы, которые показали усиление активности PUMP во время холодного стресса (Nantes *et al.*, 1999; Calegario *et al.*, 2003).

Показано, что функционирование разобщающих белков в растениях, как в норме, так и во время окислительного стресса приводит к снижению образования АФК митохондриями (Korshunov *et al.*, 1997; Kowaltowski *et al.*, 1999; Jezek *et al.*, 2001; Considine *et al.*, 2003; Trono *et al.*, 2004). Также показано, что субстраты разобщающих белков, такие как жирные кислоты, снижают продукцию H₂O₂ митохондриями (Korshunov *et al.*, 1999; Kowaltowski *et al.*, 1999; Pastore *et al.*, 2000).

Известно, что третьей функцией животных разобщающих белков в организме является регуляция метаболического и энергетического баланса (Gimeno *et al.*, 1997; Fleury *et al.*, 1997; Samec *et al.*, 1998; Diehl and Hoek, 1999; Ricquier and Bouillaud, 2000a; Dalgaard and Pedersen, 2001; Dulloo *et al.*, 2001). Предполагается, что в растениях митохондриальные разобщающие системы выполняют сходные функции (Jezek *et al.*, 2001). Несбалансированность между количеством субстрата дыхания и потребностью в энергии, а также недостаток соединений углерода

для процессов биосинтеза связаны с функционированием электронтранспортной цепи митохондрий. В таких условиях активация митохондриальных разобщающих систем растения может способствовать регуляции энергетического и метаболического баланса организма. Изучение активности белка PUMP на разных стадиях онтогенеза показало, что он участвует в окончании синтетических процессов при созревании плодов и во время климактерического подъема дыхания (дыхание перед полным созреванием плодов) (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1998). Для сопряжения митохондрией красных зрелых плодов томата требовалось добавление БСА и АТФ, что свидетельствует о том, что это разобщение опосредовано активностью белка PUMP (Costa *et al.*, 1999). Прямое доказательство увеличения содержания PUMP во время созревания плодов томата было получено Almeida с соавт., наблюдавшими при помощи вестерн-блоттинга с антителами против PUMP увеличение содержания этого белка по мере созревания плодов (Almeida *et al.*, 1999). Сходные данные были получены и для созревающих плодов манго (Considine *et al.*, 2001). Таким образом, можно предполагать, что известные факты активации альтернативной оксидазы и PUMP при созревании плодов томата (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 1999) и манго (Considine *et al.*, 2001) подтверждают их вовлечение в процессы регуляции метаболизма растения.

Белок холодного шока с молекулярной массой 310 кДа (БХШ 310)

Следующей системой, вызывающей при своем функционировании разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях растений, является цитоплазматический белок холодного шока с мол. массой 310 кДа, обозначенный как БХШ 310, который был впервые выделен в 1996 г. из проростков озимой ржи (Колесниченко *и др.*, 1996). Было установлено, что в нативном состоянии белок имеет мол. массу 310 кДа и содержит два типа субъединиц с мол. массами 56 и 66 кДа (Колесниченко *и др.*, 1996). БХШ 310 конститутивно синтезируется в проростках озимых злаков (Колесниченко *и др.*, 1996), его количественное содержание в проростках неохлажденных озимых злаков коррелирует с уровнем их морозоустойчивости (Мишарин *и др.*, 1997). При помощи иммунохимических методов показана индукция синтеза БХШ 310 при холодном шоке (Колесниченко *и др.*, 1996, 1999), при закаливании (Колесниченко *и др.*, 1997) и в условиях водного дефицита (Колесниченко *и др.*, 1999).

В дальнейшем было показано, что кроме собственно БХШ 310 существует ряд высокомолекулярных белков и относительно низкомолекулярных белков, иммунохимически родственных БХШ 310. Эти белки обнаружены в цитоплазме, ядре и митохондриях (Kolesnichenko

et al., 2000b) и образуют своего рода «семейство», все члены которого состоят из двух типов субъединиц с мол. массами 56 и 66 кДа. При изучении цитоплазматических белков семейства БХШ 310 у злаков, различающихся по степени холодостойкости (озимые рожь и пшеница, кукуруза и пырейник сибирский) было обнаружено, что белок с мол. массой 310 кДа содержится только у озимой ржи (Kolesnichenko *et al.*, 1999). В то же время спектр митохондриальных белков семейства БХШ 310 у всех исследованных злаков был практически одинаков, наблюдаемые различия касались только количественного содержания этих белков (Kolesnichenko *et al.*, 2000c). Содержание митохондриального белка с мол. массой 310 кД было самым высоким у озимой ржи и пырейника, меньше у пшеницы и наименьшим у кукурузы (Kolesnichenko *et al.*, 2000b).

Установлено, что БХШ 310 имеет ядерное кодирование, при этом у озимой пшеницы гены, кодирующие белок с мол. массой 310 кДа, локализованы в 1-й и 6-й хромосомах D-генома (Войников *и др.*, 1998). Поскольку известно, что эти же хромосомы обуславливают переход митохондрий озимой пшеницы в особое «низкоэнергетическое» состояние (Войников *и др.*, 1987), было предположено, что этот белок может выступать в роли посредника в ядерно-митохондриальных взаимодействиях во время низкотемпературного стресса. Действительно, проведенные опыты показали, что экзогенный БХШ 310, добавленный к митохондриям ряда однодольных и двудольных растений, вызывает разобщение процессов окисления и фосфорилирования, при этом его действие не зависит от присутствия свободных жирных кислот (Побежимова *и др.*, 1996; Войников *и др.*, 2001a; Voinikov *et al.*, 1998; Kolesnichenko *et al.*, 2002). Это разобщение окислительного фосфорилирования, как оказалось, сопровождается термогенезом в митохондриях (Войников *и др.*, 2001b; Voinikov *et al.*, 2001).

Показано, что при инкубации изолированных митохондрий злаков с данным белком при 0 °C происходит быстрая ассоциация БХШ 310 с митохондриями (Kolesnichenko *et al.*, 2000a). В то же время этот ассоциированный белок элиминируется при обработке митохондрий проназой Е (Kolesnichenko *et al.*, 2000a; 2005). Установлено, что добавление к изолированным митохондриям злаков антитела, полученной против БХШ 310, позволяет устранить разобщающий эффект этого стрессового белка (Войников *и др.*, 2001a; Kolesnichenko *et al.*, 2001a). Поскольку антитела могут преципитировать антиген только на поверхности наружной мембраны митохондрий, то сделано заключение, что БХШ 310, вызывающий разобщение окисления и фосфорилирования, локализован снаружи митохондрий (Kolesnichenko *et al.*, 2001a). В дальнейшем эти данные были еще раз

подтверждены экспериментами по локализации БХШ 310 в препарате наружной мембраны митохондрий, а не митопластов, после инкубации изолированных митохондрий с данным белком (Kolesnichenko *et al.*, 2005). При изучении влияния антисыворотки на митохондрии показано, что уже при выделении митохондрий из «контрольных» растений из-за охлаждения растительного материала в процессе выделения происходит ассоциация БХШ 310 с митохондриями и разобщение окислительного фосфорилирования (Kolesnichenko *et al.*, 2001a).

Показано отсутствие *in vivo* разобщающей активности БХШ 310 в митохондриях двудольных растений (Grabelnych *et al.*, 2001b). Последний факт, по-видимому, связан с отсутствием в спектре двудольных растений полипептидов, по мол. массе соответствующих субъединицам БХШ 310 (Grabelnych *et al.*, 2001b). Отсутствие *in vivo* разобщающего эффекта БХШ 310 у исследованных двудольных растений позволяет утверждать, что механизм разобщения окисления и фосфорилирования с участием этого белка во время низкотемпературного стресса является специфичным для злаков и, возможно, представляет собой относительно недавнее эволюционное приобретение.

Имеющиеся данные свидетельствуют 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 (Kolesnichenko *и др.*, 2005; Kolesnichenko *et al.*, 2001d; Pobezhimova *et al.*, 2001). При исследовании влияния этих двух форм БХШ 310 на энергетическую активность митохондрий было показано различие в способности этих форм белка разобщать окисление и фосфорилирование в митохондриях растений (Pobezhimova *et al.*, 2001).

Поскольку в отличие от известных растительных разобщающих белков на разобщающую активность БХШ 310 не оказывает влияния бычий сывороточный альбумин (Войников *и др.*, 2001a; Kolesnichenko *et al.*, 2002), было предположено, что механизм действия БХШ 310 имеет отличный от действия этих белков механизм. Было показано, что наиболее значительное разобщающее действие БХШ 310 проявляется при окислении малата (Grabelnych *et al.*, 2001a). Однако это БХШ 310-зависимое разобщение не связано с активацией ротенон-нечувствительных НАДН дегидрогеназ (Kolesnichenko *et al.*, 2005).

