

Bożena Szal✉

Anna M. Rychter

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

✉ Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: (22) 554 30 05, e-mail: szal@biol.uw.edu.pl

Artykuł otrzymano 15 maja 2016 r.
Artykuł zaakceptowano 19 maja 2016 r.

Wykaz skrótów: AOX – oksydaza alternatywna, COX – oksydaza cytochromowa; NDex – zewnętrzne mitochondrialne dehydrogenazy NAD(P)H typu II; NDin – wewnętrzne mitochondrialne dehydrogenazy NAD(P)H typu II; mtROS – mitochondrialne reaktywne formy tlenu; mtETC – mitochondrialny łańcuch transportu elektronów; ROS – reaktywne formy tlenu

Słowa kluczowe: oksydaza alternatywna, oddychanie niewrażliwe na cyjanek, roślinny mitochondrialny łańcuch oddechowy, szlaki alternatywne w oddychaniu

STRESZCZENIE

Badania nad oddychaniem niewrażliwym na cyjanek doprowadziły do wykrycia w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym drugiej oksydazy terminalnej, oksydazy alternatywnej (AOX). AOX przekazuje elektrony ze zredukowanego ubichinonu na tlen z pominięciem dwóch miejsc sprzężenia obniżając wydajność energetyczną oddychania. AOX występuje w wszystkich roślin i jest obecna m.in. u niektórych grzybów, mięczaków i protista. Jedynie u roślin termogennych aktywność AOX związana jest z wydzielaniem ciepła. Natomiast u pozostałych organizmów funkcjonowanie AOX wiąże się z utrzymaniem homeostazy metabolicznej (metabolizm węgla, stan redoks komórek oraz zapotrzebowanie na energię) i utrzymaniem homeostazy reaktywnych form tlenu (ROS). W artykule omówiono budowę białka roślinnej AOX oraz regulację na różnych poziomach molekularnych. Podkreślono rolę AOX jako markera stresu u roślin. Opisano również potencjalne zastosowanie AOX w terapii genowej ludzi.

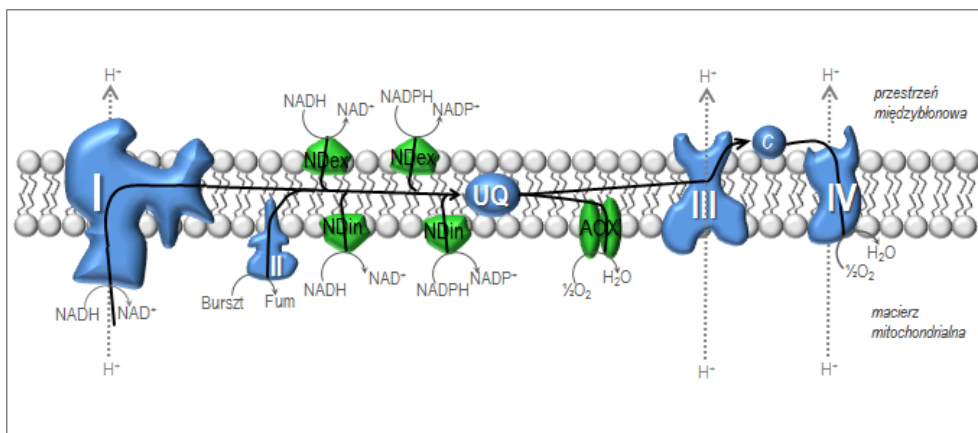
WPROWADZENIE

Badania nad oddychaniem, które nie jest hamowane przez cyjanek i odpowiedzialną za nie, zlokalizowaną w łańcuchu oddechowym oksydazą alternatywną mają długą historię i stale niezakończoną. Oddychanie niewrażliwe na cyjanek zaobserwowano na początku XX w. u roślin generujących ciepło (rośliny termogenne) i początkowo traktowano to jako ciekawostkę fizjologiczną [1]. Okazało się jednak, że odporność oddychania na działanie cyjananku dotyczy w różnym stopniu wszystkich roślin. Od całkowitej odporności na cyjanek oddychania roślin termogennych, jak np. *Symplocarpus foetidus* [1], częściowe hamowane np. oddychanie korzeni fasoli [2,3], po prawie całkowite hamowanie np. oddychanie skrawków z bulw ziemniaka [4,5]. Warunki stresowe mogą powodować często wzrost oddychania odpornego na działanie cyjananku. Obserwowano np. że oddychanie korzeni fasoli w warunkach braku fosforu w środowisku staje się całkowicie niewrażliwe na cyjanek [3]. Zjawisko oddychania niewrażliwego na cyjanek dotyczy nie tylko roślin, ale również niektórych grzybów, zwierząt oraz protista [6].

Przez wiele lat przedmiotem debaty była zarówno lokalizacja jak i enzymy odpowiedzialne za pobieranie tlenu niewrażliwe na inhibitory oksydazy cytochromowej, cyjanek, azydek i tlenek węgla. Na początku lat 60' wykazano, że w roślinnym łańcuchu oddechowym istnieją dwie drogi przeniesienia elektronów na tlen rozgałęziające się na poziomie ubichinonu, droga cytochromowa związana z wytwarzaniem ATP i tzw. droga alternatywna, niewrażliwa na działanie cyjananku i innych inhibitorów oksydazy cytochromowej, omijająca dwa miejsca sprzężenia (Ryc. 1). Przenośniki wchodzące w skład drogi alternatywnej oraz regulacja przepływu elektronów i znaczenie fizjologiczne drogi alternatywnej obniżające wydajność energetyczną oddychania były przedmiotem licznych badań i dyskusji. Obszerne omówienie wcześniejszych prac zawarte jest m.in. w artykułach przeglądowych [7-9].

Początkowo sądzono, że w skład drogi alternatywnej wchodzi kilka przenośników, podejrzewano flawoproteiny lub żelazosulfoproteiny [7]. Wykazano jednak, że drogę alternatywną stanowi jeden enzym, oksydaza alternatywna hamowana przez kwasy hydroksamowe (SHAM i BHAR) oraz gallusan pypyłu i disulfam [10]. Inhibitory te stanowiły ważne narzędzie badań udziału AOX w oddychaniu chociaż niektóre (ze względu na specyficzność) mogły być stosowane wyłącznie do izolowanych mitochondriów.

AOX okazała się kompleksem małych białek [11-14]. Końcowym akceptorem elektronów przenoszonych z ubichinonu przez AOX jest tlen, a produktem jego redukcji jest H₂O. Utrudnieniem w badaniach AOX jest niestabilność wyizolowanego enzymu. Jednak częściowe tylko oczyszczenie AOX



Rycina 1. Roślinny łańcuch oddechowy. Na zielono zaznaczono alternatywne szlaki w roślinnym mtETC. I – kompleks I (oksydoreduktaza NADH:ubichinon); II – kompleks II (dehydrogenaza burszyniejska), III- kompleks III (oksydoreduktaza ubichinol:cytochrom c); IV – kompleks IV (oksydaza cytochromu c); Burszt – burszyniejska; c – cytochrom c; Fum – fumaran; NDin – wewnętrzne dehydrogenazy NAD(P)H typu II; NDex – wewnętrzne dehydrogenazy NAD(P)H typu II; UQ – ubichinon. Dla uproszczenia kompleksu II przedstawiono jako kompleksu transmembranowego.

z *Sauromatum guttatum* pozwoliło na otrzymanie mono- i poliklonalnych przeciwciał dla AOX [12,13]. Przeciwciała te zostały zastosowane jako sondy molekularne wykazując u wszystkich roślin krzyżową aktywność z jednocześnie obserwowaną aktywnością AOX. Był to niewątpliwie przełom i początek badań AOX z zastosowaniem technik biologii molekularnej.

STRUKTURA MOLEKULARNA I PRZESTRZENNA OKSYDAZY ALTERNATYWNEJ

AOX jest białkiem mitochondrialnym kodowanym przez genom jądrowy. Pierwszą sekwencję genu AOX uzyskano z *S. guttatum* [15]. Początkowo uważano, że AOX u roślin kodowana jest przez 1 gen jednak szybki rozwój metod biologii molekularnej [m. in. rozszerzenie baz danych cDNA, analizy PCR w wykorzystaniem zdegenerowanych starterów] pozwoliły już w połowie lat 90tych stwierdzić, że AOX kodowana jest wielogenowo. Obecnie wiadomo, że u dwuliściennych występują dwie rodziny genów AOX (AOX1 i AOX2) natomiast u jednoliściennych obecne są tylko izoformy AOX1 [16]. Przykładowo u kukurydzy i ryżu obecne są 3 geny AOX (AOX1a-c), natomiast genom rośliny modelowej, rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) zawiera 5 genów AOX (AOX1a-d oraz AOX2) [17]. Ciekawostką jest, że niektóre dwuliścienne wtórnie utraciły jedną z rodzin genów AOX; w genomie przedstawicieli Cucurbitaceae (np. u *Cucumis sativus*) stwierdzono występowanie tylko AOX2 [18] natomiast u przedstawicieli Salicaceae (np. u *Salix purpurea*) występowanie tylko genów z rodziny AOX1 [19]. Ponadto, w niektórych klasyfikacjach genetycznych gen AOX1d rzodkiewnika nie jest zaliczany do rodziny genów AOX1 ale przynależy do nowej rodziny AOX3 [20].

