

ORIGINAL ARTICLE



The Influence of Hydrogen Peroxide on the Content of Prohibitines Phb3 and Phb4 in the Leaves of *Arabidopsis thaliana*

Korotaeva N.E.*, Borovskii G.B.

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 664033, Irkutsk, Russia

*E-Mail: knev73@yandex.ru

Received August 28, 2019

According to modern ideas, plant mitochondria regulate the expression of nuclear genes and act as signaling organelles providing the tolerance of plants to external stressors. Highly conservative membrane proteins prohibitines (Phb) responsible for membrane-peptide interactions in organelles of animals, plants and microorganisms accumulate in mitochondria and modulate the state of their membranes, participating in the regulation of mitochondrial-mediated signaling. The tuning of the content of the Phb is poorly investigated for today day. Most of biotic and abiotic stresses are associated with production of reactive oxygen species (ROS) which can play as signaling role as well as cause damage. Hydrogen peroxide is one of the forms of ROS. The goal of this research was to study the effect of different doses of hydrogen peroxide on the Phb3 and Phb4 content in *Arabidopsis* plants. In the leaves of *Arabidopsis thaliana* heat shock (HS, 42°C, 3 h) caused the increasing of the content of Phb after 24 h from the stop of the influence and the increasing of superoxide radical content immediately after HS. So the increasing of the content of Phb and ROS as a result of HS occurs simultaneously. Next we investigated the influence of oxidative stress on Phb content. It was shown at first that H₂O₂ decreases the content of Phb in dose-depend manner at the starting hours of the action (2 to 40 mM H₂O₂ during 1 to 2 h were used). At the continuation of the influence till 24 h the content of Phb returns to the control value. Herewith the suppressing effect is demonstrated by non-stress doses of H₂O₂ (2 to 10 mM). The stress dose of H₂O₂ (40 mM at 24 h) doesn't effect on the content of Phb, but causes the increasing of the content of Hsp 17.7 and wilting of the leaves which indicates the stressed condition of the plants. The results received speak in favor that at the protein level the increasing of Phb3 and Phb4 content is not activated by ROS-mediated system even during the development of the oxidative stress.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, heat shock, hydrogen peroxide, oxidative stress, prohibitines

Прохибитины (Phb) - небольшие (Mr около 30 кД) высококонсервативные структурные и фолдинг-белки, относящиеся к семейству мембранных белков "band-7" (Gehl and Sweetlove 2014) и обнаруженные на сегодняшний день в клетках всех изученных эукариот (Artal-Sanz and Tavernarakis 2009, Van Aken *et al.*, 2010). В клетках растений, животных и микроорганизмов Phb локализованы, в первую очередь, во внутренней митохондриальной мембране, и в составе мембраны клеточного ядра (Artal-Sanz and Tavernarakis 2009, Gehl and Sweetlove 2014). О Phb растений к настоящему времени пока накоплено немного информации. Помимо митохондрий, Phb растений также обнаружены в составе вакуолярной мембраны (Carter *et al.*, 2004) и в плазмалемме (Marmagne *et al.*, 2004). В мультимерный белковый комплекс Phb растений, помимо Phb1 и Phb2, включены белки Phb3, Phb4 и Phb6 (Van Aken *et al.*, 2010). Для растений, в отличие от животных, показано участие Phb в процессах роста (Artal-Sanz and Tavernarakis 2009) и в специфической для растений реакции сверхчувствительности (Nadimpalli *et al.*, 2000).

Активная экспрессия генов Phb растений происходит в интенсивно растущих тканях под действием ауксина (Van Aken *et al.*, 2010; Van Aken *et al.*, 2007). На этом этапе роль Phb, скорее всего, тесно связана с накоплением митохондрий в пролиферирующих молодых клетках и сводится к формированию структуры внутренней митохондриальной мембраны; таким образом, в период активного роста Phb участвуют в обеспечении клеток энергетическими молекулами для дальнейшего развития растения. Как негативные регуляторы активности mAAA-протеазы, Phb растений, вероятно, участвуют в контроле качества белков в матриксе митохондрий по типу механизма действия Phb животных (Piechota *et al.*, 2010; Artal-Sanz and Tavernarakis 2009). Phb накапливаются в митохондриях трансгенных растений табака с недостатком альтернативной оксидазы, что говорит в пользу их участия в защите от окислительного стресса (Sieger *et al.*, 2005) и в регуляции реакции сверхчувствительности и/или апоптоза (Takahashi *et*

al., 2003).