Нами было предположено, что в митохондриях после инкубации с БХШ 310 электроны переносятся от комплекса I к БХШ 310, который, как было сказано выше, локализуется в наружной митохондриальной мембране митохондрий (Kolesnichenko *et al.*, 2005). Чтобы представить механизм разобщения окислительного фосфорилирования митохондрий

посредством цитоплазматического БХШ 310, мы руководствовались следующими данными: 1) уже известно об ассоциации цитоплазматических белков с митохондриями (Psarra and Sotiroudis, 1996); 2) в митохондриях имеются участки тесного контакта наружной и внутренней митохондриальной мембран (Reichert and Neure, 2002); 3) существуют данные о том, что комплекс I может быть частью комплекса митохондриальной поры (Fontaine *et al.*, 1998) и, следовательно, может взаимодействовать со структурными компонентами наружной мембраны митохондрий. В эксперименте *in vitro* и *in organello* было обнаружено, что БХШ 310 обладает способностью восстанавливать окисленный цитохром *c*, а, следовательно, участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, протекающих во внутренней мембране митохондрий и передавать электроны на цитохром *c* (Kolesnichenko *et al.*, 2005). Был проведен ингибиторный анализ, который с учетом имеющихся данных позволил заключить, что механизм разобщающего действия БХШ 310 состоит в «шунтировании» электронтранспортной цепи митохондрий таким образом, что электроны через БХШ 310 идут в обход убихинона и комплекса III (механизм III на рисунке) (Kolesnichenko *et al.*, 2005). Таким образом, в результате электроны минуя второй пункт сопряжения, и наблюдается разобщение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях.

Изучение функционирования БХШ 310 после кратковременной и длительной холодной обработки выявило различие в его активности в митохондриях холодоустойчивых и неустойчивых злаков (Grabelnych *et al.*, 2004). Оказалось, что холодовой шок приводит к усилению активности БХШ 310 в митохондриях озимой пшеницы, тогда как закаливание снижает его вклад. В митохондриях кукурузы вклад БХШ 310 в контроле был незначителен и снижался как при стрессе, так и при закаливании.

При выяснении роли БХШ 310 в растительных клетках показана термогенная роль данного белка (Войников *и др.*, 2001б; Grabelnych *et al.*, 2003) и его участие в снижении содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Колесниченко *и др.*, 2005; Kolesnichenko *et al.*, 2001с). Изучение термогенеза в проростках озимой пшеницы под влиянием холодового стресса позволило установить, что БХШ 310 вносит свой вклад в первые 30 мин действия стресса (Войников *и др.*, 2001б).

Эксперименты с изучением влияния на ПОЛ в изолированных митохондриях антисыворотки против БХШ 310, устраняющей его разобщающую активность, показали, что она значительно индуцирует ПОЛ в митохондриях, при этом она оказывала более сильное индуцирующее влияние на ПОЛ в митохондриях стрессированных проростков как озимой пшеницы, так и кукурузы, по сравнению с

митохондриями, выделенными их контрольных проростков (Kolesnichenko *et al.*, 2001с). Эксперименты *in vivo* показали, что активация в проростках озимой пшеницы всех митохондриальных разобщающих систем (альтернативной оксидазы, PUMP и БХШ 310) вызывает значительное уменьшение уровня содержания продуктов ПОЛ во время последующего низкотемпературного стресса (Kolesnichenko *et al.*, 2001b; Zykova *et al.*, 2001).

Таким образом, функции, выполняемые БХШ 310, схожи с функциями других разобщающих систем и заключаются в усилении термогенерации и снижении уровня содержания продуктов ПОЛ, что позволяет говорить об участии БХШ 310 в защите растений от низкотемпературного стресса. В то же время при закаливании растений к холоду, когда адаптационная перестройка метаболизма уже проведена и им нет необходимости тратить энергетические ресурсы организма на повышение температуры, отмечено снижение активности БХШ 310.

Свободные жирные кислоты

Известно, что свободные жирные кислоты (СЖК) являются эффективными разобщителями окислительного фосфорилирования в митохондриях. Большинство авторов в настоящее время придерживается представления об аллостерическом действии жирных кислот как кофакторов митохондриальных UCP-подобных разобщающих белков. В то же время известно, что катаболизм жирных кислот посредством β -окисления происходит именно в митохондриях. Далее образующийся в ходе β -окисления ацетил-СоА поступает в цикл Кребса, интермедианты которого являются субстратами дыхания митохондрий (Schulz, 1991). Использование СЖК в качестве субстратов дыхания установлено для прорастающих семян подсолнечника, салата-латука (Salon *et al.*, 1988; Raymond *et al.*, 1992), клубней картофеля (Theologis and Latics, 1980). Ранее было показано, что действие низких температур приводит к увеличению содержания свободных жирных кислот в митохондриях озимых злаков и разобщению окислительного фосфорилирования (Vojnikov *et al.*, 1983). При охлаждении растений в клетках значительно возрастает уровень активности фосфолипаз (Ruelland *et al.*, 2002), функционирование которых обеспечивает постоянный приток СЖК, в особенности линолевой, из цитоплазмы в митохондрии. Нами было предположено, что митохондрии растений при высоком содержании жирных кислот могут использовать их в качестве субстрата окисления. Действительно, это подтвердилось для митохондрий озимой пшеницы, которые были способны использовать линолевую кислоту в качестве субстрата окисления (Грабельных *и др.*, 2003). При ее окислении в транспорте электронов были задействованы все компоненты дыхательной

цепи, как фосфорилирующие, так и нефосфорилирующие (АО).

Поскольку известно, что мембраны митохондрий хорошо проницаемы для протонированных форм СЖК, но не для их анионных форм (Jezek *et al.*, 1998), можно предполагать, что постоянный приток экзогенных СЖК, протонирующихся в межмембранном пространстве митохондрий, будет эффективно снижать протонный градиент, образующийся на внутренней мембране митохондрий при работе митохондриальной электронтранспортной цепи в результате процесса β -окисления этих СЖК (механизм IV, представленный на рисунке). Таким образом, при относительно низком содержании СЖК эффективное разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях может обеспечиваться путем функционирования механизма «циклического оборота жирных кислот», при котором они выступают в качестве кофакторов UCP-подобных митохондриальных разобщающих белков (механизм II на рисунке), то при их высоком содержании СЖК способны вызывать эффективное разобщение окислительного фосфорилирования независимо от функционирования данного типа белков.

Ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы

Известно, что, в отличие от митохондрий животных, в митохондриях растений помимо ротенон-чувствительного комплекса I присутствует ряд ротенон-нечувствительных НАДН и НАДФН дегидрогеназ, локализованных как с наружной («внешние» НАД(Ф)Н дегидрогеназы), так и с внутренней («внутренние» НАД(Ф)Н дегидрогеназы) стороны внутренней мембраны митохондрий и передающих электроны на убихинон (Moller, 1997, 2001; Rasmusson *et al.*, 2004). В связи с этим митохондрии растений способны окислять экзогенный НАДН. Ни одна из ротенон-нечувствительных НАД(Ф)Н дегидрогеназ не является протонной помпой, и, следовательно, при их работе не создается трансмембранный градиент протонов (Moller, 1997). Данное ответвление митохондриальной дыхательной цепи открыто относительно недавно и все еще мало изучено. Однако к настоящему времени получен ряд данных, проливающих свет на строение и функции данного участка дыхательной цепи (Roberts *et al.*, 1995; Agius *et al.*, 1998; Moller, 2001; Rasmusson *et al.*, 2004) (механизм V на рисунке).

Было показано, что за ротенон-нечувствительное окисление внутримитохондриального НАДН в митохондриях растений отвечает НАДН дегидрогеназа с мол. массой 43 кДа (Menz and Day, 1996), которая возможно является одним и тем же белком, изолированным ранее Luethy с соавт. из митохондрий красной столовой свеклы с мол

массой 42 кДа.

Установлено, что относительные активности НАДН и НАДФН дегидрогеназ различаются в зависимости от типов тканей (Zottini *et al.*, 1993), и их активность в значительной степени регулируется цитозольными факторами (Moller, 1997). Показано, что активность «внешних» НАД(Ф)Н дегидрогеназ регулируется концентрацией Ca^{2+} и полиаминов (Knight *et al.*, 1996; Moller, 2001), в то время как активность «внутренней» НАДФН дегидрогеназы сильно зависит от обработки антимицином А (Geisler *et al.*, 2004). В нестрессированных клетках растений при концентрации Ca^{2+} 0.1 – 0.2 μ M (Price *et al.*, 1994) они практически неактивны, но в стрессовых условиях, когда концентрация Ca^{2+} возрастает до 1 – 2 μ M и одновременно усиливается синтез полиаминов (Smith, 1985), активность данных ферментов резко возрастает (Moller, 2001). При этом получены данные о том, что активация либо сверхэкспрессия «внешней» НАДН дегидрогеназы могут оказывать влияние на последующие участки дыхательной цепи, в частности, вызывать усиление экспрессии АО и UCP (Michalecka *et al.*, 2004).

В отличие от «внешней», «внутренняя» НАДН дегидрогеназа не чувствительна к Ca^{2+} (Agius *et al.*, 1998). Установлено, что ее активность возрастает по мере старения ткани растения (Moller, 2001). Svensson с соавт. (Svensson *et al.*, 2002) показали снижение активности «внутренней» ротенон-нечувствительной НАДН дегидрогеназы в митохондриях, изолированных из растений картофеля, подвергнутых холодовой обработке (6 дней, 5 °C). В наших экспериментах также показано, что холодовой шок и закаливание приводили к снижению дыхания, нечувствительного к ротенону, при окислении НАДН в митохондриях злаков, как устойчивых, так и неустойчивых к холоду (Grabelnych *et al.*, 2004). Предполагается, что функционирование «внутренней» НАДФН дегидрогеназы может оказывать прямое влияние на уровень восстановленности НАДФ в матриксе и, следовательно, на ряд биохимических процессов, в которых НАДФ выступает как коэнзим, в частности на биосинтез фолатов, оборот тиоредоксина и глутатиона и активацию альтернативной оксидазы (Agius *et al.*, 1998).

