

Panu Profesorowi Lechowi Wojtczakowi, Recenzentowi mojej rozprawy doktorskiej i habilitacyjnej, artykuł ten poświęcam wraz z podziękowaniem za zawsze okazaną życzliwość, zainteresowanie i pomoc

LILLA HRYNIEWIECKA

*Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Fredry 10, 61-701 Poznań*

ALTERNATYWNA OKSYDAZA NIEWRAŻLIWA NA CYJANEK

WPROWADZENIE

Podstawową funkcją mitochondriów jest przekształcanie energii potencjału oksydoredukcyjnego w dwie wymienne formy energii swobodnej, wykorzystywane przez komórkę, to jest siłę protonomotoryczną (Δp) i potencjał fosforylacyjny ATP (ΔG_p). Dlatego w skład wewnętrznej błony mitochondrialnej wszystkich organizmów wchodzi kompleksy białkowe przenoszące elektrony z substratów oddechowych do tlenu, a zarazem na koszt energii tego transportu wypompowujące protony z matryks mitochondrialnej. Wytwarzana w następstwie przemieszczania protonów Δp napędza fosforylację oksydacyjną, czyli syntezę ATP, cząsteczki stanowiącej główne źródło energii swobodnej wykorzystywane przez komórki. Ponieważ Δp sprzęga transport elektronów w łańcuchu oddechowym z syntezą ATP, brak możliwości jej wytworzenia prowadzi do rozproszenia energii transportu elektronów, a więc przekształcenia tej energii w ciepło. Mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej ssaków wykorzystują to zjawisko w procesie termogenezy, w którym hormonalnie regulowane białko — termogenina, uniemożliwia wytwarzanie Δp . Natomiast w mitochondriach roślin wyższych (DOUCE i NEUBURGER 1989, MOORE i SIEDOW 1991, RYCHTER 1996) oraz grzybów i pierwotniaków (LLOYD 1974, HENRY i NYNS 1975, DRABIKOWSKA 1978, HRYNIEWIECKA 1993) istnieje nie związana z translokacją protonów droga transportu elektronów, tak zwana droga alternatywna niewrażliwa na cyjanek, której końcowym fragmentem jest oksydaza alternatywna (w odniesieniu do oksydazy cytochromowej).

Oddychanie odporne na cyjanki wykryto u roślin już w 1929 roku (HENRY i NYNS 1975), jednak długo nie wiązano tego zjawiska z oddychaniem mitochondrialnym. Dopiero pod koniec lat sześćdziesiątych rozpoczęto intensywne badania nad drogą alternatywną w mitochondriach, przy czym szczególnie nacisk położono na poznanie czynników kontrolujących jej udział w oddychaniu, co mogłoby pomóc w znalezieniu odpowiedzi na pytanie — jaką rolę pełni w metabolizmie komórki transport elektronów marnotrawiący energię? (RYCHTER 1982, LANCE i współaut. 1985).

Zarówno u roślin wyższych (LANCE i współaut. 1985, RYCHTER 1982), jak i u mikroorganizmów (LLOYD 1974, DRABIKOWSKA 1978) aktywność drogi alternatywnej zależy od gatunku, cyklu rozwojowego i warunków środowiska. W przypadku roślin duże znaczenie ma typ metaboliczny tkanki; w niektórych tkankach alternatywna oksydaza jest enzymem konstytutywnym, w innych indukowanym (MCINTOSH 1994). Aktywację i indukcję drogi alternatywnej obserwowano w ekstremalnie różnych warunkach, na przykład zranienie tkanki, obecność etylenu lub kwasu salicylowego, niska temperatura, nadmiar węglowodanów w komórce, określony etap cyklu rozwojowego (RYCHTER 1982, MCINTOSH 1994, WAGNER 1995). To sugeruje, że droga alternatywna pełni rozmaite funkcje w różnych sytuacjach, co znacznie utrudnia określenie jej uniwersalnej roli fizjologicznej. Wiadomo, że u Araceae droga alternatywna generuje cie-

pło, jednak w mitochondriach mikroorganizmów i większości gatunków roślinnych jej działanie nie jest związane z termogenezą (LANCCE i współaut. 1985).

Próby izolowania alternatywnej oksydazy okazały się mało efektywne, przede wszystkim ze względu na jej błonową lokalizację, stąd pojawiły się hipotezy negujące istnienie enzymu (LANCCE i współaut. 1985). Z powodu trudności z ustaleniem, co jest produktem redukcji tlenu

H₂O czy H₂O₂ lub O₂⁻ sugerowano, że aktywność drogi alternatywnej jest efektem nieenzymatycznej reakcji zachodzącej pomiędzy kwasami tłuszczowymi a nadtlenkowymi rodnikami kwasów tłuszczowych. Sugestię, że droga alternatywna jest oksydazą chinolową przenoszącą elektrony bezpośrednio z ubichinonu do tlenu cząsteczkowego potwierdzono w ostatnich latach dzięki użyciu technik biologii molekularnej (MCINTOSH 1994).