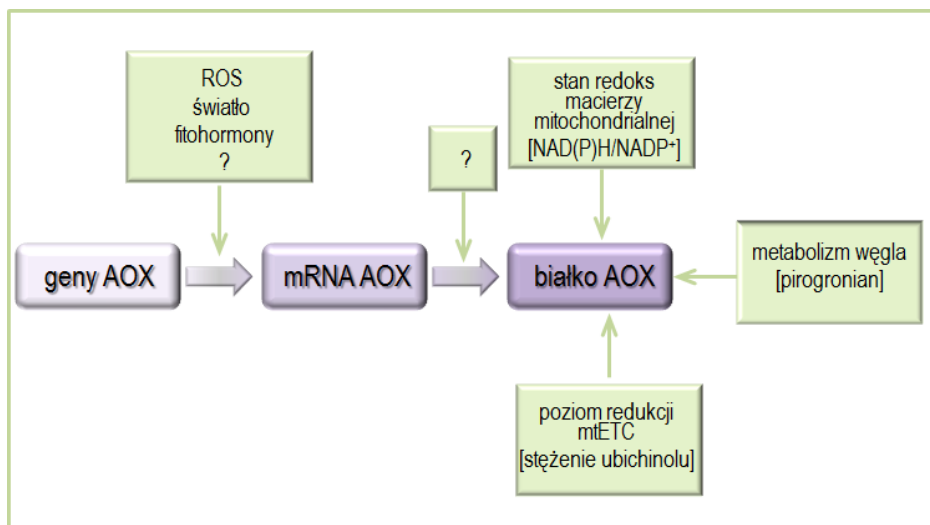
Badania nad strukturą molekularną białka trwały bardzo długo i spowodowane były dużymi trudnościami w jego oczyszczeniu (białko izolowano z bardzo małą wydajnością i było niestabilne w temperaturze pokojowej) [21]. Początkowo oszacowano masę molekularną AOX na ok. 27 kDa [22], w późniejszych badaniach w oparciu

o dane sekwencji cDNA skorygowana tę wartość na ok. 32 kDa [15]. Pierwsze doniesienia o tym, że w strukturze AOX występuje Fe^{2+} pochodziły z pracowni Minagawy [23]. W prostym doświadczeniu pokazano, że warunki stresowe indukują AOX u drożdży jedynie w obecności jonów żelaza. Wykorzystanie metod rezonansu paramagnetycznego potwierdziło, że również roślinna AOX posiada w swojej strukturze jony żelaza (Fe^{2+}/Fe^{3+}) [24,25]. Pierwszy model strukturalny białka AOX w oparciu o znaną sekwencję genu opracowano w pracowni Siedowa [26], proponując strukturę AOX podobną do monooksydazy metanu.

Późniejszy model (jak teraz już wiadomo dokładniej odzwierciedlający rzeczywistość strukturę białka AOX) pokazywał hipotetyczną strukturę przestrzenną AOX w oparciu o strukturę Δ^9 -desaturazy [27]. Obecnie wiadomo, że w strukturze AOX można wyróżnić szereg zachowanych w ewolucji reszt aminokwasowych niezbędnych do funkcjonowania centrum aktywnego białka [26], przyłączania substratu [28] lub też koniecznych do umiejscowienia AOX w warstwie lipidowej wewnętrznej błony mitochondrialnej [29]. Krokiem milowym było uzyskanie struktury krystalicznej AOX izolowanej z *T. brucei* potwierdzającej, że AOX jest homodimerem, a każdy z jej monomerów zawiera 6 długich i 4 krótkie α helisy [30]. Na tej podstawie wykonano model AOX z rzodkiewnika, w którym pokazano m.in., że w centrum aktywnym AOX są zachowane w ewolucji reszty glutaminianowe (Glu 183, 222, 273, 324) i histydynowe (His 225 i 327) zlokalizowane na 2 i 4 helisie białka [31]. Ponadto, reszty Arg164, Asp168, Arg178, Ala186, Leu 182, Glu 183, Glu275 i Ala276 najprawdopodobniej umożliwiają białku AOX umiejscowienie w wewnętrznym listku wewnętrznej błony mitochondrialnej. W strukturze roślinnej AOX niezwykle ważna jest również zachowana w ewolucji reszta cysteinowa (Cys127), która umożliwia tworzenie labilnych mostków dwusiarczkowych czyli charakterystycznej struktury homodimerycznej AOX [31].

FILOGENEZA OKSYDAZY ALTERNATYWNEJ

Oksydaza alternatywna jest metaloenzymem i należy do rodziny dwużelazowych białek karboksylowych zawierających w swej strukturze 4 charakterystyczne helisy tworzące kieszeń, w której umieszczone są atomy metalu [30]. Podobną do AOX strukturę mają inne białka z tej rodziny, np. ruberytryna czy Δ^9 desaturaza [32]. Enzymy te w przeszłości były najprawdopodobniej reduktazami tlenu, a ich funkcja była niezbędna prymitywnym organizmom w momencie pojawienia się tlenu w atmosferze [32]. Co ciekawe, AOX jest jednym z niewielu białek, których budowa i funkcja została najpierw poznana u roślin. Dopiero później wykazano obecność AOX u niektórych organizmów



Rycina 2. Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej (AOX) na różnych poziomach molekularnych.

nie-roślinnych [m. in. u mięczaków]. Przy czym podkreślić należy, że AOX występuje u wszystkich roślin wyższych natomiast u innych organizmów nawet gatunki dosyć blisko spokrewnione mogą różnić się obecnością AOX w genomie (*Trypanosoma brucei* posiada AOX w przeciwieństwie do *Leishmania* sp.) [6].

REGULACJA UDZIAŁU AOX W ODDYCHANIU

Brak fosforylacji na drodze alternatywnej powoduje, że aktywność AOX w znaczący sposób wpływa na wydajność energetyczną procesu oddychania. Dlatego udział szlaku alternatywnego w mtETC musi być bardzo ściśle regulowany. Obecnie wiadomo, że regulacja ta odbywa się na wielu poziomach. Zasadnicza, zgrubna regulacja odbywa się na poziomie zmian w ekspresji genu i syntezy białka. Jednak aktywność enzymatyczna AOX jest również hierarchicznie regulowana na poziomie potranslacyjnym (Ryc. 2).

REGULACJA AOX NA POZIOMIE TRANSKRYPCJI

Wzrost poziomu mRNA AOX, szczególnie transkryptów genów z rodziny AOX1 jest dobrze udokumentowaną odpowiedzią na niekorzystne warunki środowiska i zaburzenia w funkcjonowaniu mtETC [33,34]. Postuluje się, że ekspresja genu AOX2 zależy od stanu rozwojowego rośliny i nie zmienia się w odpowiedzi na czynniki stresowe [35]. Jednak wyniki uzyskane m. in. przez naszą grupę badawczą pokazują, że ekspresja genów z obu rodzin AOX może być zmieniona w odpowiedzi na warunki stresowe [36].

AOX jest białkiem mitochondrialnym kodowanym przez genom jądrowy dlatego ekspresja genów AOX (kolokwialnie mówiąc „zapotrzebowanie” na mRNA i w konsekwencji na białko) musi być regulowana przez metabolizm mitochondrialny. Od wielu lat postuluje się udział mitochondrialnych ROS (mtROS), w szczególności H_2O_2 pochodzącego z mitochondriów, jako przekaźników

w sygnalizacji *retrograde* (informacji przekazywanej z mitochondrium do jądra komórkowego) [33,37]. W badaniach naszej grupy pokazaliśmy, że mtROS produkowane w mtETC w kierunku przestrzeni międzybłonowej, gdzie obrona antyoksydacyjna jest stosunkowo niska, są najprawdopodobniej szczególnie zaangażowane w sygnalizację *retrograde* [38]. Innym czynnikiem zaangażowanym w przekazywanie sygnału z mitochondrium do jądra powodującym wzrost ekspresji AOX może być również poziom metabolitów pośrednich cyklu Krebsa [39].

Dzięki technikom molekularnym wykazano, że w indukcję ekspresji genu kodującego AOX zaangażowana jest zlokalizowana w jądrze komórkowym, zależna od cyklin kinaza E1 [40] oraz białko INCREASED SIZE EXCLUSIONS LIMIT 2 (ISE2) [41]. Ponadto w promotorach genów AOX znaleziono sekwencje regulatorowe, do których mogą przyłączać się czynniki transkrypcyjne: ABSISIC ACID INSENSITIVE 4 (ABI4) [42] oraz WRKY 15 [43]. Znalezienie w promotorze AOX miejsca przyłączenia ABI4 [42] jest elementem potwierdzającym wcześniejsze doniesienia o tym, że ekspresja genów AOX jest regulowana przez fitohormony, obserwowano wzrost ekspresji genu kodującego AOX m.in. w odpowiedzi na wzrost stężenia kwasu salicylowego [44,45].