На экспрессию генов Phb оказывает влияние как изменение содержания альтернативной оксидазы (Van Aken *et al.*, 2010), так и прямое стрессовое воздействие, например, высокая освещенность (Vandenabeele *et al.*, 2003), температура (Ahn *et al.*, 2006) или УФ (AtGenExpress Visualization Tool). Таким образом, Phb являются частью программ регуляции протеома растительных митохондрий как в нормальных, так и в стрессовых условиях, в том числе, в условиях окислительного стресса. Поскольку в настоящее время принято, что митохондрии играют важную роль в формировании устойчивости, с одной стороны, и в осуществлении программируемой гибели в условиях стресса, с другой, изменение содержания Phb, в частности белков Phb3 и Phb4, может модулировать состояние мембран митохондрий и быть одним из факторов развития стрессового ответа (Van Aken *et al.*, 2010). Таким образом, Phb могут участвовать в системе митохондриально-ядерной (ретроградной) регуляции в ответ на стрессовые условия (Pucciariello *et al.*, 2012).

Активные формы кислорода (АФК) выполняют функцию универсальных сигнальных молекул в живой клетке, поскольку служат модуляторами и передатчиками сигналов мобилизации восстановительных программ, а также являются маркерами стрессового воздействия (Mittler *et al.*, 2011). В стрессовых условиях основными источниками АФК в клетке являются ЭТЦ митохондрий и хлоропластов, пероксисомы и мембранная NADPH оксидаза (Pucciariello *et al.*, 2012). H₂O₂ является одной из форм АФК, в нестрессовых условиях он регулирует многие физиологические процессы: старение (Gill and Tuteja 2010), фотосинтез и фотодыхание (Peng *et al.*, 2005), движение устьиц (Bright *et al.*, 2006), клеточный цикл (Mittler *et al.*, 2004), рост и развитие (Foreman *et al.*, 2003). H₂O₂ имеет среднюю активность и более длительный срок жизни по сравнению с остальными формами АФК (Bhattacharjee 2005). Благодаря продолжительному периоду жизни и высокой способности проникать через мембраны, H₂O₂ играет

роль вторичного мессенджера в развитии и передаче внутриклеточных сигналов с помощью АФК (Quan *et al.*, 2008). В период окислительного стресса H_2O_2 в низких концентрациях участвует в сигналинге, активирующем программы устойчивости и адаптации к биотическим и абиотическим воздействиям (Quan *et al.*, 2008). Так, предобработка небольшой концентрацией H_2O_2 вызывает активацию генов антиоксидантных белков, снижает количество окисленного глутатиона и предотвращает стресс-индуцированное окисление белков (Gill and Tuteja 2010). Накопление в растительных клетках большого количества H_2O_2 приводит к развитию окислительного стресса (Gill and Tuteja 2010). В высоких дозах H_2O_2 способствует развитию ПКС (Quan *et al.*, 2008).

Накопление Phb в митохондриях также может активироваться при развитии внутриклеточного окисления (Sieger *et al.*, 2005). Однако может ли рост содержания прохибитинов напрямую активироваться с помощью АФК, т.е. тем же путем, что и накопление других стресс-индуцированных факторов защиты и адаптации, остается неизвестным. Целью данной работы стало выявление влияния H_2O_2 на накопление Phb в листьях *Arabidopsis thaliana*.

MATERIALS AND METHODS

В работе использовали 25-суточные растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (экотип Columbia), выращенные на грунте в климатической камере MKT-240 ("Binder", Германия; 22–24°C, 16/8 ч день/ночь, влажность воздуха 50%, освещенность 9 клк). Температурную обработку проводили у несрезанных растений в термостате MIR-154 ("Sanyo", Япония) при температурах 35 и 45°C в течение 3 ч, после чего надземную часть срезали, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в криостате при -80°C. Пробы использовали для выделения общего белка. Часть растений по окончании термической обработки выдерживали 24 ч в климатической камере в условиях выращивания, после чего замораживали.