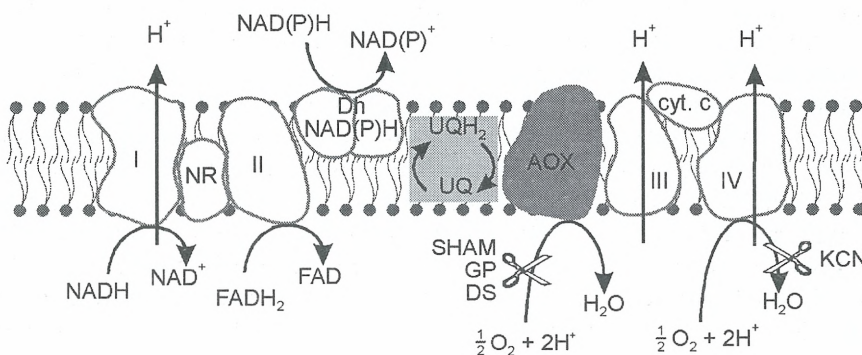
CHARAKTERYSTYKA OKSYDAZY ALTERNATYWNEJ NIEWRAŻLIWEJ NA CYJANKI

Alternatywna oksydaza funkcjonuje we wewnętrznej błonie mitochondrialnej obok oksydazy cytochromowej (rys. 1). Katalizuje ona przeniesienie elektronów z puli ubichinonu bezpośrednio na tlen, stąd niewrażliwa jest na inhibitory drogi cytochromowej — antymycyne A i cyjanek. Oksydaza alternatywna ma mniejsze powinowactwo do tlenu niż oksydaza cytochromowa, ale podobnie jak ta ostatnia redukuje tlen do wody (MOORE i SIEDOW 1991, SIEDOW i UMBACH 1995). Inhibitorami transportu elektronów alternatywnej oksydazy są kwasy hydroksamowe, (np. kwas salicylohydroksamowy — SHAM i kwas benzohydroksamowy — BHAM), galusan n-propylu i disulfiram (MOORE i SIEDOW 1991). Ponieważ alternatywna oksydaza nie generuje Δp , energia utleniania substratów oddających elektrony do ubichinonu z pominięciem kompleksu I a następnie do alternatywnej oksydazy zamienia się w ciepło. Natomiast utlenianie substratów, w którym bierze udział kompleks I jest związane z syntezą 1 cząsteczki ATP (MOORE i SIEDOW 1991).

Próby uzyskania homogennego preparatu alternatywnej oksydazy dotychczas nie powiodły się ze względu na trudności związane z wyod-

rębieniem enzymu z błony i znalezieniem odpowiedniego donora elektronów spośród chinonów do pomiarów kinetycznych *in vitro* (MOORE i SIEDOW 1991, RYCHTER 1996). Metodami biochemicznymi udało się otrzymać częściowo oczyszczone białko tylko z tkanek termogennych *Araceae* (ELTHON i MCINTOSH 1987, BERTHOLD i SIEDOW 1993, MOORE i SIEDOW 1991), niemniej pozwoliło to na uzyskanie dla oksydazy z *Sauromatum guttatum* przeciwciał mono- i poliklonalnych specyficznych wobec trzech polipeptydów o masie 37, 36 i 35 kDa (ELTHON i współaut. 1989a, ELTHON i MCINTOSH 1987). Przeciwciała te reagują krzyżowo ze wszystkimi badanymi roślinami wykazującymi aktywność oksydazy alternatywnej (MCINTOSH 1994) a także z *Neurospora crassa* (LAMBOWITZ i współaut. 1989), *Hansenula anomala* (SAKAJO i współaut. 1991), formą *Trypanosoma brucei* pasożytująca we krwi (CHAUDHURI i współaut. 1995) i amebą *Acanthamoeba castellanii* (JARMUSZKIEWICZ i współaut. 1996). Identyfikacja alternatywnej oksydazy za pomocą przeciwciał przerwała dyskusję — czy oddychanie odporne na cyjanki jest rzeczywiście związane z integralnym białkiem łańcucha oddechowego. Dzięki otrzymaniu

Rys. 1. Schemat łańcucha oddechowego w mitochondriach roślin wyższych.