Ekspresja genów oksydazy alternatywnej jest również regulowana przez światło. Zhang i wsp. [46] obserwowali wzrost ekspresji genów kodujących izoformy z rodziny AOX1 po traktowaniu rzodkiewnika światłem białym, czerwonym lub niebieskim co świadczy o tym, że w szlaku indukcji zaangażowane są najprawdopodobniej fitochromy, fototropiny i kryptochromy. U ryżu natomiast tylko izoforma AOX1a jest indukowana światłem [47].

Jak zauważono, ekspresja genów AOX jest często pozytywnie skorelowana z ekspresją genów mitochondrialnych dehydrogenaz NAD(P)H typu II (NDin i NDex) [48]. Wykazano pozytywną korelację ekspresji m.in. dla par genów AOX1a-NDB2, AOX1c-NDA1, AOX1c-NDB4, AOX1b-NDB3 i AOX1d-NDA1 [35,45,48,49]. Wydaje się, że koekspresja tych niefosforylujących fragmentów mtETC może ułatwiać rozproszenie nadmiaru siły redukcyjnej.

ZMIANY POZIOMU BIAŁKA AOX

U większości roślin zmiany w poziomie białka AOX korelują pozytywnie z poziomem transkryptów genów AOX. Udowodniono jednak, że poziom białek AOX może zmieniać się niezależnie od poziomu mRNA AOX. U jęczmienia (*Hordeum vulgare*) poddanego warunkom hipoksji poziom mRNA AOX był porównywalny z poziomem

stwierdzonym u roślin kontrolnych mimo, że poziom białka AOX był znacząco obniżony [50].

POTRANSLACYJNA REGULACJA AOX

Potranslacyjna regulacja AOX opisywana jest głównie w kontekście redukcji mostków dwusiarczkowych oraz aktywacji poprzez α -ketokwasy. AOX jest homodimerem: w formie aktywnej podjednostki AOX są połączone niekowalencyjnie (mostki siarczkowe są zredukowane) natomiast w formie nieaktywnej monomery są połączone kowalencyjnie (występuje wiązanie -S-S- między nimi) [34]. Za wiązanie kowalencyjne odpowiedzialne są reszty cysteinowe w tzw. miejscu Cys I zlokalizowanym na N-końcu białka eksponowanym w kierunku macierzy [51]. Redukcja mostków dwusiarczkowych możliwa jest kosztem NADPH wytwarzanego m.in. w cyklu kwasów trikarboksylowych w macierzy mitochondrialnej [34]. Udowodniono, że za redukcję wiązania -S-S- pomiędzy monomerami AOX odpowiedzialny jest system tioredoksyn zlokalizowany w mitochondriach [52]. Tylko zredukowana forma AOX może ulegać allosterycznej aktywacji przez α -ketokwasy, głównie pirogronian [53], ale również inne: hydroksypirogronian czy 2-oksoglutaran [54]. U niektórych roślin AOX może być aktywowana innymi kwasami organicznymi np. bursztynianem [55]. Dokładny mechanizm tej aktywacji nie jest poznany, ale przypuszcza się, że dochodzi do zmian konformacyjnych białka lub też, że pirogronian może zmieniać V_{\max} enzymu poprzez stabilizację aktywnej formy AOX [34]. Miejscem przyłączania α -ketokwasów jest region Cys I oraz region Cys II, przy czym rola Cys II w tym procesie nie została do końca zdefiniowana [34]. Zaktywowana forma AOX zwiększa swoje powinowactwo do substratu, zredukowanego ubichinonu (ubichinolu). Udowodniono, że wzrost stopnia redukcji ubichinonu jest również jednym z czynników powodujących wzrost aktywności AOX [56]. Należy jednak nadmienić, że powyższy opis biochemicznej regulacji AOX dotyczy głównie roślinnego białka. U grzybów np. AOX nie jest białkiem dimerycznym (aktywna AOX jest monomerem) i jest regulowana przez GMP i AMP (a nie przez α -ketokwasy) w sposób zależny od pH macierzy mitochondrialnej [57].

Potranslacyjna regulacja aktywności AOX u roślin wskazuje, że udział tego enzymu w oddychaniu u większości gatunków zależy ściśle od stanu redoks macierzy mitochondrialnej (NADPH wymagane do redukcji mostków dwusiarczkowych) i mtETC (poziom redukcji ubichinonu) oraz metabolizmu węgla (dostępność pirogronianu aktywującego AOX). Nie jest więc zaskakującym fakt, że u roślin, u których poziom białka AOX został znacznie podwyższony na skutek manipulacji genetycznych (u roślin z nadekspresją AOX) nie stwierdzono wzrostu udziału drogi alternatywnej w oddychaniu *in vivo* podczas hodowli roślin w warunkach optymalnych [58]. Nadekspresja AOX daje tylko potencjalną możliwość wzrostu udziału AOX w oddychaniu jednak biochemiczna regulacja aktywności tego białka ma znaczenie nadrzędne.

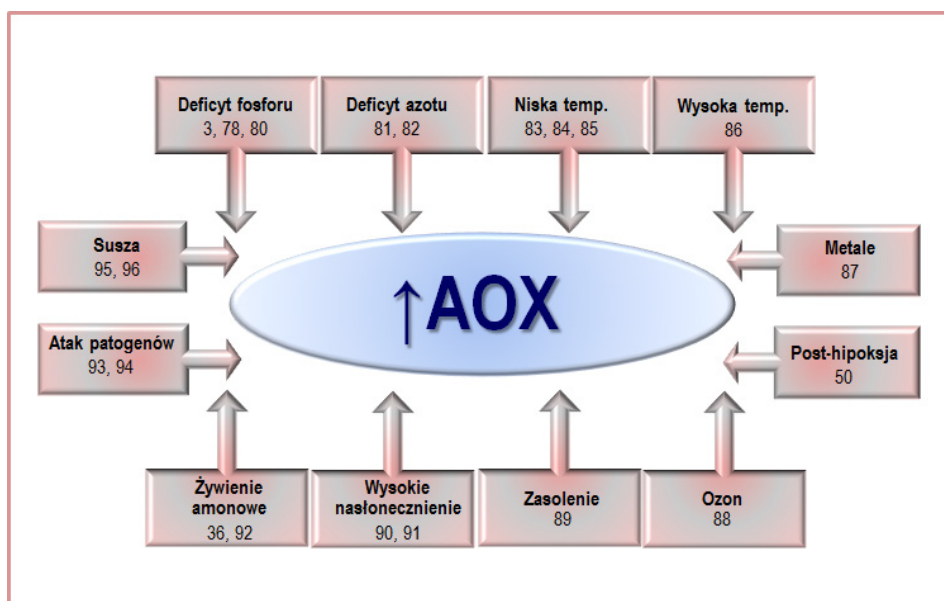
Poszczególne kompleksy mtETC mogą ze sobą ściśle oddziaływać tworząc struktury tzw. superkompleksów [59]. W nielicznych pracach pokazano, że AOX również

może występować w multikompleksach masie ok 150-350 kDa [60]. Odkrycia te pozwalają spekulować, że AOX połączona w multikompleksach np. z dehydrogenazmi NAD(P)H typu II mogłaby jeszcze wydajniej odbierać elektrony z ubichinolu w warunkach nadmiaru siły redukcyjnej [21]. Aczkolwiek wykazano, że w mitochondriach izolowanych z pomidora AOX jest specyficznie połączona z kompleksem III mtETC [57]. Ewentualne konsekwencje fizjologiczne występowania AOX w multikompleksach wymagają więc dalszych badań.

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI DROGI ALTERNATYWNEJ

Już we wczesnych badaniach wykazano, że udział drogi alternatywnej w oddychaniu, ze względu na brak miejsca sprzężenia, obniża wydajność energetyczną oddychania [7]. Kluczowym zagadnieniem było więc ustalenie metody oznaczania udziału AOX w oddychaniu w warunkach *in vivo* oraz mechanizmu regulacji przepływu elektronów przez drogę cytochromową i alternatywną. Zaproponowana przez Bahra i Bonnera [2] hipoteza zakładała funkcjonowanie drogi alternatywnej przy wysycionej (lub zahamowanej) drodze cytochromowej tzw. hipoteza *overflow*. Zmodyfikowana następnie przez Lambersa [61] na *energy overflow* i De Vissera [62] na *energy overcharge* określała warunki metaboliczne tkanek sprzyjające wzrostowi udziału drogi alternatywnej w oddychaniu.