Для определения содержания супероксидного аниона использовали метод окрашивания образовавшегося в присутствии супероксидного

аниона формазана с помощью NBT (AppliChem, Германия) (Meuer *et al.*, 2009). Экстракцию формазана проводили в листьях растений арабидопсиса по методу Myouga *et al.* (2008). Содержание формазана определяли колориметрически (SmartSpec Plus, BioRad) при 700 нм. Получившееся значение оптической плотности относили к сырому весу пробы (Myouga *et al.*, 2008).

Для создания окислительного стресса надземную часть растений срезали, помещали в чашки Петри на растворы в объеме 50 мл, содержащие H_2O_2 (ЗАО "Реактив", Россия) в концентрациях 2, 4, 10 или 40 мМ, либо бидистиллированную воду, и оставляли при комнатной температуре (22–24°C) под бумажным колпаком на 1 ч, 2 ч или 24 ч. Затем растения промывали бидистиллированной водой, немедленно замораживали в жидком азоте, помещали для хранения в криостат при -80°C, после чего использовали для выделения общего белка.

Общий белок экстрагировали из 0.5 г листьев. Листья замораживали в жидком азоте и растирали с кварцевым песком в 2.5 мл буфера, содержащего 100 мМ Трис-НСl (рН 7.4–7.6), 0.1% ДДС-Na, 12 мМ β-меркаптоэтанола, 0.5–1 мМ фенолметилсульфонилфлюорида и нерастворимый поливинилпирролидон (10% от веса пробы). После центрифугирования (18 000 г, 10 мин) белок из полученного супернатанта осаждали пятикратным объемом охлажденного до -20 °С ацетона (8500 г, 10 мин). Осадок общего клеточного белка растворяли в буфере для образца (0.125 М Трис-НСl (рН 6.8), 10% ДДС-Na, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ ЭДТА, 20% глицерин) с последующим нагреванием при 97°C в течение 3 мин на водяной бане и центрифугированием при 12000 г в течение 10 мин. Содержание белка в полученных белковых пробах определяли с помощью реактива Брэдфорда (BioRad). Определение содержания Phb, Hsp 101 и Hsp 17.7 проводили денситометрически после электрофоретического фракционирования и Western Blot в системе Mini-Protean III ("BioRad", США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. На гель наносили по 10 мкг белка. Количество наносимого белка нормализовали по окрашиванию геля Кумасси. Для детекции использовали первичные антитела

против Hsp101 (AS07 253, "Agriseria", Швеция), Hsp17.7 (AS07 255, "Agriseria", Швеция) и прохибитинов PHB3 и PHB4 (антитела любезно предоставлены док. Hillel Fromm, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel (Van Aken et al., 2007, Snedden and Fromm 1997)). Интенсивность окрашивания пятна, соответствующего анализируемому белку, определяли с помощью программы Gel Analysis (Россия) в условных единицах и выражали для каждого белка как долю от интенсивности окрашивания в контроле, которую принимали равной 1. В качестве контроля использовали белок из несрезанных растений, растущих в контрольных условиях. Каждый опыт проводился не менее чем в 3 биологических повторностях. Статистическую обработку проводили в программе Sigma plot.

RESULTS AND DISCUSSION

Действие ТШ вызывало небольшое увеличение содержания Phb сразу после воздействия и более отчетливый рост их содержания через сутки после него (рис. 1А, Б). Дозозависимое накопление Hsp 101, которое происходило через 3 ч и через сутки после ТШ (рис. 1А), говорило об активации защитных программ, реализующихся посредством АФК (Pucciariello et al., 2012). Сразу после воздействия в листьях арабидопсиса происходил достоверный дозозависимый рост содержания супероксидного аниона (рис. 1В), что соответствует современным представлениям о развитии стрессовой реакции (Pucciariello et al., 2012). Таким образом, рост содержания Phb и супероксидного аниона происходят одновременно в ответ на обработку ТШ. Однако, по сравнению с накоплением Hsp101, накопление Phb происходит гораздо медленнее.