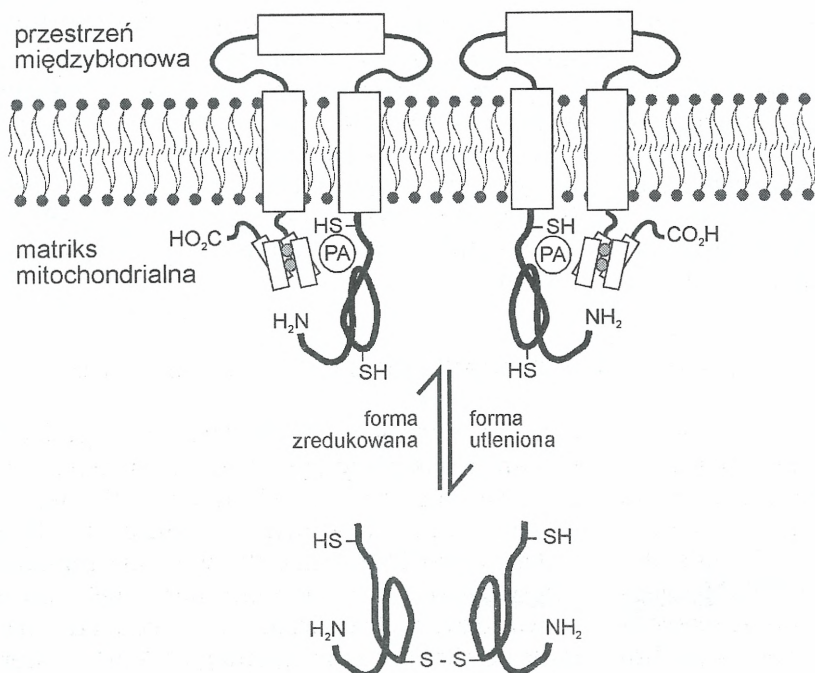
I-IV — kompleksy głównego łańcucha oddechowego (odpowiednio: dehydrogenaza NADH, dehydrogenaza bursztynanowa, kompleks bc₁ i oksydaza cytochromowa), AOX — oksydaza alternatywna, NR — dehydrogenaza matriksowego NADH niewrażliwa na rotenon, Dn NAD(P)H dehydrogenazy cytoplazmatycznego NADH i NADPH, cyt. c — cytochrom c, UQ/UQH₂ — pula utlenionego i zredukowanego ubichinonu. Inhibitory AOX: SHAM — kwas salicylohydroksamowy, GP — galusan n-propylu i DS — disulfiram.

przeciwciał wyizolowano i ustalono sekwencję pojedynczego klonu cDNA dla oksydazy alternatywnej z *S. guttatum* (RHOADS i MCINTOSH 1991), *H. anomala* (SAKAJO i współaut. 1993), *Arabidopsis thaliana* (KUMAR i SOLL 1992) i tytoniu (VANLERBERGHE i MCINTOSH 1994). Pojawienie się trzech prążków na żelu w wyniku immunoelektroforezy wymagało wyjaśnienia, czy otrzymane polipeptydy są produktem trzech genów jądrowych, czy tylko jednego genu, co sugerowano w przypadku mutantu *N. crassa* (LAMBOWITZ i współaut. 1989). Analiza genomu *S. guttatum* (KUMAR i SOLL 1992) i *A. thaliana* (RHOADS i MCINTOSH 1993) przeprowadzona metodą Southern blot wykazała, że alternatywna oksydaza jest produktem jednego genu jądrowego *aox-1*. Ostatnio analiza DNA soi przeprowadzona metodą łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR) wykazała istnienie trzech genów (*aox-1*, *aox-2*, *aox-3*) kodujących alternatywną oksydazę (WHELAN i współaut. 1996). To mogłoby wyjaśnić występowanie trzech form alternatywnej oksydazy o różnym ciężarze cząsteczkowym w mitochondriach *S. guttatum* (ELTHON i współaut. 1989), dwóch w mitochondriach nadziemnych części soi i jednej w mitochondriach korzeni (KEARNS i współaut. 1992). Różnice te tłumaczono dojrzewaniem białka prekursorowego lub jego posttranslacyjnymi modyfikacjami (MOORE i SIEDOW 1991). Jednak badania nad importem białka do mitochondriów izolowanych z różnych tkanek soi nie potwierdziły tych sugestii (WHELAN i współaut. 1995).

Na podstawie sekwencji aminokwasów określonej przez gen *aox-1*, uzyskanej z kilku gatunków roślin i drożdży *H. anomala*, zapro-

ponowano strukturalny model alternatywnej oksydazy (MCINTOSH 1994, MOORE i współaut. 1995). Dojrzałe białko (rys. 2) zawiera dwie hydrofobowe helisy transbłonowe i jedną helisę powierzchniową zlokalizowaną po stronie przestrzeni międzybłonowej. Końce N i C łańcucha polipeptydowego znajdują się po stronie matriks mitochondrialnej. W hydrofilowej domenie przy końcu C mieści się binuklearne centrum żelazowe, które prawdopodobnie jest miejscem aktywnym enzymu odpowiedzialnym za redukcję tlenu. Utlenianie ubiquinolu, zredukowanego substratu alternatywnej oksydazy, mogłoby mieć miejsce w kieszonce utworzonej przez położone najbliżej matriks obszary obu helis transbłonowych i hydrofilową domenę przy końcu C. Za taką koncepcją przemawia obecność konserwatywnych sekwencji aminokwasów w tych fragmentach łańcucha polipeptydowego oraz położenie miejsca utleniania ubiquinolu obok centrum żelazowego.

Alternatywna oksydaza roślin jest dimerem (rys. 2) występującym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej w dwóch formach: utlenionej — nieaktywnej i zredukowanej — aktywnej (MOORE i współaut. 1995). W formie utlenionej dwa łańcuchy polipeptydowe są połączone mostkiem disulfidowym, natomiast w formie zredukowanej grupy sulfhydrylowe nie tworzą wiązania, zatem dimer jest utrzymywany przez oddziaływania niekowalencyjne (MOORE i współaut. 1995). Natomiast w mitochondriach *A. castellanii* dominują pojedyncze polipeptydy w formie zredukowanej, a forma utleniona enzymu (dimer) występuje w niewielkich ilościach (JARMUSZKIEWICZ, wyniki nie publikowane).