Zakładająca wysycenie drogi cytochromowej hipoteza Bahra i Bonnera [2] stała się podstawą metody oznaczania aktywności drogi alternatywnej przy użyciu inhibitorów obu dróg. W wyniku wysycenia (lub zahamowania) drogi cytochromowej wzrasta redukcja ubichinonu, wspólnego przekaźnika elektronów w łańcuchu oddechowym [63]. Maksymalną aktywność drogi alternatywnej ustalano w obecności cyjanku, a jej udział w oddychaniu oznaczano dodając wzrastające stężenia inhibitora AOX tzw. miareczkowanie drogi alternatywnej. Obszerny opis tych oznaczeń zawarty jest w artykule przeglądowym [7]. Wykazano jednak, że zahamowanie AOX może prowadzić do wzrostu oddychania drogą cytochromową co wskazywało na brak wysycenia drogi cytochromowej przy aktywnej drodze alternatywnej [64]. Wykazano również, że AOX może współzawodniczyć z oksydazą cytochromową o pulę elektronów ze zredukowanego ubichinonu [54]. Użycie inhibitorów nie może być więc metodą oznaczania udziału AOX w oddychaniu *in vivo*, natomiast wskazuje jedynie na jej maksymalną aktywność (V_{\max} AOX). Dyskusja dotychczasowych wyników doprowadziła do publikacji artykułu pod znamienym tytułem *The cyanide-resistant oxidase: to inhibit or not to inhibit, that is the question* [65]. Do oznaczania aktywności AOX *in vivo* zaproponowano nową technikę wykorzystującą obserwowany wcześniej zróżnicowany stopień dyskryminacji pobierania izotopu tlenu przez oksydazę cytochromową i alternatywną [66]. Stopień dyskryminacji pobierania z powietrza izotopu tlenu $^{18}\text{O}_2$ w stosunku do $^{16}\text{O}_2$ przez AOX jest większy niż oksydazy cytochromowej (23,5-25,5% dla AOX i 17,1-20% dla COX) [67,68]. Technika dyskryminacji została zastosowana w licznych badaniach i jest obecnie uznana za jedyną wiarygodną metodę oznaczania *in vivo* udziału drogi alternatywnej w oddychaniu. Metoda ta ma jednak



Rycina 3. Przykładowe czynniki stresowe, które zwiększają poziom mRNA, białka lub aktywność AOX. Numerami wskazano prace, w których był przedstawiony wpływ danego czynnika stresowego na AOX.

pewne ograniczenia, niemożliwe np. jest oznaczenie aktywności AOX *in vivo* na świetle.

UDZIAŁ AOX W METABOLIZMIE ROŚLIN

Udział AOX w procesie termogenezy jest najwcześniej odkrytą funkcją tego białka. W organach generatywnych u Obrazkowatych (Araceae) oddychanie cyjanoodporne może powodować wzrost temperatury tkanek o ok. 10°C powyżej temperatury otoczenia, umożliwiając wabienie owadów i zapylenie. Jednak taki wzrost temperatury tkanek związany z wielokrotnym wzrostem oddychania jest możliwy tylko u nielicznych przedstawicieli świata roślin, u pozostałych rozpraszanie energii w postaci ciepła nie ma istotnego znaczenia fizjologicznego (aktywność AOX może spowodować wzrost temperatury tkanek o ułamki stopnia) [69]. Jaka jest więc rola AOX u roślin nietermogennych? Odpowiadając krótko, istotna i ważna, aczkolwiek różna w zależności od rośliny i jej stanu fizjologicznego.

AOX bierze udział w bilansowaniu metabolizmu węgla oraz statusu redoks komórek. Aktywność drogi cytochromowej mtETC jest regulowane przez adenylany, tzn. że w warunkach niskiego stężenia ADP jest ona ograniczana [53]. Nadmiar siły redukcyjnej (w postaci NAD(P)H) powstałej w szlaku glikolizy oraz cyklu Krebsa uniemożliwiłby sprawne działanie tych szlaków, jednocześnie mogłoby spowodować wysycenie elektronami mtETC. Cykl Krebsa jest nie tylko źródłem reduktantów zużywanych przez mtETC ale również źródłem metabolitów pośrednich, koniecznych do sprawnego działania wielu ważnych dla komórki roślinnej procesów, m. in. asymilacji azotu [70]. Dodatkowe, niefosforylujące szlaki łańcucha oddechowego, do których zaliczamy AOX i dehydrogenazy NAD(P)H typu II (Ryc. 1), umożliwiając działanie mtETC niezależnie od zapotrzebowania komórki na

energię (działają gdy poziom ADP jest niski), a tym samym zapewniają dostarczanie substratów do biosyntezy.

Wspomniane wyżej wysycenie elektronami mtETC ma również inne konsekwencje fizjologiczne. Na skutek wycieku elektronów w mtETC na poziomie kompleksu I i kompleksu III wytwarzane są mtROS [71]. AOX odbierając elektrony z ubichinolu zapobiega wytwarzaniu mtROS w kompleksie III i obniża wytwarzanie mtROS w kompleksie I (poprzez obniżenie stopnia wysycenia mtETC elektronami). Pierwszym, który zaproponował, że AOX działa jako mechanizm prewencyjny przed wzrostem wytwarzania mtROS był Purvis [72]. W późniejszych badaniach z wykorzystaniem transgenicznych linii tytoniu pokazano, że rzeczywiście nadekspresja AOX istotnie obniża

wytwarzanie mtROS, natomiast obniżenie ekspresji AOX powoduje wzrost wytwarzania mtROS [73]. Tak ważną funkcją jak przeciwdziałanie wytwarzaniu mtROS powoduje, że ekspresja AOX jest indukowana przez działanie wielu czynników stresowych [74] (Ryc. 3). Równocześnie jednak rozważana jest funkcja AOX jako modulatora sygnalizacji *retrograde* [34]. MtROS przypisuje się istotną rolę w tej sygnalizacji [37], dlatego aktywność AOX mogłaby zwiększać lub zmniejszać intensywność sygnału.

W ostatnich latach zaproponowano również, że AOX zgodnie ze swoją pierwotną funkcją [32] obniża/stabilizuje poziom tlenu w mitochondriach, co również wiązałoby się z obniżaniem wytwarzania mtROS [75]. AOX ma znacznie niższe powinowactwo do tlenu w porównaniu do COX [53] dlatego jej funkcjonowanie w warunkach ograniczonego dostępu O₂ nie obniża jednocześnie wydajności procesu fosforylacji.

Aktywność AOX optymalizuje proces fotosyntezy [34], ma to związek z jej rolą w bilansowaniu stanu redoks komórki. W procesie fotosyntezy wytwarzane są duże ilości reduktantów, w razie ich nadmiaru (np. w warunkach zbyt wysokiego nasłonecznienia) w chloroplastach dochodziłoby do fotoinhibicji (zahamowania procesu fotosyntezy). Nadmiar reduktantów może być transportowany z chloroplastów i utleniony w mtETC, przy czym główną rolę w procesie utleniania przypisuje się szlakom niefosforylującym mtETC. Ponadto optymalizacja procesu fotosyntezy przez AOX może być powiązana z utlenianiem siły redukcyjnej produkowanej podczas fotooddychania [76] lub metabolizmu jabłczanu u roślin gruboszowatych [77].

Aktywność AOX jest również istotna w warunkach, w których w procesach metabolicznych produkowane są związki hamujące działanie COX lub kiedy warunki śró-

CZYNNIKI STRESOWE POWODUJĄCE WZROST LUB SPADEK UDZIAŁU DROGI ALTERNATYWNEJ W mtETC

Ze względu na znaczenie fizjologiczne nie jest zaskakującym fakt, że wzrost poziomu transkryptu, białka czy też aktywności AOX stwierdzono w większości badanych stresów (Ryc. 3) [3,36,50,78-96]. AOX nazwana została nawet markerem stresu [74]. Podczas warunków stresowych funkcja AOX wiąże się z utrzymaniem homeostazy metabolicznej (związanej z metabolizmem węgla, stanem redoks tkanek oraz zapotrzebowaniem na energię) oraz z utrzymaniem homeostazy ROS, w tym również modulowaniem sygnału *retrograde*.

Trzeba jednak wyjaśnić, że nie można generalizować, iż wzrost udziału AOX w oddychaniu jest odpowiedzią na każdy czynnik stresowy. Udowodniono np., że AOX nie jest indukowana m. in. w odpowiedzi na deficyt siarki [97-99]. Spadek udziału AOX w oddychaniu obserwuje się również w warunkach anerobowych [50]; wydaje się, że wynika to głównie z niskiego powinowactwa AOX do tlenu (w niskim stężeniu AOX nie działa) [53].

METABOLIZM MUTANTÓW ZE ZMIENIONĄ EKSPRESJĄ AOX

Era badań mających na celu zobrazowanie odpowiedzi metabolicznej komórek roślinnych na manipulacje genetyczne poziomu AOX rozpoczęła się na dobre od skonstruowania komórek zawiesiny tytoniu (*Nicotiana tabacum*) z obniżoną i zwiększoną ekspresją tego białka [100,101]. W kolejnych latach, konstruowano mutanty i rośliny transgeniczne, ze zmienioną ekspresją AOX (Tab. 1), głównie w celu wykazania znaczenia tego białka w różnych warunkach stresowych [102-108]. O ile znaczenie AOX w warunkach stresowych wydaje się być niepodważalne (Ryc. 3), o tyle ciekawe wydaje się pokazanie jak zmienia się metabolizm roślin z wymuszoną genetycznie zmianą ekspresji genu AOX podczas hodowli w warunkach optymalnych. Wykazano, że poziom anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach tytoniu hodowanego w warunkach optymalnych jest negatywnie skorelowany z poziomem ekspresji genu AOX [109]. Jednak jeśli chodzi o wpływ poziomu AOX na pokrój ogólny roślin oraz np. metabolizm węgla (w tym fotosyntezę) dane literaturowe są często niespójne. Pokazano, że zmiana ekspresji genu AOX nie wpływa na fenotyp rzodkiewnika [110] ale znacząco przyspiesza wzrost manioku [111]. Pokazano również, że parametry fizjologiczne związane z procesem fotosyntezy (m. in. przewodnictwo szparkowe czy stosunek chlorofilu *a* do *b*) mogą być niezmiennicze [103] lub znacznie się różnić [105] u roślin ze zmienioną ekspresją genu AOX w porównaniu do roślin dzikich gdy hodowle prowadzono w warunkach optymalnych do wzrostu.