Следует сказать и о существовании в митохондриях растений еще одной ротенон-нечувствительной НАДН дегидрогеназы, локализованной во внешней митохондриальной мембране, которая переносит электроны через цитохром *c* на комплекс IV и нечувствительна к антимицину (Moller, 1997) (механизм VI на рисунке). Данных о ее функционировании в растительных митохондриях практически нет. В то же время нами показано усиление дыхания, нечувствительного к ротенону и антимицину А, во время низкотемпературного стресса (особенно в митохондриях озимой пшеницы) (Grabelnych *et*

al., 2004). Можно предполагать, что это дыхание связано с активностью данной дегидрогеназы, и полученные результаты могут свидетельствовать о ее важной роли в защите растений от низкотемпературного стресса.

АДФ/АТФ антипортер

АДФ/АТФ-антипортер (*англ.* «Adenine Nucleotide Translocator» - ANT), как известно, играет важную роль в процессе окислительного фосфорилирования, обеспечивая импорт АДФ и экспорт АТФ (Скулачев, 1989). Существование в митохондриях растений данного переносчика было впервые предположено на основании опытов по ингибированию скорости фосфорилирующего дыхания в митохондриях подсолнечника известным ингибитором АДФ/АТФ-антипортера животных атрактилазидом (Jung and Hanson, 1973). Позднее установили, что атрактилазид является менее эффективным ингибитором АДФ/АТФ-антипортера в митохондриях растений по сравнению с карбоксиатрактилазидом и бонгрековой кислотой (Passam *et al.*, 1975; Silva Lima and Denslow, 1979).

Растения содержат, по меньшей мере, два гена, кодирующих АДФ/АТФ-антипортер, как это описано для кукурузы (Bathgate *et al.*, 1989; Winning *et al.*, 1991), пшеницы (Lacobazzi *et al.*, 1996), картофеля (Emmermann *et al.*, 1991), арабидопсиса (Schuster *et al.*, 1993). До сих пор мало информации относительно экспрессии АДФ/АТФ-антипортера в растениях. Физиологическая роль АДФ/АТФ-антипортера не ограничивается выполнением им основной функции, наш интерес вызывает его участие в разобщении окислительного фосфорилирования митохондрий и в апоптических процессах клетки. АДФ/АТФ-антипортер участвует в индуцированном свободной жирной кислотой разобщении окислительного фосфорилирования, когда его уровень достаточно велик, а концентрация жирной кислоты низка (Vianello *et al.*, 1994). При этом АДФ, атрактилазид и карбоксиатрактилазид ингибировали потребление кислорода, стимулируемого низкими концентрациями пальмитата в митохондриях стеблей гипокотилей подсолнечника, гороха, корней кукурузы и гипокотилей сои (Vianello *et al.*, 1994). Нами показано, что АДФ/АТФ-антипортер в большей степени отвечает за разобщение, опосредованное действием насыщенных жирных кислот (C₁₂-C₁₈) в митохондриях проростков озимой пшеницы, в то время как разобщающий белок PUMP отвечает за разобщение, вызванное ненасыщенными жирными кислотами (Грабельных *и др.*, неопубликованные данные). Установлено, что низкие температуры (10 °С, 5 дней) и солевой стресс (2% NaCl, 24 часа) вызывали четырехкратную экспрессию АДФ/АТФ-антипортера в суспензионной культуре клеток риса (Hashimoto *et al.*, 1993). Усиление активности данного белка

отмечали и в митохондриях проростков кукурузы (популяции с низкой скоростью роста), выращенных при пониженной температуре (De Santis *et al.*, 1999). Как следует из данных Роров с соавт. (Роров *et al.*, 2002), разобщение, вызванное жирными кислотами в митохондриях клубней картофеля при холодовом воздействии, также было частично связано с функционированием АДФ/АТФ-антипортера. Все эти данные указывают на значимость данного белка в стрессовых условиях, которая может зависеть от модификации жирных кислот, являющихся активным центром переносчика.

Можно согласиться с мнением Laloї, который предположил, что АДФ/АТФ-антипортер принимает участие в процессе программированной клеточной смерти растений (1999). Как показано выше, в растительных митохондриях АДФ/АТФ-антипортер вовлечен в разобщение жирными кислотами. Кроме того, в растительных митохондриях показано присутствие проницаемой поры (Fortes *et al.*, 2001; Curtis and Wolpert, 2002; Tiwari *et al.*, 2002; Virolainen *et al.*, 2002) и запуск программированной клеточной смерти по пути апоптоза (Havel and Durzan, 1996; Yao *et al.*, 2002). В митохондриях животных, как мы знаем, длинноцепочечные жирные кислоты вызывают разобщение, которое связано с открытием поры (Wieckowski and Wojtczak, 1998), при этом АДФ/АТФ-антипортер в митохондриях животных является компонентом митохондриальной поры (Crompton, 1999). Поэтому можно предполагать, что в митохондриях растений АДФ/АТФ-антипортер также принимает участие в процессе программированной клеточной смерти являясь компонентом митохондриальной поры (механизм VII на рисунке).

Митохондриальная проницаемая пора

Разобщение окислительного фосфорилирования может происходить и при увеличении проницаемости внутренней митохондриальной мембраны, связанной с открытием поры в этой мембране (*англ.* "Permeability Transition Pore" - РТР). Открытие поры является важным фактором в процессах некроза и апоптоза (Zoratti and Szabo, 1995; Bernardi *et al.*, 1994, 1998; Hirsch *et al.*, 1998; Crompton, 1999). РТР рассматривается как мультибелковый комплекс, локализованный в местах контакта наружной и внутренней митохондриальных мембран. У животных РТР состоит, по меньшей мере, из вольт-зависимого анионного канала или порина (*англ.* "Voltage-Dependent Anion Channel" - VDAC), АДФ/АТФ-антипортера и циклофилина Д (Crompton, 1999). He и Lemasters (2002) предложили новую схему структуры и функционирования РТР с участием частично денатурированных мембранных белков, шаперонов и циклофилина Д. Хотя эта модель является спекулятивной, но, по мнению предложивших ее авторов, она объясняет многие

аспекты поведения поры. Открытие РТР в митохондриях животных ингибируется низкими значениями рН, адениновыми нуклеотидами, протонами, двухвалентными катионами, полиаминами, циклоспорином А (Bernardi *et al.*, 1994, 1998; Zoratti and Szabo 1995; Zamzami *et al.*, 1996). Предложено две модели функционирования РТР, которые отличаются чувствительностью к ионам Ca^{2+} , Mg^{2+} и циклоспорино А (He and Lemasters, 2002).

Хотя в митохондриях растений присутствуют компоненты, необходимые для формирования поры – порин (Parsons *et al.*, 1965; Zalman *et al.*, 1980; Smack and Colombini, 1985; Blumenthal *et al.*, 1993) и АДФ/АТФ-антипортер, присутствие циклоспорин А-чувствительной РТР в растительных митохондриях было предположено позднее на основании данных о влиянии циклоспорина А на энергетическое сопряжение митохондрий стеблей гороха (Vianello *et al.*, 1995). Но только недавно были представлены убедительные доказательства (Aragaus *et al.*, 2002). Эти доказательства были следующими: во-первых, добавление Ca^{2+} (но не Mg^{2+}) вызывало фосфат-зависимое набухание, которое полностью ингибировалось циклоспорином А; во-вторых, набухание митохондрий вызывало полное разрушение наружной мембраны и высвобождение цитохрома *c* и некоторых других полипептидов; в третьих, открытие поры изменялось под действием биохимических и физиологических факторов, таких как тиолоксилирующие реагенты, рН, свободные жирные кислоты и аноксия. Существование РТР в растительных митохондриях показано и другими авторами (Fortes *et al.*, 2001; Curtis and Wolpert, 2002; Tiwari *et al.*, 2002; Virolainen *et al.*, 2002). При этом митохондриальная пора была как чувствительной к циклоспорино А (Aragaus *et al.*, 2002; Tiwari *et al.*, 2002), так и нет (Fortes *et al.*, 2001; Curtis and Wolpert, 2002; Virolainen *et al.*, 2002). Отсутствие способности циклоспорина А ингибировать открытие поры позволило предположить другие функции циклофилинов в растительных митохондриях. При индукции открытия поры происходило набухание митохондрий и высвобождение цитохрома *c* (Aragaus *et al.*, 2002; Curtis and Wolpert, 2002; Tiwari *et al.*, 2002; Virolainen *et al.*, 2002), т.е. события, характерные для индукции митохондриальной поры у животных (Crompton, 1999). Высвобождение цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль было показано во время программированной клеточной смерти, вызванной экспозицией проростков огурцов при высокой температуре (Balk *et al.*, 1999). Установлено, что окислительный стресс, вызванный H_2O_2 , является индуктором открытия поры и приводит к программированной клеточной смерти в клетках арабидопсиса (Tiwari *et al.*, 2002). Таким образом, в растительных

митохондриях открытие РТР может быть одним из механизмов разобщения (схема VII на рисунке).