Для обработки H_2O_2 были выбраны такие значения его концентрации, в которой он накапливается в клетке в стрессовых условиях при развитии окислительного стресса: 2-40 мМ (Rao et al., 2000, Kotchoni et al., 2006, Sweetlove et al., 2002). 24-часовое воздействие H_2O_2 в концентрации 40 мМ приводило к съезживанию и завяданию мелких молодых листьев, что может указывать на создание стрессовых условий при обработке этой

концентрацией (рис. 2А). Эта же концентрация вызывала накопление стрессового белка Hsp 17.7, хотя оно было не очень значительным по сравнению с накоплением после теплового воздействия (рис. 2Б). Накопление стрессового белка также говорит в пользу развития стрессового состояния и является результатом активации сигнальных систем, задействованных в развитии стрессового ответа. Более низкие концентрации H_2O_2 и более короткое инкубирование не вызывали накопления Hsp 17.7. Сходным образом, на листьях арабидопсиса было показано, что 2-х часовое инкубирование с 10 мМ H_2O_2 может увеличить акклиматизацию PSII к избыточному свету, т.е. оказать закаливающее действие, тогда как инкубирование с 1 мМ H_2O_2 и ниже не приводит к такому эффекту (Hou et al., 2018); концентрации H_2O_2 до 5 мМ не приводили к снижению жизнеспособности клеток суспензионной культуры табака (Houot et al., 2001) и арабидопсиса (Desican et al., 1998) даже после суток инкубирования, тогда как концентрация 88 мМ в течение 16 ч в результате развития окислительного стресса приводила к подавлению скорости роста и появлению продуктов ПОЛ (Sweetlove et al., 2002). Таким образом, концентрации H_2O_2 2-10 мМ по силе воздействия можно считать "фоновыми", не приводящими к стрессированию, тогда как длительное инкубирование (24 ч) с 40 мМ H_2O_2 приводит к неблагоприятным последствиям, симптомами которых может быть накопление стрессового белка и завядание самых молодых листьев.

Наибольшее влияние на содержание Phb оказывали дозы H_2O_2 10 и 40 мМ (рис. 2В, Г, Д). Наиболее яркий дозозависимый эффект наблюдался в первый час после начала воздействия (рис. 2Д). Использование 40 мМ H_2O_2 в первый час инкубации приводило к отчетливому снижению содержания Phb (рис. 2Г). Через 24 ч содержание Phb восстанавливалось и почти достигало контрольных значений. Таким образом, результаты говорят в пользу того, что H_2O_2 в исследованных дозах не стимулирует рост содержания Phb. H_2O_2 оказал подавляющее действие на содержание Phb уже через 1 ч, при этом не произошло накопления

стрессового белка Hsp 17.7 и не было выявлено видимых изменений во внешнем виде растений. Перечисленные факты говорят в пользу того, что в “фоновых” дозах H₂O₂ снижает содержание Phb. В “стрессовых” дозах роста содержания Phb также не происходит. Таким образом, рост содержания Phb через сутки после действия ТШ (рис. 1) скорее может быть обусловлен функционированием сигнальных

систем, не связанных с АФК. В пользу большей роли таких систем сигналинга говорит слабая активация, либо отсутствие активации экспрессии генов Phb в ответ на многие стрессы, сопряженные с окислением (например, холодной и раневой) (AtGenExpress Visualization Tool).