Co ciekawe, wnioskowanie, że jeśli działanie danego czynnika stresowego powoduje wzrost poziomu AOX to rośliny z nadekspresją genu AOX są bardziej odporne na działanie tego czynnika, może być całkowicie błędne. Pomimo, że traktowanie roślin ozonem indukuje AOX, rośliny z nadekspresją tego białka są bardziej wrażliwe

dowiskowe hamują lub ograniczają działanie drogi cytochromowej. Np. podczas intensywnej produkcji etylenu, w komórkach roślinnych może dojść do wzrostu stężenia CN-, inhibitora COX, ponieważ cyjanek jest produktem działania jednego z enzymów szlaku syntezy tego fitohormonu [53]. Ponadto w warunkach stresowych komórki roślinne mogą produkować znaczne ilości tlenu azotu (NO) a podczas detoksyfikacji endogennych związków cyjanogennych przez syntazę β -cyjanoalaniny wytwarzany jest siarkowodór. Oba te związki są inhibitorami COX [53]. Przykładem ograniczenia działania szlaku cytochromowego na skutek warunków środowiskowych jest niedobór fosforu w podłożu. Fosfor nieorganiczny (Pi) jest substratem do syntezy ATP, jego brak powoduje wzrost stężenia ADP, zahamowanie działania szlaku cytochromowego i w konsekwencji wzrost aktywności AOX [78]

Wielu badaczy zastanawia się również, jaka może być rola AOX w metabolizmie zwierząt. Przypuszcza się, że u wielu zwierząt zasadniczo rola AOX jest podobna do roli jaką odgrywa w organizmach roślinnych, tzn. łagodzenie skutków niekorzystnych warunków środowiska, w których muszą przebywać te organizmy (np. modulowanie wydajności syntezy ATP oraz obniżanie produkcji mtROS spowodowanych zmianami temperatury otoczenia u zwierząt żyjących w wodach) [6]. Zaangażowanie AOX może być również istotne w metabolizmie oddechowym gdy zwierzęta narażone są na działanie związków hamujących aktywność COX, np. siarkowodoru (dotyczy to głównie morskich bezkręgowców, które żyją w wodach o dużym stężeniu tego związku), NO (na działanie tlenu azotu będącego jednym z mechanizmów obronnych narażone są głównie organizmy patogenne) czy też CN- (wydzielanego przez niektóre rośliny w odpowiedzi na atak patogenów). Ponadto wydaje się, że AOX jest istotnym elementem strategii metabolicznej u tzw. oksykonformistów, organizmów, których aktywność metabolizmu oddechowego jest odzwierciedleniem stężenia tlenu w środowisku. Dzięki AOX organizmy te (np. *S. nudus*) mogą zwiększać aktywność oddechową w warunkach wysokiego stężenia tlenu bez zbędnej produkcji ATP [6]. Dlaczego więc zwierzęta wyższe utraciły AOX w toku ewolucji? Wydaje się, że dobrym, a zarazem najprostszym wytłumaczeniem jest fakt, że aktywność AOX obniża wydajność fosforylacji. AOX utrzymała się w genomie zwierząt wolno poruszających się, jednak gdy przeżycie zależało od siły mięśni (koniecznych do walki, ucieczki lub złowienia pożywienia) jej funkcjonowanie (obniżające produkcję ATP) stało się cechą niepożądaną [79].

Trzeba zauważyć, że badania biochemiczne zwierzęcych AOX są raczej szczątkowe mimo, że enzym ten jest ważnym elementem metabolizmu zwierząt istotnych z punktu widzenia zdrowia człowieka (jak *T. brucei*) czy wydajności gospodarki (np. *M. hapla*). Wiadomo jednak, że rozważa się wykorzystanie AOX jako celu w terapiach groźnych chorób. U znajdujących się w krwiobiegu *T. brucei* AOX jest jedyną terminalną oksydazą w mtETC, którego funkcjonowanie jest konieczne parazytom do utleniania NADH produkowanego podczas intensywnej glikolizy [30]. Wykazano, że askofuranon, inhibitor oksydaz chinolowych może być skutecznym lekiem przeciwko *T. brucei* [30].

Tabela 1. Przykładowe prace pokazujące wpływ zmiany ekspresji genu kodującego AOX (na skutek manipulacji genetycznych) na odporność roślin czynniki stresowe.

Gatunek	Modyfikacja AOX	Obserwacje	Piśmiennictwo
<i>A. thaliana</i>	obniżona ekspresja lub nadekspresja AOX1a	odporność roślin na warunki niskiej temperatury jest pozytywnie skorelowana z poziomem AOX	[102]
<i>A. thaliana</i>	obniżona ekspresja AOX	mutanty wykazują obniżoną odporność na stres świetlny i suszy	[103]
<i>N. tabacum</i>	nadekspresja AOX1a	mutanty są bardziej wrażliwe na działanie ozonu	[104]
<i>N. tabacum</i>	obniżona ekspresja AOX1a	niski poziom AOX1a u roślin powoduje ograniczenia aktywności fotosyntetycznej roślin podczas suszy	[105]
<i>A. thaliana</i>	obniżona ekspresja AOX1a	wzrost aktywności fotooddechowej u mutantów	[106]
<i>A. thaliana</i>	obniżona ekspresja AOX1a	zaburzenia procesu fotosyntezy w warunkach wysokiego natężenia światła	[107]
<i>A. thaliana</i>	obniżona ekspresja lub nadekspresja AOX1a	uszkodzenia spowodowane kadmem są odwrotnie proporcjonalne do poziomu AOX	[108]

na O₃ [34,104]. Paradoksalnie, prawdopodobnie obniżanie poziomu mtROS przez AOX zapobiega uruchamianiu sygnału do indukcji systemu antyoksydacyjnego w komórce po działaniu ozonu, co w konsekwencji obniża odporność na stres.

AOX W MEDYCYNIE

Transport elektronów w ludzkim mtETC przebiega klasycznym liniowym szlakiem (kompleks I lub kompleks II – kompleks III – kompleks IV). Łańcuch oddechowu w ludzi nie zawiera alternatywnych szlaków dlatego też zaburzenie funkcji któregośkolwiek z jego komponentów prowadzi do zaburzeń metabolicznych. Objawy kliniczne zaburzenia funkcjonowania mitochondriów są częste, występują u 1 na 10000 pacjentów [112]. Udowodniono, że nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondriów jest jedną z przyczyn wielu poważnych chorób, m.in. choroby Parkinsona, Alzheimera, kardiomiopatii czy epilepsji; u pacjentów chorych na te choroby stwierdzono m. in. znaczny wzrost produkcji mtROS [79]. Chorych, u których stwierdzono takie zaburzenia, nie można wyleczyć znanymi środkami farmaceutycznymi. Ok. dwóch dekad temu powstał pomysł by zastosować specyficzną terapię genową, tzn. wprowadzić geny kodujące białka szlaków alternatywnych w mtETC do komórek ludzkich [79]. Wprowadzenie genu kodującego AOX do komórek ludzkich może być ratunkiem dla chorych, u których stwierdzono zaburzenia funkcjonowania kompleksu III lub IV. Pierwsze, długoletnie niepowodzenia w badaniach spowodowane były prawdopodobnie tym, że do komórek ludzkich próbowano wprowadzić roślinny gen AOX, co powodowało letalność tych komórek [113]. W kolejnych eksperymentach wykorzystano gen pochodzący z przejrzystki (*Ciona intestinalis*) należącej do gromady żachw. Już w pierwszych opublikowanych wynikach badań pokazano, że ekspresja genu kodującego AOX może skutecznie zachodzić w komórkach ludzkich hodowanych w warunkach *in vitro* [113]. Wykazano, że oddychanie komórek, w których zachodzi ekspresja genu AOX jest w dużym stopniu niewrażliwe na cyjanek, co świadczy o tym, że białko AOX jest skutecznie kierowane do mitochondrium i bierze udział w funkcjonowaniu ludzkiego

mtETC. Aktywność AOX w komórkach człowieka podlega również regulacji przez pirogronian [113].