АТФ-чувствительный калиевый (K^+ АТФ) канал

Параллельно обнаружению РТР в растительных митохондриях было установлено существование в растениях K^+ - селективного, вольт-зависимого канала (K^+ АТФ канал), открытие которого предотвращало образование супероксид аниона в изолированных митохондриях пшеницы (Pastore *et al.*, 1999). В дальнейшем было показано, что открытие K^+ АТФ канала происходит в присутствии циклоспорина А, регулируется окислительно-восстановительным состоянием и ингибируется нуклеотидами (Petruzza *et al.*, 2001). Предполагается, что возможными функциями этого K^+ АТФ канала может быть регуляция объема митохондрий, термогенез, апоптоз и снижение образования активных форм кислорода (Pastore *et al.*, 1999; Petruzza *et al.*, 2001). Действительно, вход K^+ в митохондрии вызывал рассеивание электрохимического протонного градиента и снижал образование пероксида водорода в митохондриях гороха, при этом АТФ стимулировал, а циклоспорин А ингибировал сукцинат-зависимое образование H_2O_2 (Casolo *et al.*, 2003). Значительное усиление активности K^+ АТФ канала было показано в условиях водного стресса в клетках картофеля (Fratianne *et al.*, 2001) и гиперосмотического стресса в митохондриях пшеницы (Trono *et al.*, 2004).

Предполагается, что K^+ АТФ канал может замещать РТР в индукции набухания митохондрий и высвобождения цитохрома *c* в апоптических растительных клетках (Petruzza *et al.*, 2001). Предполагают, что этот канал может выступать в качестве антиоксидантной системы в ответ на стрессовые воздействия, предотвращая повреждение митохондрий путем снижения образования АФК (Fratianne *et al.*, 2001; Trono *et al.*, 2004).

Заключение

Таким образом, митохондрии растений обладают множеством компонентов, функционирование которых увеличивает проницаемость внутренней митохондриальной мембраны и приводит к снижению мембранного потенциала. Как показывает анализ литературных данных, изучение структуры, механизмов действия, физиологической роли этих компонентов, стало наиболее продуктивным в последнее десятилетие благодаря совершенствованию методов исследования. Оказалось, что эти компоненты являются как универсальными для клеток животных и растений (АДФ/АТФ-антипортер, свободные жирные кислоты и разобщающие белки, митохондри-

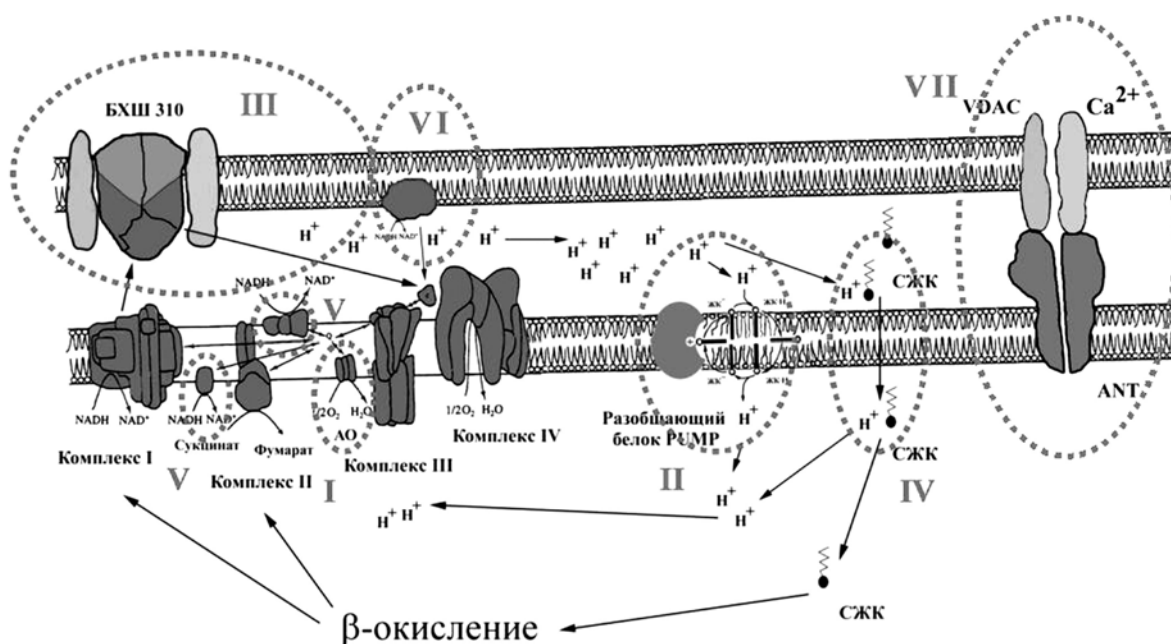


Рис. 1. Митохондриальные системы, принимающие участие в защите растений в стрессовых условиях. I - альтернативная цианидрезистентная оксидаза (АО); II - разобщающий белок РУМР; III - разобщающий белок БХШ 310; IV - непосредственное разобщение окислительного фосфорилирования свободными жирными кислотами; V - «внешняя» и «внутренняя» ротенон-нечувствительные НАДН дегидрогеназы; VI – ротенон и антимицин-нечувствительная НАДН дегидрогеназа; VII – митохондриальная пора, состоящая из порина (VDAC) и АДФ/АТФ-антипортера (ANT).

альная проницаемая пора), так и специфичными для растений (альтернативная оксидаза, ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н дегидрогеназы, БХШ 310, K^+ АТФ канал). Стратегия их действия в ответ на влияние биотических и абиотических факторов, заключается в том, что они защищают клетку от окислительного стресса путем снижения образования активных форм кислорода согласно механизму обратной связи. В соответствии с этим, гипотеза, выдвинутая В.П. Скулачевым (Скулачев, 1994), об особом механизме «мягкого» разобщения, которое ускоряет потребление O_2 и тормозит генерацию $O_2^{\cdot-}$, подтверждается. Можно говорить о том, что многочисленные системы, разобщающие окисление и фосфорилирование в митохондриях растений во время стресса, являются частью антиокислительной защиты клетки. Обнаружение новых структурных компонентов митохондрий ставит перед исследователями и много новых вопросов, среди которых, на наш взгляд, особенно актуальным и перспективным представляется изучение участия обнаруженных компонентов в программированной клеточной смерти.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 03-04-48151 и 05-04-97231).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Войников, В.К. (1980) Участие свободных жирных кислот в регуляции митохондриальной активности у озимой ржи при охлаждении. *Физиол. и биохим. культ. растений*, **12(5)**, 474-479.
- Войников, В.К., Грабельных, О.И., Колесниченко, А.В., Побежимова, Т.П. (2001a) Белок холодового шока 310 кД разобщает окислительное фосфорилирование в растительных митохондриях. *Физиол. растений*, **48(1)**, 89-94.
- Войников, В.К., Грабельных, О.И., Побежимова, Т.П., Корзун, А.М., Сумина, О.Н., Турчанинова, В.В., Колесниченко, А.В. (2001b) Стрессовый разобщающий растительный белок БХШ 310 индуцирует термогенез в митохондриях пшеницы при гипотермии *in vitro*. *ДАН*, **377**, 565-567.
- Войников, В.К., Грабельных, О.И., Побежимова, Т.П., Корзун, А.М., Турчанинова, В.В., Колесниченко, А.В. (2001в) Влияние различных термогенных систем митохондрий на температуру проростков озимой пшеницы во время холодового шока. *ДАН*, **378**, 700-702.
- Войников, В.К., Колесниченко, А.В., Побежимова, Т.П., Варакина, Н.Н. (1998) Первая и шестая хромосомы D-генама озимой мягкой пшеницы контролируют экспрессию белка холодового шока с молекулярной массой 310 кД. *Физиол. растений*, **45(5)**, 688-692.
- Войников, В.К., Корзун, А.М. (1984) Температура тканей побегов озимой пшеницы при холодовом шоке. *Известия СО АН СССР, Сер. биол.*, **2**, 22-25.
- Войников, В.К., Лузова, Г.Б., Лемзяков, В.П. (1981) Действие холода на количество свободных жирных