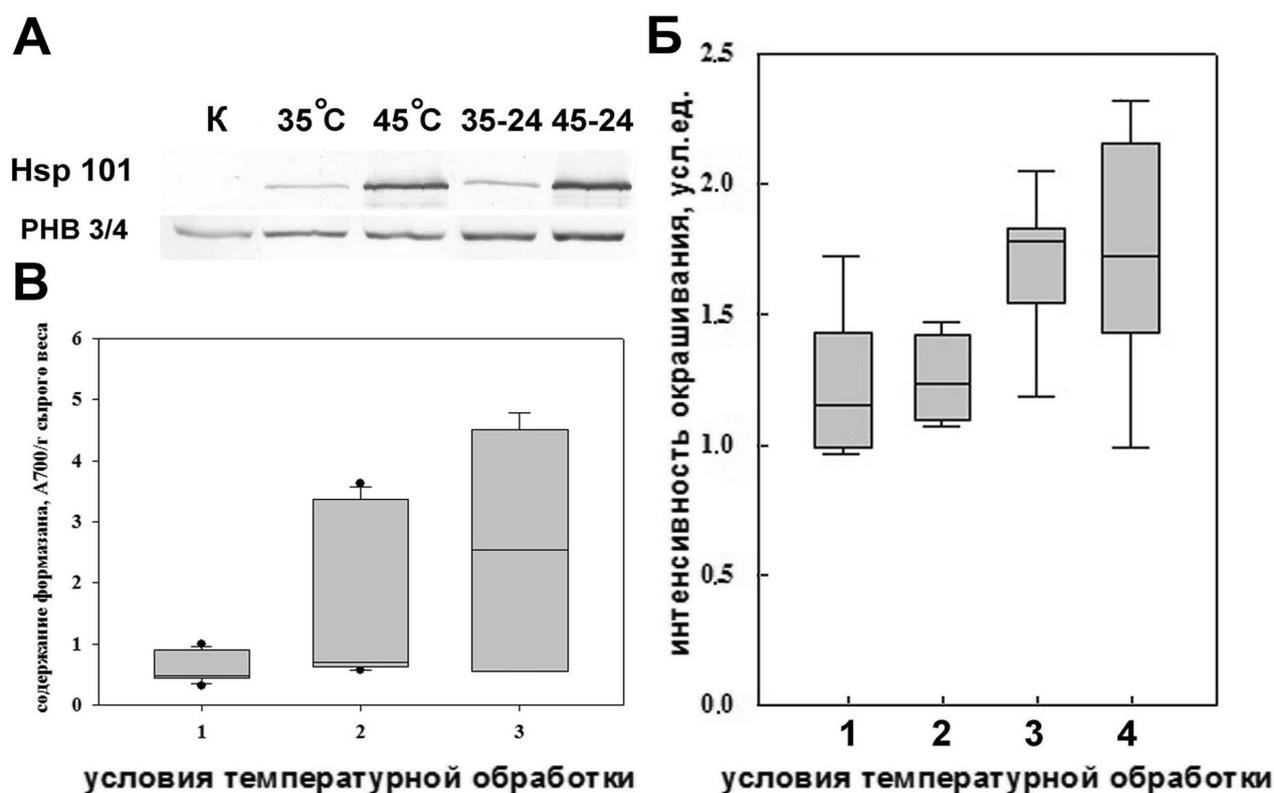


Figure 1. Влияние ТШ на содержание Phb и супероксидного аниона в листьях арабидопсиса. А - результат Western Blot с антителами против Phb (Phb3 и Phb4) и Hsp 101. Сверху указаны условия температурной обработки. 35 и 45°C – обработка в течение 3 ч; 35-24 и 45-24 - 3-часовая обработка при 35 и 45°C и 24-часовой “отдых” в условиях выращивания; к – растения без обработки. Представлена типичная мембрана. Б – денситометрическая оценка содержания Phb. 1 – 35°C, 3 ч; 2 - 45°C, 3 ч; 3, 4 - 3-часовая обработка при 35°C (3) или 45°C (4) и 24-часовой “отдых” в условиях выращивания. Интенсивность окрашивания для каждого образца пересчитывали в условных единицах относительно принятого за 1 контрольного образца. Ме [25%; 75%], бары показывают минимальное и максимальное значения. n=4–9. Приведен результат анализа не менее чем четырех биологических повторностей. В – результат измерения количества образовавшегося формазана в листьях арабидопсиса. 1 – контроль (22-24°C); 2 – ТШ (35°C, 3 ч); 3 – ТШ (45°C, 3 ч). Ме [25%; 75%], бары показывают минимальное и максимальное значения. Приведен результат анализа трех биологических повторностей.* - значения достоверно отличаются от контроля (критерий Манна-Уитни, p<0.05; n=6-10).