Rys. 2. Proponowany model alternatywnej oksydazy.

Zaznaczono reszty cysteinowe -SH przy końcu -N polipeptydu odpowiedzialne za odwracalne tworzenie wiązań disulfidowych w dimerze i reszty cysteinowe położone blisko błony, prawdopodobnie będące miejscem aktywacji enzymu przez α -ketokwasy. PA — hipotetyczne miejsce działania pirogionianu (wg UMBACH i SIEDOW 1996).

REGULACJA PRZEPŁYWU ELEKTRONÓW DO OKSYDAZY CYTOCHROMOWEJ I OKSYDAZY ALTERNATYWNEJ

W łańcuchu oddechowym roślin wyższych z alternatywną oksydazą współpracują kompleksy enzymatyczne (nieobecne w mitochondriach ssaków) (rys. 1) nie związane z translokacją protonów. Są to: dehydrogenaza zewnętrzna NAD(P)H niewrażliwa na rotenon, zlokalizowana po zewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej i utleniająca bezpośrednio cytoplazmatyczny NAD(P)H oraz dehydrogenaza wewnętrzna NADH niewrażliwa na rotenon, umiejscowiona w wewnętrznej błonie mitochondrialnej od strony matriks i utleniająca matriksowy NADH (MOORE i SIEDOW 1991, RYCHTER 1996). Tak rozgałęziony system przenośników elektronów pozwala na zróżnicowanie wydajności energetycznej mitochondriów. Utlenianie matriksowego NADH przebiega więc drogą fosforylującą (kompleks I → oksydaza cytochromowa) z wytworzeniem 3 cząsteczek ATP lub drogą nefosforylującą (dehydrogenaza NADH niewrażliwa na rotenon → oksydaza alternatywna). Utlenianie bursztynianu i egzogenego NADH jest związane z syntezą 2 cząsteczek ATP, gdy końcowym akceptorem elektronów jest oksydaza cytochromowa. W obecności cyjanku elektrony z bursztynianu swobodnie przepływają do alternatywnej oksydazy w sposób nie sprzężony z syntezą ATP, natomiast elektrony z egzogenego NADH mają do niej utrudniony dostęp (MOORE i SIEDOW 1991). Wyjątek stanowią mitochondria termogennych tkanek roślin, w których podczas kwitnienia egzogeny NADH jest utleniany równie aktywnie jak substraty cyklu Krebsa (MOORE i SIEDOW 1991).

Systemy regulujące oddychanie w komórkach roślinnych odzwierciedlają konieczność szybkiego przystosowania się mitochondriów do zmiennych warunków metabolicznych oraz ich współdziałania z innymi organellami przekształcającymi energię, takimi jak chloroplasty i peroksysony. Dlatego poza typowymi czynni-

kami regulującymi aktywność łańcucha oddechowego i fosforylacji oksydacyjnej duże znaczenie ma stopień zaangażowania nefosforylującej drogi alternatywnej w całkowite oddychanie. Do niedawna uważano, że o skierowaniu elektronów na drogę alternatywną decyduje wyłącznie stopień redukcji puli ubichinonu a więc tego fragmentu łańcucha oddechowego, który łączy wszystkie drogi transportu elektronów z dehydrogenaz (redukcja UQ) do oksydaz (utlenianie UQ). Dominująca przez prawie dwadzieścia lat hipoteza BAHRA i BONNERA (1973) zakłada, że droga alternatywna może działać dopiero po wysyceniu elektronami drogi cytochromowej lub po jej zahamowaniu, na przykład przez cyjanek, a więc wtedy, gdy ubichinon zostanie całkowicie zredukowany. Przekonanie o słuszności modelu Bahra i Bonnera utrwalił jeszcze LAMBERS (1982), który dostosował ten model do warunków fizjologicznych i zaproponował hipotezę przelewu (overflow), według której droga alternatywna mogłaby być drogą odpływową odbierającą nadmiar elektronów pochodzących z glikolizy w sytuacji, gdy ilość wytworzonych cukrów przekracza zapotrzebowanie komórki, a pojemność drogi cytochromowej jest ograniczona przez stosunek NAD^+ do NADH i potencjał fosforylacyjny. W miarę postępu badań okazało się, że założenia obu hipotez są tylko częściowo słuszne, a aktywność alternatywnej oksydazy zależy od tak różnych czynników jak: rodzaj utlenianego substratu (MOORE i SIEDOW 1991), stan redoks zarówno puli ubichinonu, jak i alternatywnej oksydazy (SIEDOW i MOORE 1993), kowalencyjne modyfikacje form alternatywnej oksydazy, allosteryczne modulatory (UMBACH i współaut. 1994, MILLAR i współaut. 1996) oraz cały szereg czynników zewnętrznych i wewnętrznych indukujących ekspresję genu alternatywnej oksydazy w odpowiedzi na osłabienie drogi cytochromowej (MCINTOSH 1994, WAGNER i KRAB 1995).