- кислот и активность митохондрий у озимой ржи. *Физиол. растений*, **28(1)**, 18-26.
- Войников, В.К., Побежимова, Т.П., Варакина, Н.Н., Жиров, Е.Г. (1987) Влияние отдельных хромосом морозоустойчивой мягкой пшеницы на морозоустойчивость растений и энергетическую активность митохондрий при гипотермии. *Генетика*, **23(2)**, 287-294.
- Грабельных, О.И., Побежимова, Т.П., Колесниченко, А.В., Сумина, О.Н., Пивоварова, Н.Ю., Войников В.К. (2003) Изучение возможности свободных жирных кислоты выступать в качестве субстрата окисления в митохондриях озимой пшеницы. *Вестник Харьковского Национального Аграрного Университета. Серия Биология*, **5(3)**, 7-15.
- Колесниченко, А.В., Боровский, Г.Б., Войников, В.К. (1997) Изменения в содержании белка 310 кД при холодом закаливании проростков озимой пшеницы. *Физиол. и биохим. культ. растений*, **29(2)**, 383-391.
- Колесниченко, А.В., Боровский, Г.Б., Войников, В.К., Мишарин, С.И., Антипина, А.И. (1996) Характеристика белка из озимой ржи, накапливающегося при гипотермии. *Физиол. растений*, **43(6)**, 894 – 899.
- Колесниченко, А.В., Войников, В.К., Боровский, Г.Б., Дорофеев, Н.В. (1999) Содержание стрессового белка 310 кДа в проростках озимой пшеницы при гипотермии и водном стрессе. *Физиол. и биох. культ. растений*, **31(2)**, 145-149.
- Колесниченко, А.В., Таусон, Е.Л., Зыкова, В.В., Клименко, Е.С., Грабельных, О.И., Побежимова, Т.П. (2005) Природа лиганда, связанного с разобщающим белком БХШ 310. *Физиол. растений*, **529(2)**, 216-220.
- Меденцев, А.Г., Арибасарова, А.Ю., Акменко, В.К. (1999) Регуляция и физиологическая роль циаидрезистентной оксидазы у грибов и растений. *Биохимия*, **64(11)**, 1457-1472.
- Мишарин, С.И., Антипина, А.И., Войников, В.К. (1997) Влияние холодового шока на антигенный состав озимой ржи и пшеницы. *Физиол. и биох. культ. растений*, **29(3)**, 215-219.
- Побежимова, Т.П., Колесниченко, А.В., Войников, В.К., Варакина, Н.Н., Боровский, Г.Б. (1996) Стрессовый белок 310 кД при гипотермии влияет на энергетическую активность растительных митохондрий. *Доклады РАН*, **350**, 715-718.
- Скулачев, В.П. (1989) Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 564 с.
- Скулачев, В.П. (1994) Снижение внутриклеточной концентрации O₂ как особая функция дыхательных систем клетки. *Биохимия*, **59(12)**, 910-912.
- Шугаев, А.Г. (1991) Некоторые особенности структурной организации и окислительной активности дыхательной цепи митохондрий растений. *Успехи совр. биол.*, **111**, 178-191.
- Affourtit, C., Albury, M.S., Crichton, P.G. and Moore A.L. (2001) Exploring the molecular nature of the alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett.*, **510**, 121-126.
- Agius, S.C., Bykova, N.V., Igamberdiev, A.U. and Moller, I.M. (1998) The internal rotenone-insensitive NADPH dehydrogenase contributes to malate oxidation by potato tuber and pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum*, **104**, 329-336.
- Albrecht, G. and Wiedenroth, E-M. (1994) Protection against activated oxygen following re-aeration of hypoxically pretreated wheat shoots. The response of the glutathione system. *J. Exp. Bot.*, **45**, 449-455.
- Almeida, A.M., Jarmuszkiwicz, W., Khomsi, H., Arruda, P., Vercesi, A.E. and Sluse, F.E. (1999) Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling protein sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit. *Plant Physiol.*, **119**, 1323-1329.
- Amor, Y., Chevion, M. and Levine, A. (2000) Anoxia pretreatment protects soybean cells against H₂O₂-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of the alternative oxidase. *FEBS Lett.*, **477**, 175-180.
- Arpagaus, S., Rawyler, A. and Braendle, R. (2002) Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. *J. Biol. Chem.*, **277**, 1780-1787.
- Balk, J., Leaver, C.J. and McCabe, P.F. (1999) Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett.*, **463**, 151-154.
- Bathgate, B., Baker, A. and Leaver, C.J. (1989) Two genes encode the adenine nucleotide translocator of maize mitochondria. Isolation, characterization and expression of the structural genes. *Eur. J. Biochem.*, **183**, 303-310.
- Bernardi, P., Basso, E., Colonna, R., Costantini, P., Lisa, F.D., Eriksson, O., Fontaine, E., Forte, M., Ichas, F., Massari, S., Nicolli, A., Petronilli, V. and Scorrano, L. (1998) Perspectives on the mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 200-206.
- Bernardi, P., Broekemeier, K.M. and Pfeiffer, D.R.J. (1994) Recent progress on regulation of the mitochondrial PTP; a cyclosporinsensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *Bioenerg. Biomembr.*, **26**, 509-517.
- Biemelt, S., Keeman, U. and Albrecht, G. (1998) Re-aeration following hypoxia leads to activation of the antioxidative defence system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol.*, **116**, 651-658.
- Blumenthal, A., Kahn, K., Beja O., Galun, E., Colombini, M. and Breiman, A. (1993) Purification and characterization of the voltage-dependent anion-selective channel protein from wheat mitochondrial membrane. *Plant Physiol.*, **101**, 579-587.
- Borecky, J., Maia, I.G., Costa, D.T., Jezek, P., Chaimovich, H., de Andrade, P.B.M., Vercesi, A.E. and Arruda, P. (2001) Functional reconstruction of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **505**, 240-244.
- Bouillaud, F., Coulpan, E., Pecqueur, C. and Ricquier D. (2001) Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 107-119.
- Breidenbach, R.W., Saxton, M.J., Hansen, L.D. and Criddle, R.S. (1997) Heat generation and dissipation in plants: can the alternative oxidative phosphorylation pathway serve a thermoregulatory role in plant tissues other than specialized organs? *Plant Physiol.*, **114**, 1137-1140.
- Calegario, F.F., Cossio, R.G., Fagian, M.M., Almeida, F.V., Jardim, W.F., Jezek, P., Arruda, P. and Vercesi, A.E. (2003) Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**, 211-220.
- Casolo, V., Braidot, E., Chianidussi, E., Vianello, A. and Macri, F. (2003) K⁺_{ATP} channel opening prevents succinate-dependent H₂O₂ generation by plant mitochondria. *Plant Physiol.*, **118**, 313-318.
- Considine, M.J., Daley, D.O. and Whelan, J. (2001) The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiol.*, **126**, 1619-1629.
- Considine, M.J., Goodman, M., Ehtay, K.S., Laloi, M., Whelan, J., Brand, M.D. and Sweetlove, L.J. (2003) Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. *J. Biol. Chem.*, **278**, 22298-22302.
- Considini, M.J., Holtzapffel, R.C., Day, D.A., Whelan, J. and Millar, A.H. (2002) Molecular distinction between

- alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol.*, **129**, 949-953.
- Costa, A.D.T., Nantes, I.L., Jezek, P., Leite, A., Arruda, P. and Vercesi, A.E. (1999) Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 527-533.
- Crompton, M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.*, **341**, 233-249.
- Curtis, M.J. and Wolpert, T.J. (2002) The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death. *Plant J.*, **29**, 295-312.
- Dalgaard, L.T. and Pedersen, O. (2001) Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and type II diabetes. *Diabetologia*, **44**, 946-965.
- Day, D.A., Millar, A.H., Wiskich, J.T. and Whelan, J. (1994) Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria. *Plant Physiol.*, **106**, 1421-1426.
- De Santis, A., Landi, P. and Genchi, G. (1999) Changes of mitochondrial properties in maize seedlings associated with selection for germination at low temperature. Fatty acid composition, cytochrome *c* oxidase, and adenine nucleotide translocase activities. *Plant Physiol.*, **119**, 743-754.
- Dempsey, D.A., Shah, J. and Klessing, D.F. (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Cri. Rev. Plant Sci.*, **18**, 547-575.
- Diehl, A.M. and Hoek, J.B. (1999) Mitochondrial uncoupling: role of uncoupling protein anion carriers and relationship to thermogenesis and weight control "The benefits of losing control". *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 493-506.
- Dulloo, A.G., Samec, S. and Seydoux, J. (2001) Uncoupling protein 3 and fatty acid metabolism. *Biochem. Soc. Transact.*, **29**, 785-790.
- Elthon, T.E., Nickels, R.L. and McIntoch, L. (1989) Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.*, **89**, 1311-1317.
- Emmermann, M., Braun, H.P. and Schmitz, U.K. (1991) The ADP/ATP translocator from potato has a long amino-terminal extension. *Curr. Genet.*, **20**, 405-410.
- Fleury, Ch., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D. and Warden, C.H. (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.*, **15**, 269-272.
- Fontaine, E., Eriksson, O., Ichas, F. and Bernardi, P. (1998) Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.*, **273**, 12662-12668.
- Fortes, F., Castilho, R.F., Catisti, R., Carnieri, E.G.S. and Vercesi, A.E. (2001) Ca²⁺ induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 43-51.
- Fратиани, A., Pastore, D., Pallotta, M.L., Chiatante, D. and Passarella, S. (2001) Increase of membrane permeability of mitochondria isolated from water stress adapted potato cells. *Biosci. Rep.*, **21**, 81-91.
- Garlid, K.D., Jaburek, M. and Jezek, P. (1998) The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.*, **438**, 10-14.
- Garlid, K.D., Jaburek, M. and Jezek, P. (2001) Mechanism of uncoupling protein action. *Biochem. Society Transact.*, **29**, 803-805.
- Gaston, S., Ribas-Carbo, M., Busquets, S.M., Berry, J.A., Zabalza, A. and Royuela, M. (2003) Changes in mitochondrial electron partitioning in response to herbicides inhibiting branched-chain amino acid biosynthesis in soybean. *Plant Physiol.*, **133**, 1351-1359.
- Geisler, D.A., Jonansson, F.I., Svensson, A.S. and Rasmusson, A.G. (2004) Antimycin A treatment decreases respiratory internal rotenone-insensitive NADH oxidation capacity in potato leaves. *BMC Plant Biol.*, **4**, 8.
- Gimeno, R.E., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Shyjan, A.W., Gimeno, C.J., Iris, F., Ellis, S.J., Woolf, E.A. and Tartaglia, L.A. (1997) Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog. *Diabetes*, **46**, 900-906.
- Gonzalez-Meler, M.A., Ribas-Carbo, M., Giles, L. and Siedow, J.N. (1999) The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. *Plant Physiol.*, **120**, 765-772.
- Grabelnych, O.I., Kolesnichenko, A.V., Pobezhimova, T.P., Tourchaninova, V.V., Korzun, A.M., Koroleva, N.A., Zykova, V.V. and Voinikov, V.K. (2003) The role of different plant seedling shoots mitochondrial uncoupling systems in thermogenesis during low-temperature stress. *J. Therm. Biol.*, **28**, 571-580.
- Grabelnych, O., Pobezhimova, T., Kolesnichenko, A. and Voinikov, V. (2001a) 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.*, **26**, 47-53.
- Grabelnych, O.I., Pobezhimova, T.P., Kolesnichenko, A.V. and Voinikov, V.K. (2001b) Stress protein CSP 310 cause oxidation and phosphorylation uncoupling during low-temperature stress only in cereal but not in dycotyledone mitochondria. *J. Immunoassay Immunochem.*, **22**, 275-287.
- Grabelnych, O.I., Sumina, O.N., Funderat, S.P., Pobezhimova, T.P., Voinikov, V.K. and Kolesnichenko, A.V. (2004) The distribution of electron transport between the main cytochrome and alternative pathways in plant mitochondria during short-term cold stress and cold hardening. *J. Thermal Biol.*, **29**, 165-175.
- Hanak, P. and Jezek, P. (2001) Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis – UCP4 as the ancestral uncoupling protein. *FEBS Lett.*, **495**, 137-141.
- Hashimoto, H., Nishi, R., Umeda, M., Ichimiya, H. and Kato, A. (1993) Isolation and characterization of a rice cDNA clone encoding ATP-ADP translocator. *Plant. Mol. Biol.*, **22**, 163-164.
- Havel, L. and Durzan, D.J. (1996) Apoptosis in plants. *Bot. Acta*, **109**, 268-277.
- He, L. and Lemasters, J.J. (2002) Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett.*, **512**, 1-7.
- Hirsch, T., Susin, S.A., Marzo, I., Marchetti, P., Zamzami, N. and Kroemer, G. (1998) Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Biol. Toxicology*, **14**, 141-145.
- Huq, S. and Palmer, J.M. (1978) Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria. *FEBS Lett.*, **95**, 217-220.
- Ito, K. (1999) Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Plant Sci.*, **149**, 167-173.
- Jarmuszkiewicz, W., Milani, G., Fortes, F., Schreiber, A.Z., Sluse, F.E. and Vercesi, A.E. (2000) First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Lett.*, **467**, 145-149.
- Jarmuszkiewicz, W., Miyasaka, A.A., Sluse-Goffart, C.M., Sluse, F.E. and Vercesi, A.E. (1998) Linoleic acid-induced activity of plant uncoupling mitochondrial protein in purified tomato fruit mitochondria during resting, phosphorylating, and progressively uncoupled respiration. *J. Biol. Chem.*, **273**, 34882-34886.
- Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C.M., Hryniewiecka, L. and Sluse, F.E. (1999) Identification and characterisation of