Wiadomo jednak, że badania z wykorzystaniem kultur *in vitro* nie zawsze mają proste przełożenie na funkcjonowanie całego organizmu. Kolejnym etapem badań było więc stworzenie muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), do której wprowadzono gen *C. intestinalis*. Wykazano, że *Drosophila* posiadające AOX rozwijają się prawidłowo chociaż trochę wolniej niż zwierzęta kontrolne i są odporne na cyjanek [114]. Wykorzystując *Drosophila* z częściową dysfunkcją kompleksu IV mtETC wykazano, że wprowadzenie genu AOX może komplementować taki defekt [114]. Ponadto ekspresja AOX obniża poziom mtROS u mutantu *dj-1β* muszki owocowej będącego modelowym organizmem w badaniach przyczyn choroby Parkinsona [114]. W kolejnych badaniach wykazano, że komórki ludzkie z ekspresją genu AOX są mniej wrażliwe na stres oksydacyjny [115] ale komplementacja dysfunkcji kompleksu IV spowodowanej brakiem jednej z jego podjednostek może spowodować np. ograniczenia funkcji lokomotorycznych *Drosophila* [116]. W 2013 roku opublikowano badania obrazujące wpływ ekspresji AOX na metabolizm transgenicznej myszy [117]. Wykazano, m. in. że po wprowadzeniu genu AOX do zarodków myszy, u dorosłych osobników białko to jest ekspresjonowane na różnym poziomie w różnych organach (najwięcej białka AOX jest w trzustce i mózgu a najmniej w wątrobie) oraz, że ekspresja AOX utrzymuje się w kolejnych pokoleniach gryzoni [117]. Podobnie jak *Drosophila* myszy z ekspresją AOX rozwijają się wolniej niż zwierzęta kontrolne i wykazują obecność oddychania niewrażliwego na cyjanek. Badania dotyczące zastosowania AOX w terapii ludzi są nadal prowadzone. Odpowiedzi wymaga jeszcze wiele pytań, m.in. czy AOX będzie komplementowała dysfunkcje mtETC u tak skomplikowanego organizmu jak mysz, czy można zastosować AOX w terapiach nie tylko wad wrodzonych, ale również nabytych (np. w wyniku długotrwałego leczenia) oraz jak wprowadzić gen AOX do dorosłego osobnika [118]. Ciekawostką w badaniach wykorzystania AOX w terapii ludzi jest fakt, że jednej z grup badawczych udało się jednak wprowadzić gen roślinnej AOX do komórek ludzkich [119].

PODSUMOWANIE

Oddychanie niewrażliwe na cyjanek, związane z aktywnością oksydazy alternatywnej zajmuje naukowców od wielu lat. Historia badań AOX zawiera punkty przełomowe związane wpływem rozwoju technik badawczych a szczególnie biologii molekularnej. Niestety nadal trudnością w badaniach udziału AOX w oddychaniu tkanek *in vivo* są ograniczenia metodyczne. Wiadomo, że oksydaza alternatywna, małe białko będące fragmentem mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy metabolicznej komórek roślinnych. Jednak każda dekada badań nad AOX przynosi nowe idee dotyczące zrozumienia w pełni jej złożonej funkcji w metabolizmie. W konsekwencji pokazują się nowe perspektywy wykorzystania AOX w różnych dziedzinach. Wzrost udziału AOX w oddychaniu powoduje zwiększenie odporności na działanie wielu czynników stresowych, dlatego też białko to może być celem modyfikacji genetycznych mających na celu optymalizację plonowania w rolnictwie. Badania ostatnich lat potwierdzają, że AOX może być również zastosowana w terapii genowej u ludzi, u których stwierdzono nieprawidłowe funkcjonowanie mtETC. AOX może być nadzieją na leczenie ludzi m.in. z choroby Parkinsona i Alzheimerera. A więc „never ending story”...

PIŚMIENNICTWO

1. Meeuse BJD (1975) Thermogenic respiration in aroids. *Annu Rev Plant Physiol* 26: 117-126
2. Bahr JT, Bonner WDJr (1973) Cyanide-insensitive respiration. Control of the alternative pathway. *J Biol Chem* 248: 3441-3445
3. Rychter AM, Mikulska M (1990) The relationship between phosphate status and cyanide-resistant respiration in bean roots. *Physiol Plant* 79: 663-66
4. Hackett D, Haas DW, Griffiths SK, Niederpruem DJ (1960) Studies on development of cyanide-resistant respiration in potato tuber slices. *Plant Physiol* 35: 8-9
5. Rychter AM, Janes H, Frenkel C (1978) Cyanide-resistant respiration in freshly cut potato slices. *Plant Physiol* 61: 667-668
6. McDonald A, Vanlerberghe G (2004) Branched mitochondrial electron transport in the animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla. *IUBMB Life* 56: 333-341
7. Rychter AM (1982) Alternatywna droga oddechowa w roślinach wyższych. *Post Biochem* 28: 89-111
8. Rychter AM (1996) Roślinny łańcuch oddechowy. *Post Biochem* 42: 268-276
9. Juszczuk IM, Rychter AM (2003) Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Polonica* 50: 1257-1271
10. Schonbaum GR, Bonner WDJ, Storey BT, Bahr JT (1971) Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol* 47: 124-128
11. Bonner WD, Clarke SD, Rich PR (1986) Partial purification and characterization of the quinol oxidase activity of *Arum maculatum* mitochondria. *Plant Physiol* 80: 838-842
12. Elthon TE, McIntosh L (1987) Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8399-8403
13. Elthon TE, Nickels RL, McIntosh L (1989) Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol* 89: 1311-1317
14. Berthold DA, Siedow JN (1993) Partial purification of cyanide-resistant alternative oxidase of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*) mitochondria. *Plant Physiol* 101: 113-119
15. Rhoads BM, McIntosh L (1991) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott). *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2122-2126
16. Considine MJ, Holtzapffel RC, Day DA, Whelan J, Millar H (2002) Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol* 129: 949-953
17. Feng H, Guan D, Sun K, Wang Y, Zhang T, Wang R (2013) Expression and signal regulation of the alternative oxidase genes under abiotic stresses. *Acta Biochim Biophys Sin* 45: 985-994
18. Wóycicki R, Witkiewicz J, Gawroński P, Dąbrowska J, Lomsadze A, Pawełkiewicz M, Siedlecka E, Yagi K, Płader W, Seroczyńska A, Śmiech M, Gutman W, Niemirowicz-Szczytt K, Bartoszewski G, Tagashira N, Hoshi Y, Borodovsky M, Karpiński S, Malepszy S, Przybecki Z (2011) The genome sequence of the north-european cucumber (*Cucumis sativus* L.) unravels evolutionary adaptation mechanisms in plants. *PLoS ONE* 7: e22728
19. Costa JH, McDonald AE, Arnholdt-Schmitt B, Fernandes de Melo D (2014) A classification scheme for alternative oxidases reveals the taxonomic distribution and evolutionary history of the enzyme in angiosperms. *Mitochondrion* 19: 172-183
20. Borecký J, Nogueira FTS, Maia IG, Vercei AE, Arruda P (2006) The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *J Exp Bot* 57: 849-864
21. Moore AL, Shiba T, Young L, Harada S, Kita K, Ito K (2013) Unraveling the heater: new insights into the structure of the alternative oxidase. *Annu Rev Plant Biol* 64: 637-663
22. Berthold DA, Fluke DJ, Siedow JN (1988) Determination of molecular mass of the aroid alternative oxidase by radiation-inactivation analysis. *Biochem J* 252: 73-77
23. Minagawa N, Sakajo S, Komiyama T, Yoshimoto A (1990) Essential role of ferrous iron in cyanide resistant respiration *Hansenula anomala*. *FEBS Lett* 267: 114-116
24. Berthold DA, Voevodskaya N, Stenmark P, Gräslund A, Nordlund P (2002) EPR studies of the mitochondrial alternative oxidase: Evidence for a diiron carboxylate center. *J Biol Chem* 277: 43608-43614
25. Moore AL, Carré JE, Affourtit C, Albury MS, Crichton PG, Kita K, Heathcote P (2008) Compelling EPR evidence that the alternative oxidase is a diiron carboxylate protein. *Biochim Biophys Acta* 1777: 327-333
26. Siedow JN, Umbach AL, Moore AL (1995) The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett* 362: 10-14
27. Andersson ME, Nordlund P (1999) A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett* 449: 17-22
28. Albury MS, Elliott C, Moore AL (2010) Ubiquinol-binding site in the alternative oxidase: mutagenesis reveals features important for substrate binding and inhibition. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1797: 1933-1939
29. Crichton PG, Albury MS, Affourtit C, Moore AL (2010) Mutagenesis of the *Sauromatum guttatum* alternative oxidase reveals features important for oxygen binding and catalysis. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1797: 732-737
30. Shiba T, Kido Y, Sakamoto K, Inaoka DK, Tsuge C, Tatsumi R, Takahashi G, Balogun EO, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Saimoto H, Moore AL, Harada S, Kita K (2013) Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 4580-4585
31. Pennisi R, Salvi D, Brandi V, Angelini R, Ascenzi P, Polticelli F (2016) Molecular evolution of alternative oxidase proteins: a phylogenetic and structure modeling approach. *J Mol Evol* 82: 207-218
32. Gomes CM, Le Gall J, Xavier AV, Teixeira M (2001) Could a diiron-containing four-helix-bundle protein have been a primitive oxygen reductase? *Chem Biochem* 7: 583-587
33. Juszczuk IM, Szal B, Rychter AM (2012) Oxidation-reduction and reactive oxygen species homeostasis in mutant plants with respiratory chain complex I dysfunction. *Plant Cell Environ* 35: 296-307