REGULACJA TRANSPORTU ELEKTRONÓW PRZEZ STAN REDUKCJI PULI UBICHINONU

W mitochondriach większości gatunków roślin elektrony z egzogenego NADH, w przeciwieństwie do elektronów z substratów cyklu Krebsa, wykazują o wiele silniejsze powinowactwo do oksydazy cytochromowej niż do oksydazy alternatywnej (MOLLER i LIN 1986, MOORE i SIEDOW 1991). Często obserwowano, że oksydaza alternatywna nie odbiera elektronów pocho-

dzących z egzogenego NADH nawet po zablokowaniu oksydazy cytochromowej przez cyjanek. Natomiast w mitochondriach tkanek termogennych alternatywna oksydaza utlenia egzogeny NADH również aktywnie jak inne substraty. Z kolei w mitochondriach ameby obserwowano sytuację pośrednią; w nieobecności cyjanku elektrony z egzogenego NADH są kiero-

wane wyłącznie na drogę cytochromową, natomiast gdy jest zahamowana droga cytochromowa mają równie swobodny dostęp do alternatywnej oksydazy jak elektrony z substratów cyklu Krebsa (HRYNIEWIECKA 1993).

Zależny od rodzaju substratów, nierównomierny przepływ elektronów przez obie drogi oddechowe początkowo tłumaczono istnieniem niehomogennej puli ubichinonu (DAY i współaut. 1991). Idea kompartmentacji pul ubichinonu (czyli różnych pul) związanych funkcjonalnie z określonymi dehydrogenazami i oksydazami sugerowała odmienne zachowanie się ubichinonu w mitochondriach posiadających alternatywną oksydazę, niż zakłada model KRÖGERA i KLINGENBERGA (1973) opracowany dla mitochondriów zwierzęcych. Według tego modelu ruchoma homogenna pula ubichinonu wykazuje jednakową dostępność dla elektronów ze wszystkich donorów, a kinetyka zależności stanu redoks puli ubichinonu od szybkości oddychania jest liniowa. Tymczasem w mitochondriach roślin zależność pomiędzy aktywnością drogi alternatywnej a stanem redoks ubichinonu jest nieliniowa, a liniową kinetykę wykazuje droga cytochromowa i wyjątkowo droga alternatywna u roślin termogennych (DAY i współaut. 1991, DRY i współaut. 1989).

Mimo że w ostatnich latach zaproponowano szereg modeli kinetycznych, które mogą w dużej mierze przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmu regulacji przepływu elektronów przez rozgałęziony łańcuch oddechowy roślin (KRAB 1995), nadal nie można opracować jednego uniwersalnego modelu. Skoncentrowano się na puli ubichinonu, ale istnieją też inne czynniki kontrolujące oddychanie, takie jak stan ener-

tyczny wewnętrznej błony mitochondrialnej (określony wartością Δp), stężenie tlenu czy dostępność substratów. Bardzo użyteczny okazał się model SIEDOWA i MOORA (1993) oparty na założeniu, że alternatywna oksydaza jest redukowana przez ubichinol w reakcji dwustopniowego przeniesienia czterech elektronów. Szybkość przepływu elektronów przez drogę alternatywną zależy więc nie tylko od stopnia redukcji puli ubichinonu, ale także od stałej równowagi reakcji odwracalnego transportu elektronów, zachodzącej pomiędzy ubichinolem a alternatywną oksydazą. W konsekwencji poziom redukcji ubichinonu wymagany do skierowania elektronów na drogę alternatywną nie musi być stały. Progowa wartość współczynnika Q_r/Q_t , poniżej której nie obserwuje się aktywności drogi alternatywnej może różnić się w zależności od warunków metabolicznych. Tak więc wysycenie elektronami drogi cytochromowej nie jest konieczne do uaktywnienia drogi alternatywnej (DRY i współaut. 1989). Dzięki możliwości monitorowania stanu redoks puli ubichinonu metodą woltametryczną lub ekstrakcji ubichinonu (VAN DEN BERGEN i współaut. 1994) można obecnie bezpośrednio sprawdzać proponowane modele kinetyczne. Pomimo komplikacji wynikających z odmiennej kinetyki obu dróg oddechowych funkcjonujących w jednym łańcuchu oraz z charakteru badanego materiału ostatecznie zaproponowano, że w mitochondriach roślin istnieje homogenna, ruchoma pula ubichinonu zgodnie z modelem Krögera i Klingenberga, który jednak w przypadku rozgałęzionego łańcucha oddechowego należy zmodyfikować, a hipoteza Bahra i Bonnera wymaga ponownego krytycznego rozpatrzenia (KRAB 1995).