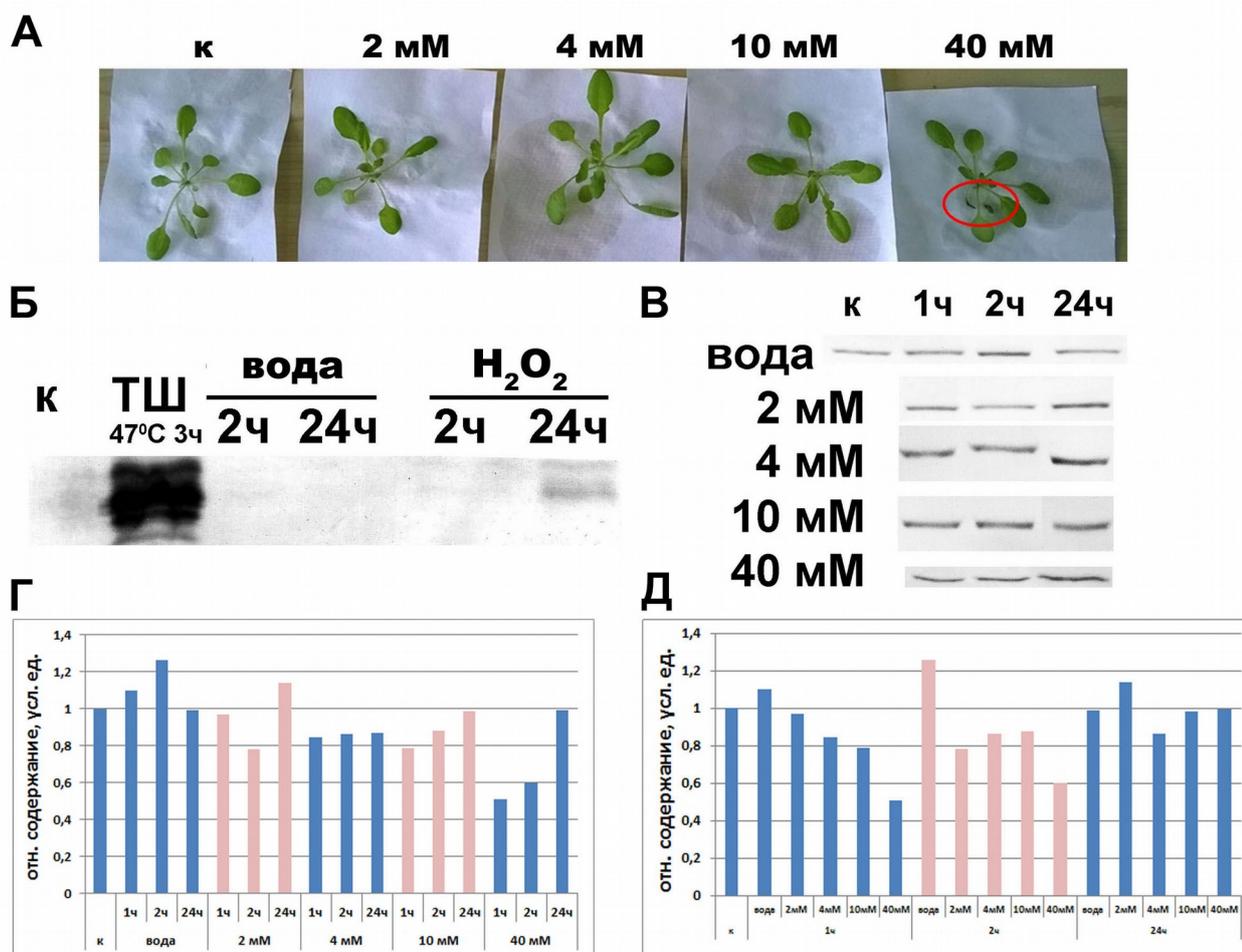


Figure 2. Влияние H₂O₂ на растения арабидопсиса. А - влияние H₂O₂ на внешний вид растений арабидопсиса. Сверху указаны использованные концентрации H₂O₂. к – инкубирование с бидистиллированной водой. Продолжительность ингибирования – 24 ч. Завядшие листья обведены маркером. Б - влияние 40 мМ H₂O₂ на содержание Phb 17.7 в листьях арабидопсиса. к – растения арабидопсиса того же возраста, произрастающие на грунте. ТШ – для термической обработки использовались растения, произрастающие на грунте. В, Г, Д - влияние H₂O₂ на содержание Phb в листьях арабиопсиса. В – вестерн блот (типичная мембрана), сверху указана продолжительность обработок; Г, Д – диаграммы по результатам денситометрического подсчета содержания Phb после вестерн блот. Г – данные сгруппированы относительно концентрации H₂O₂; Д – данные сгруппированы относительно продолжительности воздействия. Приведены средние арифметические ($n=3$). Данные представлены в условных единицах и вычислены относительно контроля, принятого за 1. к – растения того же возраста, произрастающие на грунте.

Ранее было показано, что уровень мРНК Phb2 в листьях табака повышался через 6 ч после нагревания при 55°C, которое приводило к развитию ПКС в растениях (Ahn *et al.*, 1999). Причем развитие ПКС происходило через 12 ч после воздействия (Balk *et al.*, 1999). К сожалению, в данном исследовании мы не оценивали дальнейшую

жизнеспособность растений после обработки ТШ и через сутки после нее (рис. 1). Возможно, рост содержания Phb через 24 ч после ТШ может быть обусловлен развитием ПКС. В таком случае использованные нами “фоновая” и “стрессовая” дозы H₂O₂ не активируют рост содержания Phb, поскольку также не приводят к развитию ПКС. Дальнейшее

исследование выживаемости растений после воздействия H₂O₂ и ТШ могло бы дать ответ на этот вопрос.

В целом, в первые часы обработки пероксид водорода в исследованных концентрациях дозозависимо подавляет содержание Phb3 и Phb4. Таким образом, маловероятно, что в данных дозах он может быть сигнальной молекулой, вызывающей накопление Phb в условиях ТШ.

ACKNOWLEDGEMENT

Авторы выражают благодарность д-ру Н. Fromm за предоставленные первичные антитела против Phb. В работе использовалось оборудование ЦКП СИФИБР СО РАН «Биоаналитика» и «Фитотрон».

REFERENCES

- Ahn C.S., Lee J.H., Reum Hwang A., Kim W.T., Pai H.S. (2006) Prohibitin is involved in mitochondrial biogenesis in plants. *Plant J.*, **46**, 658-667.