34. Vanlerberghe G (2013) Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int J Mol Sci* 14: 6805-6847
35. Clifton R, Lister R, Parker KL, Sappl PG, Elhafez D, Millar AH, Day DA, Whelan J (2005) Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 58: 193-212
36. Podgórska A, Gieczewska K, Łukawska-Kuźma K, Rasmusson AG, Gardeström P, Szal B (2013) Long-term ammonium nutrition of *Arabidopsis* increases the extrachloroplastic NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratio and mitochondrial reactive oxygen species level in leaves but does not impair photosynthetic capacity. *Plant Cell Environ* 36: 2034-2045
37. Rhoads DM, Subbiah CC (2007) Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion* 7: 177-194
38. Szal B, Łukawska K, Zdolińska I, Rychter AM (2009) Chilling stress and mitochondrial genome rearrangement in the MSC16 cucumber mutant affect the alternative oxidase and antioxidant defense system to a similar extent. *Physiol Plant* 137: 435-445
39. Vanlerberghe GC, McIntosh L (1996) Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiol* 111: 589-595
40. Ng S, Giraud E, Duncan O, Law SR, Wang Y, Xu L, Narsai R, Carrie C, Walker H, Day DA, Blanco NE, Strand A, Whelan J, Ivanova A (2013) Cyclin-Dependent kinase E1 (CDKE1) provides a cellular switch in plants between growth and stress responses. *J Biol Chem* 288: 3449-3459
41. Burch-Smith TM, Brunkard JO, Choi YG, Zambryski PC (2011) Organelle-nucleus cross-talk regulates plant intercellular communication via plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1451-1460
42. Giraud E, Van Aken O, Ho LHM, Whelan J (2009) The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of alternative oxidase1a. *Plant Physiol* 150: 1286-1296
43. Vanderauwera S, Vandenbroucke K, Inzé A, Van de Cotte B, Mühlenbock P, De Rycke R, Naouar N, van Gaever TV, Van Montagu MCE, Breusegem FV (2012) AtWRKY15 perturbation abolishes the mitochondrial stress response that steers osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 20113-20118
44. Raskin I, Turner IM, Melander WR (1989) Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2214-2218
45. Ho LHM, Giraud E, Uggalla V, Lister R, Clifton R, Glen A, Thirkettle-Watts D, Van Aken O, Whelan J (2008) Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 147: 1858-1873
46. Zhang DW, Xu F, Zhang ZW, Chen YE, Du JB, Jia SD, Yuan S, Lin HH (2010) Effects of light on cyanide-resistant respiration and alternative oxidase function in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell Environ* 33: 2121-2131
47. Feng H, Li H, Li X, Duan J, Liang H, Zhi D, Ma J (2007) The flexible interrelation between AOX respiratory pathway and photosynthesis in rice leaves. *Plant Physiol Biochem* 45: 228-235
48. Rasmusson AG, Fernie AR, Van Dongen JT (2009) Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiol Plant* 137: 371-382
49. Elhafez D, Murcha MW, Clifton R, Soole KL, Day DA, Whelan J (2006) Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis*: intraorganelle location and expression. *Plant Cell Physiol* 47: 43-54
50. Szal B, Jolivet Y, Hasenfratz-Sauder MP, Dizengremel P, Rychter AM (2003) Oxygen concentration regulates alternative oxidase expression in barley roots during hypoxia and post-hypoxia. *Physiol Plant* 119: 494-502
51. Rhoads DM, Umbach AL, Sweet CR, Lennon AM, Rauch GS, Siedow JN (1998) Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria: Identification of the cysteine residue involved in α -keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *J Biol Chem* 273: 30750-30756
52. Gelhaye E, Rouhier N, Gérard J, Jolivet Y, Gualberto J, Navrot N, Ohlsson PI, Wingsle G, Hirasawa M, Knaff DB, Wang H, Dizengremel P, Meyer Y, Jacquot JP (2004) A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14545-14550
53. Millenaar FF, Lambers H (2003) The alternative oxidase: *in vivo* regulation and function. *Plant Biol* 5: 2-15
54. Millar AH, Wiskich J, Whelan J, Day DA (1993) Organic acid activation of alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett* 329: 259-262
55. Grant N, Onada Y, Kakizaki Y, Ito K, Watling J, Robinson S (2009) Two Cys or not two Cys? That is the question; alternative oxidase in the thermogenic plant sacred lotus. *Plant Physiol* 150: 987-995
56. Hoefnagel MHN, Wiskich JT (1998) Activation of the plant alternative oxidase by high reductin levels of the Q-pool and pyruvate. *Arch Biochem Biophys* 355: 262-270
57. Navet R, Jarmuszkievicz W, Douette P, Sluse-Goffart C, Sluse FE (2004) Mitochondrial respiratory chain complex patterns from *Acanthamoeba castellanii* and *Lycopersicon esculentum*: comparative analysis by BN-PAGE and evidence of protein-protein interaction between alternative oxidase and complex III. *J Bioenerg Biomembr* 36: 471-479
58. Guy RD, Vanlerberghe GC (2005) Partitioning of respiratory electrons in the dark in leaves of transgenic tobacco with modified levels of alternative oxidase. *Physiol Plant* 125: 171-180
59. Dudkina NV, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP (2005) Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3225-3229
60. Kakizaki Y, Moore AL, Ito K (2012) Different molecular bases underlie the mitochondrial respiratory activity in the homoeothermic spadices of *Symplocarpus renifolius* and the transiently thermogenic appendices of *Arum maculatum*. *Biochem J* 445: 237-246
61. Lambers H (1985) Respiration in intact plants and tissues: Its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organisms, W: Duce R, Day DA, (red) Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol 18, Springer-Verlag, Berlin, str. 418-447
62. De Visser R, Brouwer KS, Posthumus F (1986) Alternative path mediated ATP synthesis of *Pisum sativum* roots upon nitrogen supply. *Plant Physiol* 80: 295-300
63. Siedow JN, Moore AL (1993) A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1142: 165-174
64. Møller IM, Berchi A, van der Plas LHW, Lambers H (1988) Measurement of the activity and capacity of the alternative pathway in intact tissues: identification of problems and possible solutions. *Physiol Plant* 72: 642-649
65. Day DA, Krab K, Lambers H, Moore AL, Siedow JN, Wagner AM, Wiskich JT (1996) The cyanide-resistant oxidase: To inhibit or not to inhibit, that is the question. *Plant Physiol* 110: 1-2
66. Guy RD, Berry JA, Fogel ML, Hoering TC (1989) Differential fractionation of oxygen isotopes by cyanide-resistant and cyanide-sensitive respiration in plants. *Planta* 177: 483-491
67. Robinson SA, Ribas-Carbo M, Yakir D, Giles L, Reuveni Y, Berry JA (1995) A beyond SHAM and cyanide: opportunities for studying the alternative oxidase in plant respiration using oxygen isotope discrimination. *Aust J Plant Physiol* 22: 487-496
68. Ribas-Carbo M, Berry JA, Yakir D, Giles L, Robinson SA, Lennon AM, Siedow JN (1995) Electron partitioning between the cytochrome and alternative pathways in plant mitochondria. *Plant Physiol* 109: 829-837
69. Breidenbach RW, Saxton MJ, Hansen LD, Criddle RS (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
70. Szal B, Podgórska A (2012) The role of mitochondria in leaf nitrogen metabolism. *Plant Cell Environ* 35: 1756-1768
71. Møller IM (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
72. Purvis AC, Shewfelt RJ (1993) Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiol Plant* 88: 712-718

73. Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8271-8276
74. Arnhold-Schmitt B, Costa JH, Fernandes de Melo D (2006) AOX - a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends Plant Sci* 11: 281-287
75. Gupta KJ, Zabalza A, Van Dongen JT (2009) Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiol Plant* 137: 383-391
76. Gardestrom P, Igamberdiev AU, Raghavendra AS (2002) Mitochondrial functions in the light and significance to carbon-nitrogen interactions. W: Foyer CH, Noctor G.(red) *Advances in Photosynthesis and Respiration. Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon Respiratory Metabolism*, Vol. 12 eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, str: 151-172
77. Vanlerberghe GC, Cvetkovska M, Wang J (2009) Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiol Plant* 137: 392-406
78. Rychter AM, Chauveau M, Bomsel JL, Lance C (1992) The effect of phosphate deficiency on mitochondrial activity and adenylate levels in bean roots. *Physiol Plant* 84: 80-86
79. Rustin P, Jacobs HT, the Alternatives consortium (2009) Respiratory chain alternative enzymes as tools to better understand and counteract respiratory chain deficiencies in human cells and animals. *Physiol Plant* 137: 362-370
80. Juszczuk IM, Wagner AM, Rychter AM (2001) Regulation of alternative oxidase activity during phosphate deficiency in bean roots (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol Plant* 113: 185-192
81. Noguchi K, Terashima I (2006) Responses of spinach leaf mitochondria to low N availability. *Plant Cell Environ* 29: 710-719
82. Sieger SM, Kristensen BK, Robson CA, Amirsadeghi S, Eng EWY, Abdel-Mesih A, Møller IM, Vanlerberghe GC (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
83. Wang J, Rajakulendran N, Amirsadeghi S, Vanlerberghe GC (2011) Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. *Physiol Plant* 142: 339-351
84. Ito Y, Saisho D, Nakazono M, Tsutsumi N, Hirai A (1997) Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature. *Gene* 203: 121-129
85. González-Meler MA, Ribas-Carbo M, Giles L, Siedow JN (1999) The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. *Plant Physiol* 120: 765-772
86. Rachmilevitch S, Xu Y, Gonzalez-Meler MA, Huang B, Lambers H (2007) Cytochrome and alternative pathway activity in roots of thermal and non-thermal *Agrostis* species in response to high soil temperature. *Physiol Plant* 129: 163-174
87. Li Z, Xing D (2011) Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminum phytotoxicity using fluorescence techniques. *J Exp Bot* 62: 331-343
88. Ederli L, Morettini R, Borgogni A, Wasternack C, Miersch O, Reale L, Ferranti F, Tosti N, Pasqualini S (2006) Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. *Plant Physiol* 142: 595-608
89. Marti MC, Florez-Sarasa I, Camejo D, Ribas-Carbo M, Lázaro JJ, Sevilla F, Jiménez A (2011) Response of mitochondrial thioredoxin PsTrx1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum*, L.) leaves. *J Exp Bot* 62: 3863-3874
90. Florez-Sarasa I, Ostaszewska M, Galle A, Flexas J, Rychter AM, Ribas-Carbo M (2009) Changes of alternative oxidase activity, capacity and protein content in leaves of *Cucumis sativus* wild-type and MSC16 mutant grown under different light intensities. *Physiol Plant* 137: 419-426
91. Ribas-Carbo M, Robinson SA, González-Meler MA, Lennon AM, Giles L, Siedow JN, Berry JA (2000) Effects of light on respiration and oxygen isotope fractionation in soybean cotyledons. *Plant Cell Environ* 23: 983-989
92. Podgórska A, Ostaszewska M, Gardeström P, Rasmusson AG, Szal B (2015) In comparison with nitrate nutrition, ammonium nutrition increases growth of the *frostbite1 Arabidopsis* mutant. *Plant Cell Environ* 38: 224-237
93. Cvetkovska M, Vanlerberghe GC (2013) Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species. *Plant Cell Environ* 36: 721-732
94. Dutilleul C, Garmier M, Noctor G, Mathieu C, Chétrit P, Foyer CH, de Paepe R (2003) Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell* 15: 1212-1226
95. Bartoli CG, Gomez F, Gergoff G, Guaiamét JJ, Puntarulo S (2005) Up-Regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *J Exp Bot* 56: 1269-1276
96. Ribas-Carbo M, Taylor NL, Giles L, Busquets S, Finnegan PM, Day DA, Lambers H, Medrano H, Berry JA, Flexas J (2005) Effects of water stress on respiration in soybean leaves. *Plant Physiol* 139: 466-473
97. Juszczuk IM, Ostaszewska M (2011) Respiratory activity, energy and redox status in sulphur-deficient bean plants. *Environ Exp Bot* 74: 245-254
98. Ostaszewska M, Juszczuk IM, Kołodziejek I, Rychter AM (2014) Long-term sulphur starvation of *Arabidopsis thaliana* modifies mitochondrial ultrastructure and activity and changes tissue energy and redox status. *J Plant Physiol* 171: 549-558
99. Ostaszewska-Bugajska M, Juszczuk IM (2016) Changes in the OXPHOS system in leaf and root mitochondria of *Arabidopsis thaliana* subjected to long-term sulphur deficiency. *Acta Physiol Plant*, w druku, DOI 10.1007/s11738-016-2155-1
100. Vanlerberghe GC, Vanlerberghe AE, McIntosh L (1994) Molecular genetic alteration of plant respiration. Silencing and over-expression of alternative oxidase in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 106: 1503-1510
101. Parsons HL, Yip JYH, Vanlerberghe GC (1999) Increased respiratory restriction during phosphate-limited growth in transgenic tobacco cells lacking alternative oxidase. *Plant Physiol* 121: 1309-1320
102. Fiorani F, Umbach AL, Siedow JN (2005) The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis AOX1a* transgenic plants. *Plant Physiol* 139: 1795-1805
103. Giraud E, Ho LHM, Clifton R, Carroll A, Estavillo G, Tan YF, Howell KA, Ivanova A, Pogson BJ, Millar AH, Whelan J (2008) The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiol* 147: 595-610
104. Pasqualini S, Paolucci F, Borgogni A, Morettini R, Ederli L (2007) The overexpression of an alternative oxidase gene triggers ozone sensitivity in tobacco plants. *Plant Cell Environ* 30: 1545-1556
105. Dahal K, Wang J, Martyn GD, Rahimy F, Vanlerberghe C (2014) Mitochondrial alternative oxidase maintains respiration and preserves photosynthetic capacity during moderate drought in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol* 166: 1560-1574
106. Strodtkötter I, Padmasree K, Dinakar C, Speth B, Niazi P, Wojtera J, Voss I, Thi Do P, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Linke V, Raghavendra AS, Scheibe R (2009) Induction of the AOX1D Isoform of Alternative Oxidase in *A. thaliana* T-DNA Insertion Lines Lacking Isoform AOX1A Is Insufficient to Optimize photosynthesis when treated with antimycin A. *Mol Plant* 2: 284-297
107. Yoshida K, Watanabe CK, Terashima I, Noguchi K (2011), Physiological impact of mitochondrial alternative oxidase on photosynthesis and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 34: 1890-1899
108. Liu J, Li Z, Wang Y, Xing D (2014) Overexpression of ALTERNATIVE OXIDASE1a alleviates mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 65: 4465-4478
109. Cvetkovska M, Vanlerberghe GC (2012) Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial levels of superoxide and nitric oxide. *New Phytol* 195: 32-39
110. Umbach AL, Fiorani F, Siedow JN (2005) Characterization of transformed *Arabidopsis* with altered alternative oxidase levels and analy-

- sis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiol* 139: 1806-1820
111. Zidenga T, Leyva-Guerrero E, Moon H, Siritunga D, Sayre R (2012) Extending cassava root shelf life *via* reduction of reactive oxygen species production. *Plant Physiol* 159: 1396-1407
112. Schiff M, Bénit P, Jacobs HT, Vockley J, Rustin P (2012) Therapies in inborn errors of oxidative metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 23:488-495
113. Hakkaart GA, Dassa EP, Jacobs HT, Rustin P (2006) Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. *EMBO Rep* 7: 341-345
114. Fernandez-Ayala DJ, Sanz A, Vartiainen S, Kempainen KK, Babusiak M, Mustalahti E, Costa R, Tuomela T, Zeviani M, Chung J, Odell KMC, Rustin P, Jacobs HT (2009) Expression of the *Ciona intestinalis* alternative oxidase (AOX) in *Drosophila* complements defects in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 9: 449-460
115. Dassa EP, Dufour E, Goncalves S, Jacobs HT, Rustin P (2009) The alternative oxidase, a tool for compensating cytochrome *c* oxidase deficiency in human cells. *Physiol Plant* 137: 427-434
116. Kempainen KK, Rinne J, Sriram A, Lakanmaa M, Zeb A, Tuomela T, Popplestone A, Singh S, Sanz A, Rustin P, Jacobs HT (2014) Expression of alternative oxidase in *Drosophila* ameliorates diverse phenotypes due to cytochrome oxidase deficiency *Hum Mol Genet* 23: 2078-2093
117. El-Khoury R, Dufour E, Rak M, Ramanantsoa N, Grandchamp N, Csaba Z, Duvillie B, Gallego J, Gressens P, Sarkis C, Jacobs HT, Rustin P (2013) Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome *c* oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction. *PLoS Genet* 9: e1003182
118. El-Khoury R, Kempainen KK, Dufour E, Szibor M, Jacobs HT, Rustin P (2014) Engineering the alternative oxidase gene to better understand and counteract mitochondrial defects: state of the art and perspectives. *Brit J Pharmacol* 171: 2243-2249
119. Kakizaki Y, Ito K (2013) Engineering plant alternative oxidase function in mammalian cells: substitution of the motif-like sequence ENV for QDT diminishes catalytic activity of *Arum concinatum* AOX1a expressed in HeLa cells. *Appl Biochem Biotechnol* 170: 1229-1240

Alternative oxidase – never ending story

Bożena Szal , Anna M. Rychter

Department of Plant Anatomy and Cytology, Institute of Experimental Plant Biology and Biotechnology, Faculty of Biology, Warsaw University, 1 Miecznikowa St., 02-096 Warsaw, Poland

 e-mail: szal@biol.uw.edu.pl

Key words: alternative oxidase, cyanide-resistant respiration, plant mitochondrial respiratory chain, alternative pathways in respiration

ABSTRACT

Investigations of plant cyanide resistant respiration lead to the discovery in mitochondrial respiratory chain of the second terminal oxidase, alternative oxidase (AOX). AOX transfers electrons from reduced ubiquinone to oxygen omitting two coupling places thus lowering energetic efficiency of respiration. The presence of AOX was shown in all plants and also in some fungi, mollusca and protista. In termogenic plants the activity of AOX is connected with heat production. In other organisms AOX activity is important for maintaining metabolic homeostasis (carbon metabolism, cell redox state and energy demand) and ROS homeostasis. In this article structure of plant AOX protein and the regulation on molecular levels was described. Possible role of AOX as stress marker was pointed and the possibility of using AOX in human gene therapy was discussed.