REGULACJA AKTYWNOŚCI ALTERNATYWNEJ OKSYDAZY PRZEZ MODULATORY ALLOSTERYCZNE

Z charakterystycznym dla roślin metabolizmem łączy się złożony mechanizm utleniania jabłczanu, w którym biorą udział dwa matriksowe enzymy generujące NADH: dehydrogenaza jabłczanowa (MDH) i enzym jabłczanowy dekarboksylujący, współpracujący z NAD^+ (ME) (DOUCE i NEUBURGER 1989). Przyjęto, że współdziałanie obu tych dehydrogenaz pozwala na całkowite utlenianie wprowadzonego anaplerotycznie jabłczanu, jednakże ostatnio sugeruje się, że obecność ME w matriks mitochondrialnej może być związana z regulacyjną rolą pirogronianu, produktu tego enzymu. Stwierdzono, że w obecności niektórych kwasów organicznych, a szczególnie pirogronianu, drogą alternatywną może funkcjonować przy niskim stosunku UQH_2 do UQ (MILLAR i współaut. 1996). Po

wykluczeniu jakiegokolwiek związku między stymulacyjnym działaniem pirogronianu a metabolizmem kwasów organicznych oraz stwierdzeniu, że pirogronian nie podwyższa stosunku Q_r do Q_t przyjęto, że jest on aktywatorem allosterycznym znoszącym różnice w utlenianiu substratów przez drogę alternatywną, co może mieć duże znaczenie *in vivo* (MILLAR i współaut. 1993). W oparciu o model SIEDOWA i MOOREA (1993) zaproponowano, że pirogronian obniża K_m reakcji zachodzącej pomiędzy alternatywną oksydazą a pulą ubichinonu (DAY i współaut. 1994, SIEDOW i UMBACH 1995). Przypuszczalnie alternatywną oksydazę aktywuje zarówno pirogronian dostarczony z cytoplazmy przez glikolizę, jak i ten wytworzony wewnątrz mitochondriów podczas utleniania jabłczanu i burszty-

nianu (MILLAR i współaut. 1993). Tak więc zjawisko stymulacji aktywności alternatywnej oksydazy przez pirogronian teraz układa się w logiczną całość z kontrowersyjną hipotezą RUSTINA i współautorów (1980), według której niefosforylująca droga utleniania jabłczanu (dehydrogenaza wewnętrzznego NADH niewrażliwa na rotenon → alternatywna oksydaza) jest związana preferencyjnie z ME, a droga fosforylująca (kompleks I → oksydaza cytochromowa) z MDH.

W mitochondriach ameby *A. castellanii*, mimo obecności w łańcuchu oddechowym dehydrogenazy wewnętrzznego NADH niewrażliwej na rotenon, a w matriks mitochondrialnej ME oraz jego produktu — pirogronianu, nie obserwowano ścisłego powiązania pomiędzy ME a drogą alternatywną (HRYNIEWIECKA 1993). Nie stwierdzono także stymulacji drogi alternatywnej przez jabłczan i bursztynian (JARMUSZKIEWICZ i HRYNIEWIECKA 1994).

Obecnie gdy wiadomo, że w mitochondriach roślin pirogronian stymuluje aktywność alternatywnej oksydazy można już wytłumaczyć tę różnicę. W przypadku ameby rolę stymulatorów pełnią 5-monofosforany nukleozydów purynowych, z których najbardziej efektywny jest GMP (HRYNIEWIECKA 1993). Działanie GMP prawdopodobnie polega na zwiększeniu powinowactwa alternatywnej oksydazy do zredukowanego ubichinonu, podobnie jak w przypadku pirogronianu w mitochondriach roślin (JARMUSZKIEWICZ i współaut. 1996). Wyniki pomiarów redukcji puli ubichinonu w mitochondriach ameby potwierdziły wcześniejszą sugestję, że mononukleotydy purynowe działają w mitochondriach mikroorganizmów jako modulatory allosteryczne oksydazy alternatywnej (HRYNIEWIECKA 1993).

REGULACJA AKTYWNOŚCI ALTERNATYWNEJ OKSYDAZY PRZEZ STAN REDUKCJI/UTLENIANIA JEJ DIMERU

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej roślin dimery alternatywnej oksydazy stanowią mieszaną populację nieaktywnych form utlenionych i aktywnych form zredukowanych. Aktywność alternatywnej oksydazy mogłaby być regulowana dzięki odwracalności tworzonego pomiędzy monomerami wiązania disulfidowego (rys. 2). Tak więc przepływ elektronów przez drogę alternatywną byłby zależny nie tylko od stopnia redukcji elektronami puli ubichinonu i alternatywnej oksydazy, ale także od stanu równowagi pary oksydoredukcyjnej: grupa sulfhydrylowa — wiązanie disulfidowe (UMBACH i współaut. 1994). Ponieważ pirogronian nie ma wpływu na tworzenie lub zrywanie wiązań disulfidowych proponuje się, aby aktywatorami alternatywnej oksydazy działającymi bez-

pośrednio na to wiązanie mogłyby być tioredoksyna (UMBACH i SIEDOW 1993) albo NADPH (VANLERBERGHE i współaut. 1995) zlokalizowane w matriks, a pirogronian współdziałałby jako regulator allosteryczny tylko z aktywną formą enzymu (SIEDOW i UMBACH 1995).