- Artal-Sanz M., Tavernarakis N. (2009) Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends Endocrinol. Metab.*, **20**, 394-401.
- AtGenExpress Visualization Tool (AVT), <http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>
- Balk J., Leaver C.J., 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.
- Bhattacharjee S. (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant. *Curr. Sci.*, **89**, 1113-1121.
- Bright J., Desikan R., Hancock J.T., Weir I.S., Neill S.J. (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant J.*, **45**, 113-122.
- Carter C., Pan S., Zouhar J., Avila E.L., Girke T., Raikhel N.V. (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell.*, **16**, 3285-3303.
- Desikan R., Reynolds A., Hancock J.T., Neill S.J. (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem. J.*, **330**, 115-120.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D., Davies J.M., Dolan L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, **422**, 442-446.
- Gehl B., Sweetlove L.J. (2014) Mitochondrial Band-7 family proteins: scaffolds for respiratory chain assembly? *Front. Plant Sci.*, **5**, 141-147.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.*, **48**, 909-30.
- Hou Q.Z., Wang Y.P., Liang J.Y., Jia L.Y., Feng H.Q., Wen J., Ehmet N., Bai J.Y. (2018) H₂O₂-induced acclimation of photosystem II to excess light is mediated by alternative respiratory pathway and salicylic acid. *Photosynthetica*, **56**, 1154-1160.
- Huot V., Etienne P., Petitot A.-S., Barbier S., Blein J.-P. (2001) Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells in a dose-dependent manner. *J. Exp. Bot.*, **52**, 1721-1730.
- Kotchoni S.O., Kuhns C., Ditzer A., Kirch H.-H., Bartels D. (2006) Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant, Cell and Environ.*, **29**, 1033-1048.
- Marmagne A., Rouet M.A., Ferro M., Rolland N., Alcon C., Joyard J., Garin J., Barbier-Brygoo H., Ephritikhine G. (2004) Identification of new intrinsic proteins in *Arabidopsis* plasma membrane proteome. *Mol. Cell Proteomics*, **3**, 675-691.
- Meyer E.H., Tomaz T., Carroll A.J., Estavillo G., Delannoy E., Tanz S.K., Small I.D., Pogson B.J., Millar A.H. (2009) Remodeled respiration in *ndufs4* with low phosphorylation efficiency suppresses *Arabidopsis* germination and growth and alters control of metabolism at night. *Plant Physiol.*, **151**,