- a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 23198-23202.
- Jezek, P. (1999) Fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 457-465.
- Jezek, P. (2002) Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins - UCPn. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **34**, 1190-1206.
- Jezek, P. and Garlid, K.D. (1998) Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biology*, **30**, 1163-1168.
- Jezek, P., Borecky, J., Zackova, M., Costa, A.D. and Arruda, P. (2001) Possible basic and specific functions of plant uncoupling proteins (pUCP). *Biosci. Rep.*, **21**, 237-245.
- Jezek, P., Costa, A.D.T. and Vercesi, A.E. (1997) Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24272-24278.
- Jezek, P., Engstova H., Zackova M., Vercesi A.E., Costa A.D.T., Arruda P. and Garlid K.D. (1998) Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 319-327.
- Jezek, P., Zackova, M., Kosarova, J., Rodrigues, E.T.S., Madeira, V.C.M. and Vicente, J.A.F. (2000) Occurrence of plant-uncoupling mitochondrial protein (PUMP) in diverse organs and tissues of several plants. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **32**, 549-561.
- Jung, D.W. and Hanson, J.B. (1973) Atractyloside inhibition of adenine nucleotide transport in mitochondria from plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **325**, 189-192.
- Klingerberg, M. (1990) Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 108-112.
- Klingenberg, M. (1999) Uncoupling protein – a useful energy dissipator. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 419-430.
- Klingenberg, M. and Huang, S.G. (1999) Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, **1415**, 271-296.
- Knight, H., Trewavas, A.J. and Knight, M.R. (1996) Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*, **8**, 489-503.
- Knutson, R.M. (1974) Heat production and temperature regulation in eastern skunk cabbage. *Science*, **186**, 746-747.
- Kolesnichenko, A., Grabelnych, O., Pobezhimova, T. and Voinikov, V. (2000a) The association of plant stress uncoupling protein CSP 310 with winter wheat mitochondria *in vitro* during exposure to low temperature. *J. Plant Physiol.* **156**, 805-807.
- Kolesnichenko, A.V., Grabelnych, O.I., Pobezhimova, T.P. and Voinikov, V.K. (2005) Non-phosphorylating bypass of the plant mitochondrial respiratory chain by stress protein CSP310. *Planta*, **221**, 113-122.
- Kolesnichenko, A.V., Grabelnych, O.I., Sumina, O.N., Pobezhimova, T.P. and Voinikov, V.K. (2001a) An influence of antiserum against winter wheat stress uncoupling protein CSP 310 on energetic activity of some plant species mitochondria. *J. Immunoassay Immunochem.*, **22**, 75-83.
- Kolesnichenko, A.V., Grabelnych, O.I., Tourchaninova, V.V., Zykova, V.V., Koroleva, N.A., Pobezhimova, T.P. and Voinikov, V.K. (2001c) An influence of stress protein CSP 310 and antiserum against this protein on lipid peroxidation in cereal mitochondria. *J. Immunoassay Immunochem.*, **22**, 113-126.
- Kolesnichenko, A., Grabelnych, O., Zykova, V., Koroleva, N., Pobezhimova, T., Konstantinov, Yu. and Voinikov, V. (2001b) 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 Biology*, **1**, 1-6.
- Kolesnichenko, A., Ostroumova, E., Zykova, V. and Voinikov V. (1999) The comparison of proteins with immunochemical affinity to stress protein 310 kD in cytoplasmic proteins of winter rye, winter wheat, *Elymus* and maize. *J. Therm. Biol.*, **24**, 211-215.
- Kolesnichenko, A.V., Pobezhimova, T.P., Grabelnych, O.I., Tourchaninova, V.V., Korzun, A.M., Koroleva, N.A., Zykova, V.V. and Voinikov, V.K. (2003) Difference between the temperature of non-hardened and hardened winter wheat seedling shoots during cold stress. *J. Thermal Biol.*, **28**, 235-244.
- Kolesnichenko A.V., Pobezhimova T.P., Grabelnych, O.I. and Voinikov, V.K. (2002) Stress-induced protein CSP 310: a third uncoupling system in plants. *Planta*, **215**, 279-286.
- Kolesnichenko, A.V., Zykova, V.V. and Voinikov V.K. (2000b) 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. Therm. Biol.*, **25**, 203-209.
- Kolesnichenko, A.V., Zykova, V.V. and Voinikov, V.K. (2001d) Regulation of plant uncoupling protein CSP 310 activity in winter wheat seedlings shoots during cold stress. *Annual Wheat Newslett.*, **47**, 156-158.
- Kolesnichenko, A.V., Zykova, V.V., Grabelnych, O.I., Sumina, O.N., Pobezhimova, T.P. and Voinikov, V.K. (2000c) Screening of mitochondrial proteins in winter rye, winter wheat, *elymus* and maize with immunochemical affinity to the stress protein 310 kD and their intramitochondrial localization in winter wheat. *J. Therm. Biol.*, **25**, 245-249.
- Korshunov, S.S., Korkina, O.V., Ruuge, E.K., Skulachev, V.P. and Starkov, A.A. (1999) Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O₂ and H₂O₂ by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett.*, **435**, 215-218.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P. and Starkov, A.A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.*, **416**, 15-18.
- Kowaltowski, A.J., Costa, A.D.T. and Vercesi, A.E. (1999) Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Lett.*, **425**, 213-216.
- Kumar, S., Patil, B.C. and Sinha, S.K. (1990) Cyanide resistant respiration is involved in temperature rise in ripening mangoes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 818-822.
- Lacobazzi, V., Poli, A., Blanco, A. and Palmieri, F. (1996) Nucleotide sequence of two genes (accession ns X95863 for ANT-G1 and X95864 for ANT-G2) encoding the adenine nucleotide translocator of wheat (*Triticum turgidum*) mitochondria. *Plant Physiol.*, **11**, 1436.
- Lacomme, Ch. and Roby, D. (1999) Identification of new early markers of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **459**, 149-153.
- Laloi, M. (1999) Plant mitochondrial carriers: an overview. *Cell. Mol. Life Sci.*, **56**, 918-944.
- Laloi, M., Klein, M., Riesmeier, J.W., Muller-Rober, B., Fleury, C., Bouilland, F. and Rieguier, D. (1997) A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature*, **389**, 135-136.
- Leach, G.R., Krab, K., Whitehouse, D.G. and Moore, A.L. (1996) Kinetic analysis of the mitochondrial quinol-oxidizing enzymes during development of thermogenesis in *Arum maculatum* L. *Biochem. J.*, **317**, 313-319.
- Lennon, A.M., Neueschwander, U.H., Ribas-Carbo, M., Giles, L., Ryals, J.A. and Siedow, J.N. (1997) The effects of salicylic acid and tmv infection upon the alternative oxidase of tobacco. *Plant Physiol.*, **115**, 783-791.
- Maia, I.G., Benedetti, C.E., Leite, A., Turcinelli, S.R., Vercesi, A.E. and Arruda, P. (1998) AtPUMP: an Arabidopsis gene encoding a uncoupling mitochondrial protein. *FEBS Lett.*, **429**, 403-406.