Niewiele wiadomo o wpływie kowalencyjnych modyfikacji oksydazy alternatywnej na jej aktywność w mitochondriach mikroorganizmów. U *A. castellanii* występowanie enzymu w postaci zredukowanych monomerów i mała wrażliwość nielicznych utlenionych dimerów na czynniki redukujące mogą świadczyć o braku opisanego powyżej mechanizmu regulacji aktywności alternatywnej oksydazy (JARMUSZKIEWICZ, wyniki nie publikowane).

REGULACJA TRANSPORTU ELEKTRONÓW PRZEZ POZIOM EKSPRESJI GENU(ÓW) ALTERNATYWNEJ OKSYDAZY

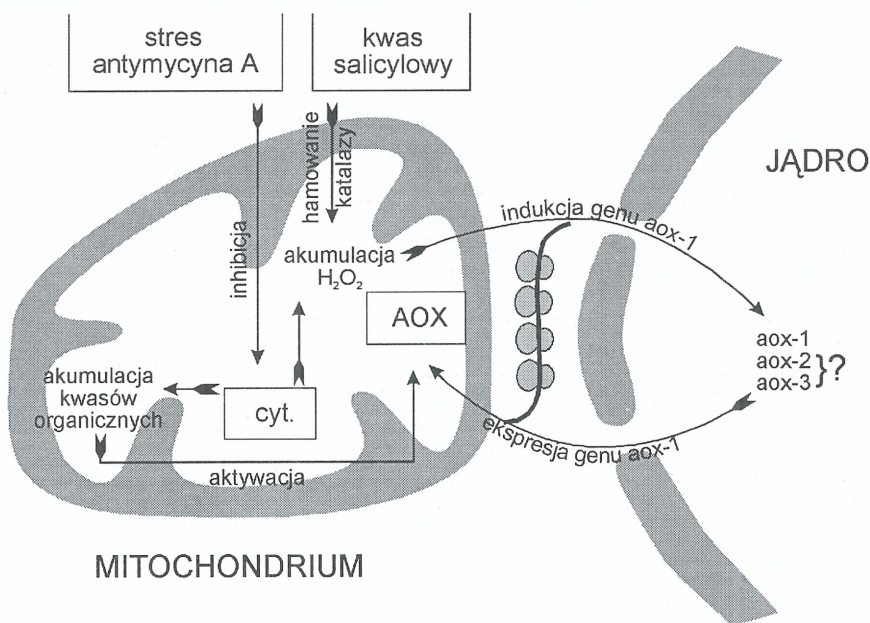
Udział w oddychaniu obu dróg, alternatywnej i cytochromowej, może być regulowany także przez zmiany w ekspresji ich genów skoordynowane z wymaganiami metabolicznymi komórki (MCINTOSH 1994, VANLERBERGHE I MCINTOSH 1996). W tkankach termogennych podczas nasilania się procesu termogenezy (LEACH i współaut. 1996) a w zawieszinie komórkowej tytoniu (VANLERBERGHE i współaut. 1994) i *Petunia hybrida* (WAGNER i współaut. 1992) na skutek obecności antymycyny A w hodowli obserwowano zwiększoną ekspresję genu *aox-1*, związaną z obniżeniem sprawności drogi cyto-

chromowej. Porównanie zużycia tlenu w zawieszinach komórek dzikiego szczepu tytoniu oraz komórek tytoniu transgenicznego zawierających zwiłokrotniony gen *aox-1* i gen bezsensowny wykazało, że alternatywna oksydaza umożliwia oddychanie w przypadku obniżenia sprawności drogi cytochromowej, wynikającego albo z upośledzenia któregoś z przekaźników elektronów albo z ograniczenia, jakie narzuca kontrola ze strony potencjału fosforylacyjnego (VANLERBERGHE i współaut. 1994). Natomiast dodanie kwasu salicylowego do hodowli komórek tytoniu bardzo silnie zwiększa udział drogi

alternatywnej w oddychaniu (oraz ekspresję genu *aox-1*) przy niezmienionej pojemności drogi cytochromowej. W większości przypadków indukcja lub aktywacja alternatywnej oksydazy jest związana jednak z upośledzeniem aktywności drogi cytochromowej. Indukcję ekspresji genu *aox-1* u roślin wywołują różnego rodzaju stresy, takie jak niskie temperatury, zranienie tkanki, brak wody czy nieodpowiednie stężenie soli (MCINTOSH 1994, WAGNER 1995). Wobec sytuacji, w której tak różne przyczyny wywołują jednakowy skutek, powstał problem — skąd i jakie sygnały informujące o ograniczeniu drogi cytochromowej docierają do jądra komórkowego? Ostatnio zaproponowano, że taką rolę mogą pełnić rodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru (WAGNER 1995).