- 603-619.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*, **9**, 490-498.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.*, **16**, 300-309.
- Myouga F., Hosoda C., Umezawa T., Iizumi H., Kuromori T., Motohashi R., Shono Y., Nagata N., Ikeuchi M., Shinozaki K. (2008) A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**, 3148-3162.
- Nadimpalli R., Yalpani N., Johal G.S., Simmons C.R. (2000) Prohibitins, stomatins, and plant disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation, ion channel regulation, and death. *J. Biol. Chem.*, **275**, 29579-29586.
- Peng C.L., Ou Z.Y., Liu N., Lin G.Z. (2005) Response to high temperature in flag leaves of super high-yielding rice Pei'ai 64S/E32 and Liangyoupeijiu. *Rice Sci.* **12**, 179-186.
- Piechota J., Kolodziejczak M., Juszczak I., Sakamoto W., Janska H. (2010) Identification and characterization of high molecular weight complexes formed by matrix AAA proteases and prohibitins in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **285**, 12512-12521.
- Pucciariello C., Banti V., Perata P. (2012) ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses. *Plant Physiol. and Biochem.*, **59**, 3-10.
- Rao M.V., Lee H., Creelman R.A., Mullet J.E., Davis K.R. (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell*, **12**, 1633-1646.
- Quan L.-J., Zhang B., Shi W.-W., Li H.-Y. (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network, *J. Integrat. Plant Biol.*, **50**, 2-18.
- Sieger S.M., Kristensen B.K., Robson C.A., Amirsadeghi S., Eng E.W., Abdel-Mesih A., Møller I.M., 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.*, **56**, 1499-1515.
- Snedden W.A., Fromm H. (1997) Characterization of the plant homologue of prohibitin, a gene associated with antiproliferative activity in mammalian cells. *Plant Mol. Biol.*, **33**, 753-756.
- Sweetlove L.J., Heazlewood J.L., Herald V., Holtzapffel R., Day D.A., Leaver C.J., Milla A.H. (2002) The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *The Plant J.*, **32**, 891-904.
- Takahashi A., Kawasaki T., Wong H.L., Suharsono U., Hirano H., Shimamoto K. (2003) Hyperphosphorylation of a mitochondrial protein, prohibitin, is induced by calyculin A in a rice lesion-mimic mutant *cdr1*. *Plant Physiol.*, **132**, 1861-1869.
- Van Aken O., Pecenková T., van de Cotte B., De Rycke R., Eeckhout D., Fromm H., De Jaeger G., Witters E., Beemster G.T., Inzé D., Van Breusegem F. (2007) Mitochondrial type-I prohibitins of *Arabidopsis thaliana* are required for supporting proficient meristem development. *Plant J.*, **52**, 850-864.
- Van Aken O., Whelan J., Van Breusegem F. (2010) Prohibitins: mitochondrial partners in development and stress response. *Trends Plant Sci.*, **15**, 275-282.
- Vandenabeele S. Van Der Kelen K., Dat J., Gadjev I., Boonefaes T., Morsa S., Rottiers P., Slooten L., Van Montagu M., Zabeau M., Inzé D., Van Breusegem F. (2003) A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 16113-16118.