- Maxwell, D.P., Nickels, R. and McIntosh, L. (2002) Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J.*, **29**, 269-279.
- Maxwell, D.P., Wang, Y. and McIntosh, L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8271-8276.
- McCaig, T.N. and Hill, R. (1977) Cyanide-insensitive respiration in wheat: cultivar differences and effects of temperature, carbon dioxide and oxygen. *Can. J. Bot.*, **55**, 549-555.
- McIntosh, L. (1994) Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol.*, **105**, 781-786.
- McIntosh, L., Eichler, T., Gray, G., Maxwell, D., Nickels, R. and Wang, Y. (1998) Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 278-284.
- Meeuse, B.J.D. (1975) Thermogenic respiration in aroids. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 117-126.
- Menz, R.I. and Day, D.A. (1996) Purification and characterization of a 43-kDa rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from plant mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23117-23120.
- Michalecka, A.M., Agius, S.C., Moller, I.M. and Rasmusson, A.G. (2004) Identification of a mitochondrial external NADPH dehydrogenase by overexpression in transgenic *Nicotiana sylvestris*. *Plant J.*, **37**, 415-425.
- Millar, A.H., Wiskich, J.T., Whelan, J. and Day, D.A. (1993) Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.*, **329**, 259-262.
- Millenaar, F.F., Ganzalez-Meler, M.A., Fiorani, F., Welschen, R., Ribas-Carbo, M., Siedow, J.N., Wagner, A.M. and Lambers, H. (2003) Regulation of alternative oxidase activity in six wild monocotyledonous species. An *in vivo* study at the whole root level. *Plant Physiol.*, **126**, 376-387.
- Miroux, M., Frossard, V., Raimbault, S., Ricquier, D. and Bouillaud, F. (1993) The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins. *EMBO J.*, **12**, 3739-3745.
- Moller, I.M. (1997) The oxidation of cytosolic NAD(P)H by external NAD(P)H dehydrogenases in the respiratory chain of plant mitochondria. *Physiol. Plantarum*, **100**, 85-90.
- Moller, I.M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 561-591.
- Moore, A.L. and Siedow, J.N. (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1059**, 121-140.
- Moynihan, M.R., Ordentlich, A. and Raskin, I. (1995) Chilling-induced heat evolution in plants. *Plant Physiol.*, **108**, 995-999.
- Murayama, S. and Handa, H. (2000) Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial uncoupling proteins in wheat: wheat UCP genes are not regulated by low temperature. *Mol. Gen. Genet.*, **264**, 112-118.
- Murcha, M.W., Huang, T. and Whelan, J. (1999). Import of precursor proteins into mitochondria from soybean tissues during development. *FEBS Lett.*, **464**, 53-59.
- Nagy, K.A., Odell, D.K. and Seymour, R.S. (1972) Temperature regulation by the inflorescence of *Philodendron*. *Science*, **178**, 1195-1197.
- Nantes, I.L., Fagian, M.M., Catisti, R., Arruda, P., Maia, I.G. and Vercesi, A.E. (1999) Low temperature and aging-promoted expression of PUMP in potato tuber mitochondria. *FEBS Lett.*, **457**, 103-106.
- Nicholls, D.G. and Rial, E. (1999) A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 399-406.
- Ordentlich, A., Linzer, R.A. and Raskin, I. (1991) Alternative respiration and heat evolution in plants. *Plant Physiol.*, **97**, 1545-1550.
- Palou, A., Pico, C., Bonet, M. L. and Oliver, P. (1998) The uncoupling protein, thermogenin. *Int. J. Biochem. and Cell Biology*, **30**, 7-11.
- Parsons, H.L., Yip, J.Y.H. and Vanlerberghe, G.C. (1999) Increased respiratory restriction during phosphate-limited growth in transgenic tobacco cells lacking alternative oxidase. *Plant Physiol.*, **121**, 1309-1320.
- Parsons, D.F., Bonner, W.D. and Verboon, J.G. (1965) Electron microscopy of isolated plant mitochondria and plastids using both thin-section and negative staining techniques. *Can. J. Bot.*, **43**, 647-655.
- Passam, H.C. and Coleman, J.O.D. (1975) The effects of atractyloside and bongkreic acid on Jerusalem artichoke mitochondria in relation to adenine nucleotide translocation. *J. Exp. Bot.*, **26**, 536-543.
- Pastore, D., Fratianni, A., Di Pede, S. and Passarella, S. (2000) Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. *FEBS Lett.*, **470**, 88-92.
- Pastore, D., Stoppelli, M.C., Di Fonzo, N. and Passarella, S. (1999) The existence of the K⁺ channel in plant mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **274**, 26683-26690.
- Petrussa, E., Casolo, V., Braidot, E., Chiandussi, E., Macri, F. and Vianello, A. (2001) Cyclosporin A induces the opening of a potassium-selective channel in higher plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 107-117.
- Pobezhimova, T., Grabelnych, O., Kolesnichenko, A. and Voinikov, V. (2001) The comparison of uncoupling activity of constitutively synthesized and stress-induced forms of winter rye stress uncoupling protein CSP 310. *J. Therm. Biol.*, **26**, 95-101.
- Polidoros, A.N., Mylona, P.V., Pasentsis, K., Scandalios, J.G. and Tsaftaris, A.S. (2005) The maize alternative oxidase 1a (Aox1a) gene is regulated by signals related to oxidative stress. *Redox. Rep.*, **10**, 71-78.
- Popov, V.N., Markova, O.V., Mokhova, E.N. and Skulachev, V.P. (2002) Effects of cold exposure *in vivo* and uncouplers and recouplers *in vitro* on potato tuber mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1553**, 232-237.
- Popov, V.N., Simonyan, R.A., Skulachev, V.P. and Starkov, A.A. (1997) Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS Lett.*, **415**, 87-90.
- Price, A.H., Taylor, A., Ripley, S.J., Griffiths, A., Trewavas, A.J. and Knight, M.R. (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell*, **6**, 1301-1310.
- Psarra, A-M.G. and Sotiroudis, T.G. (1996) Subcellular distribution of phosphorylase kinase in rat brain. Association of the enzyme with mitochondria and membranes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28**, 29-42.
- Purvis, A.C. (1997) Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol. Plant.*, **100**, 165-170.
- Purvis, A.C. and Shewfelt, R.L. (1993) Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues. *Physiol. Plant.*, **88**, 712-718.
- Raimbault, S., Dridi, S., Denjean, F., Lachuer, J., Couplan, E., Bouillaud, F., Bordas, A., Duchamp, C., Taouis, M. and Ricquier, D. (2001) An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem. J.*, **353**, 441-444.
- Raskin, I., Ehmann, A., Melander, W.R. and Meeuse, B.J.D. (1987) Salicylic acid: a natural inducer of heat production in arum lilies. *Science*, **237**, 1601-1602.

- Raskin, I., Turner, I.M. and Melander, W.R. (1989) Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2214–2218.
- Rasmusson, A.G., Soole, K.L. and Elthon, T.E. (2004) Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Biol.*, **55**, 23-39.
- Raymond, P., Spiteri, A., Dieuaide, M., Gerhard, T. and Pradet, A. (1992) Peroxisomal β -oxidation of fatty acids and citrate formation by a particulate fraction from early germinating sunflower seeds. *Plant Physiol. Biochem.*, **30**, 153-162.
- Reichert, A.S. and Neupert, W. (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria—role in protein transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **1592**, 41–49.
- Rhoads, D.M. and McIntosh, L. (1992) Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *Plant Cell*, **4**, 1131-1139.
- Rhoads, D.M. and McIntosh, L. (1993) 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.*, **21**, 615-624.
- Ribas-Carbo, M., Aroca, R., Conzalez-Meler, M.A., Irigoyen, J.J. and Sanchezdiaz, M. (2000) The electron partitioning between the cytochrome and alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivars of maize different in chilling sensitivity. *Plant Physiol.*, **122**, 199-204.
- Rich, P. (1978) Quinol oxidation in *Arum maculatum* mitochondria and its application to the assay, solubilization and partial purification of the alternative oxidase. *FEBS Lett.*, **96**, 252-256.
- Ricquier, D. and Bouillaud, F. (2000a) Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J. Physiol.*, **529**, 3-10.
- Ricquier, D. and Bouillaud, F. (2000b) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.*, **345**, 161-179.
- Roberts, T.H., Fredlund, K.M. and Moller, I.M. (1995) Direct evidence for the presence of two external NAD(P)H dehydrogenases coupled to the electron transport chain in plant mitochondria. *FEBS Lett.*, **373**, 307-309.
- Robson, C.A. and Vanlerberghe, G.C. (2002) Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and – independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiol.*, **129**, 1908-1920.
- Ruelland, E., Cantrel, C., Gawer, M., Kader, J.C. and Zachowski, A. (2002) Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in Arabidopsis suspension cells. *Plant Physiol.*, **130**, 999-1007.
- Salon, C., Raymond, P. and Pradet, A. (1988) Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *J. Biol. Chem.*, **263**, 12278-12287.
- Samec, S., Seydoux, J. and Dulloo, A.G. (1998) Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate? *FASEB J.*, **12**, 715-724.
- Scherphor, G.L., Scarpa, A. and Toonenbergen, A. (1972) The effect of local anesthetics on the hydrolysis of free and membrane-bound phospholipids catalysed by various phospholipases. *Biochim. Biophys. Acta*, **270**, 226-270.
- Schulz, H. (1991) Beta oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1081**, 109-120.
- Schuster, W., Kloska, S. and Brennicke, A. (1993) An adenine nucleotide translocator gene from Arabidopsis thaliana. *Biochim. Biophys. Acta*, **1172**, 205-208.
- Seymour, R.S. and Blaylock, A.J. (1999) Switching off the heater: influence of ambient temperature on thermoregulation by eastern skunk cabbage *Symplocarpus foetidus*. *J. Exp. Botany*, **50**, 1525-1532.
- Seymour, R.S. and Schlutze-Motel, P. (1996) Thermoregulating lotus flowers. *Nature*, **383**, 305.
- Siedow, J.N. and Umbach A.L. (1995) Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell*, **7**, 821-831.
- Siedow, J.N. and Umbach, A.L. (2000) The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation and regulatory diversity. *Biochim. Biophys. Acta*, 432-439.
- Siedow, J.N. and Umbach, A.L. and Moore, A.L. (1995) The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett.*, **362**, 10-14.
- Sieger, S.M., Kristensen, B.K., Robson, C.A., Amirsadeghi, S., Eng, E.W., Abdel-Mesih, A., Moller, I.M. and Vanlerberghe, G.C. (2005) The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells. *J. Exp. Bot.*, **416**, 1499-515.
- Silva Lima, M. and Denslow, N.D. (1979) The effect of atractyloside and carboxyatractyloside on adenine nucleotide translocation in mitochondria of *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. Serido. *Arch. Biochem. Biophys.*, **193**, 368-372.
- Simons, B.H., Millenaar, F.F., Mulder, L., Van Loon, L.C. and Lambers, H. (1999) Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of Arabidopsis with *Pseudomonas syringae* pv tomato. *Plant. Physiol.*, **120**, 529-538.
- Skulachev, V.P. (1991) Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.*, **294**, 158–162.
- Skulachev, V.P. (1999) Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 431-445.
- Sluse, F.E. and Jarmuszkiewicz, W. (2000) Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondria from tomato fruit. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **33**, 259-268.
- Sluse, F.E. and Jarmuszkiewicz, W. (2002) Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects. *FEBS Lett.*, **510**, 117-120.
- Sluse, F.E., Almeida, A.M., Jarmuszkiewicz, W. and Vercesi, A.E. (1998) Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. *FEBS Lett.*, **433**, 237-240.
- Smack, D.F. and Colombini, M. (1985) Voltage-dependent channels found in the membrane fraction of corn mitochondria. *Plant Physiol.*, **79**, 1094-1097.
- Smith, T.A. (1985) Polyamines. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **36**, 117–143.
- Stewart, C.R., Martin, B.A., Reding, L. and Cerwick, S. (1990a) Respiration and alternative oxidase in corn seedlings during germination at different temperatures. *Plant Physiol.*, **92**, 755-760.
- Stewart, C.R., Martin, B.A., Reding, L. and Cerwick, S. (1990b) Seedling growth, mitochondrial capacity of corn genotypes differing in cold tolerance. *Plant Physiol.*, **92**, 761-766.
- Stuart, J.A., Brindle, K.M., Harper, J.A. and Brand, M.D. (1999) Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 517-525.
- Stuart, J.A., Cadenas, S., Jekabsons, M.B., Roussel, D. and Brand, M.D. (2001) Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 144-158.
- Svensson, A.S., Johansson, F.I., Moller, I.M. and Rasmusson, A.G. (2002) Cold stress decreases the capacity for

- respiratory NADH oxidation in potato leaves. *FEBS Lett.*, **517**, 79-82.
- Szal, B., Jolivet, Y., Hazenfratz-Sauder, M.-P., Dizengremel, P. and Rychter, A.M. (2003) Oxygen concentration regulates alternative oxidase expression in barley roots during hypoxia and post-hypoxia. *Physiol. Plant.*, **119**, 494-502.
- Takumi, S., Tomioka, M., Eto, K., Naydenov, N. and Nakamura, C. (2002) Characterisation of two non-homoeologous nuclear genes encoding mitochondrial alternative oxidase in common wheat. *Gen. Genet. Syst.*, **77**, 81-88.
- Theologis, A. and Laties, G.G. (1980) Membrane lipid breakdown in relation to the wound-induced and cyanide-resistant respiration in tissue slices. *Plant Physiol.*, **66**, 890-896.
- Tiwari, B.S., Belenghi, B. and Levine, A. (2002) Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol.*, **128**, 1271-1281.
- Trono, D., Flagella, Z., Laus, M.N., Fonzo, N.Di. and Pastore, D. (2004) The uncoupling protein and the potassium channel are activated by hyperosmotic stress in mitochondria from durum wheat seedlings. *Plant, Cell Environment*, 1-12.
- Umbach, A.L. and Siedow, J.N. (1993) Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol.*, **103**, 845-854.
- Van Der Straeten, D., Chaerle, L., Sharkov, G., Lambers, H. and Van Montagu, M. (1995) Salicylic acid enhances the activity of the alternative pathway of respiration in tobacco leaves and induces thermogenicity. *Planta*, **196**, 412-419.
- Vanlerberghe, G.C., Yip, J.Y.H. and Parsons, H.L. (1999) 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.*, **121**, 793-803.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L. (1992) Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol.*, **100**, 115-119.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L. (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 703-734.
- Vanlerberghe, G.C., Robson, C.A. and Yip, J.Y.H. (2002) Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. *Plant Physiol.*, **129**, 1829-1842.
- Vercesi, A.E. (2001) The discovery of an uncoupling mitochondrial protein in plants. *Biosci. Rep.*, **21**, 195-200.
- Vercesi, A.E., Martins, I.S., Silva, M.A.P., Leite, H.M.F., Cuccovia, I.M. and Chaimovich, H. (1995) PUMPing plants. *Nature*, **375**, 24.
- Vianello, A., Macri, F., Braidot, E. and Mokhova, E.N. (1995) Effect of cyclosporin A on energy coupling in pea stem mitochondria. *FEBS Lett.*, **371**, 258-260.
- Vianello, F., Petrusa, E. and Macri, F. (1994) Carboxyatractyloside restores the palmitate-induced uncoupling in sunflower mitochondria. *Biol. Plant.*, **36**, 183.
- Virolainen, E., Blokhina, O. and Fagerstedt, K. (2002) Ca²⁺-induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress. *Ann. Bot.*, **90**, 509-616.
- Voinikov, V., Grabelnych, O., Pobezhimova, T., Korzun, A., Sumina, O., Tourchaninova, V. and Kolesnichenko, A. (2001) Plant stress uncoupling protein CSP 310 caused thermogenesis in winter wheat mitochondria *in vitro*. *J. Plant Physiol.*, **158**, 807-810.
- Voinikov, V., Pobezhimova, T., Kolesnichenko, A., Varakina, N. and Borovskii, G. (1998) Stress protein 310 kD affects the energetic activity of plant mitochondria under hypothermia. *J. Therm. Biol.*, **23**, 1-4.
- Vojnikov, V., Korzun, A., Pobezhimova, T. and Varakina, N. (1984) Effect of cold shock on the mitochondrial activity and on the temperature of winter wheat seedlings. *Biochem. Pflanzen.*, **179**, 327-330.
- Vojnikov, V.K., Luzova, G.B. and Korzun, A.M. (1983) The composition of free fatty acids and mitochondrial activity in seedlings of winter cereals under cold shock. *Planta*, **158**, 194-198.
- Wagner, A.M. and Krab, K. (1995) The alternative respiration pathway in plants: Role and regulation. *Physiol. Plantarum*, **95**, 318-325.
- Watanabe, A., Nakazono, M., Tsutsumi, N. and Hirai, A. (1999) AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **40**, 1160-1166.
- Whelan, J., Millar, A.H. and Day, D.A. (1996) The alternative oxidase is encoded in a multigene family in soybean. *Planta*, **198**, 197-201.
- Wieckowski, M.R. and Wojtczak, L. (1998) Fatty acid - induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett.* **423**, 339-342.
- Winning, B.M., Day, C.D., Sarah, C.J. and Leaver, C.D. (1991) Nucleotide sequence of two cDNAs encoding the adenine nucleotide translocator from *Zea mays* L. *Plant. Mol. Biol.*, **17**, 305-307.
- Yao, N., Tada, Y., Sakamoto, M., Nakayashiki, H., Park, P., Tosa Y. and Mayama, S. (2002) Mitochondrial oxidative burst involved in apoptotic response in oats. *Plant J.*, **30**, 567-579.
- Zalman, L.S., Nikaido, H. and Kagawa, Y. (1980) Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels. *J. Biol. Chem.*, **255**, 1771-1774.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S., Masse, B. and Kroemer, G. (1996) Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett.*, **384**, 53-57.
- Zoratti, M. and Szabo, I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 139-176.
- Zottini, M., Mandolino, G. and Zannoni, D. (1993) Oxidation of external NAD(P)H by mitochondria from taproots and tissue cultures of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant Physiol.*, **102**, 579-585.
- Zykova, V.V., Kolesnichenko, A.V., Grabelnych, O.I., Tourchaninova, V.V. and Voinikov, V.K. (2001) The influence of cold stress on the peroxidation of lipids in the respiratory chain in the mitochondria of different winter wheats. *Annual Wheat Newslett.*, **47**, 164-165.