U wielu roślin stwierdzono, że H_2O_2 bierze udział w reakcjach odpornościowych skierowanych przeciwko patogennym mikroorganizmom (CHEN i współaut. 1993). Stężenie H_2O_2 jest regulowane przez kwas salicylowy, który wiążąc się z katalazą hamuje jej aktywność. Kwas salicylowy jest najprawdopodobniej naturalną

cząsteczką sygnałową przekazującą informację dla genów związanych z patogenezą, kodujących układ odporności nabytej. H_2O_2 mogłaby funkcjonować jako sygnał drugiego rzędu dla genów aktywowanych przez różne rodzaje stresu. Połączenie powyższych danych z obserwacją, że kwas salicylowy i H_2O_2 indukują ekspresję genu *aox-1* w roślinach dało w wyniku bardzo interesującą hipotezę, uwzględniającą zarówno aktywację, jak i indukcję alternatywnej oksydazy wywołaną wpływem czynników środowiskowych i wewnątrzkomórkowych upośledzających drogę cytochromową (rys. 3) (WAGNER 1995). Jeżeli stężenie substratów jest zbyt duże dla ograniczonych możliwości osłabionej drogi cytochromowej, gromadzą się kwasy organiczne, a wzrastająca dzięki nim aktywność drogi alternatywnej zapobiega powstawaniu szkodliwych wolnych rodników. W razie niewystarczającej aktywności drogi alternatywnej następuje akumulacja H_2O_2 i O_2^- . Następnie cząsteczki te przechodzą do jądra i indukują ekspresję genu (lub genów) alternatywnej oksydazy.



Rys. 3. Schemat przedstawiający hipotetyczne mechanizmy aktywacji i indukcji alternatywnej oksydazy.

AOX — oksydaza alternatywna, cyt — droga cytochromowa.

UWAGI KOŃCOWE

Wykorzystanie nowych technik do badań nad strukturą oksydazy alternatywnej w mitochondriach roślin wyższych, grzybów i pierwotniaków oraz regulacją jej udziału w oddychaniu, dostarczyło wielu cennych informacji. Mimo to jednoznaczne sprecyzowanie fizjologicznej roli drogi alternatywnej nadal jest trudne ze względu na jej działanie w bardzo odmiennych warunkach. Proponuje się więc podejście do tego problemu z punktu widzenia szeroko poję-

tej regulacyjnej roli alternatywnej oksydazy, a nie tylko jej specyficznych reakcji na określone sytuacje (MCINTOSH 1994). Podsumowanie wszystkich danych uzyskanych dotychczas z różnych źródeł prowadzi do wniosku, że zarówno u roślin, jak i u mikroorganizmów droga alternatywna zwiększa szansę na przetrwanie w warunkach niekorzystnych dla komórki. Obecnie opracowuje się takie metody badawcze, które pozwoliłyby na określenie udziału

drogi alternatywnej w oddychaniu *in vivo* i poznanie rzeczywistej wydajności energetycznej oddychania roślin (MOORE i współaut. 1994, KRAB 1996, RYCHTER 1996). Jednakże prace na materiale roślinnym utrudnia zależność wydajności fosforylacji oksydacyjnej, a więc i aktywno-

ści oksydazy alternatywnej, od fotosyntezy i fotooddychania. Dlatego przydatne w rozwiązywaniu wspomnianych problemów mogą być heterotroficzne pierwotniaki, które reprezentują bardzo prosty układ doświadczalny, jak na przykład *A. castellanii* (HRYNIEWIECKA 1993).

CYANIDE-INSENSITIVE ALTERNATIVE OXIDASE

Summary

The alternative oxidase found in the mitochondria of higher plants and some microorganisms, is an integral inner membrane protein which branches from the main respiratory chain at the level of the ubiquinone pool. Electron flow through this oxidase is not coupled to ATP synthesis, and the enzyme catalyses the reduction of oxygen to water. In recent years much attention was focused upon the regulation and nature of the alternative oxidase. Monoclonal antibodies raised against the alternative oxidase from *S. guttatum* have been shown to cross-react with the alternative oxidase of a wide variety of plant species and a few microorganisms. Alternative oxidase is encoded by nuclear gene(s) and consists, depending on the species, of 1–3 proteins of 32–39 kDa. In plant mitochondria it seems to exist as a dimer which is active in the reduced, noncoval-

ently linked form and inactive in the oxidised, covalently linked form. Extensive kinetic analyses of regulation of the alternative pathway activity suggest that this regulation is determined by the redox poise of the ubiquinone pool, the amount of oxidase protein, the redox status of the alternative oxidase intermolecular sulfhydryl/disulfide system and the activity of the quinone-reducing enzymes. The mechanisms of interplay between all of these various regulatory systems are still not fully understood. In plants and microorganisms the synthesis of alternative oxidase can be induced by a number of treatments. The alternative pathway respiration can be induced in many ways from lowered temperatures to chemical signals, a common factor being here the inhibition of the cytochrome pathway.

LITERATURA

- BAHR J. T., BONER W. D., 1973. *Cyanide-insensitive respiration. II. Control of the alternative pathway*. J. Biol. Chem. 248, 3446–3450.
- BERTHOLD D. A., SIEDOW J., 1993. *Partial purification of the cyanide-resistant alternative oxidase of skunk cabbage (Symlocarpus foetidus) mitochondria*. Plant Physiol. 80, 838–842.
- CHAUDHURI M., AJAYI W., TEMPLE S., HILL C., 1995. *Identification and partial purification of a stage-specific 33 kDa mitochondrial protein as the alternative oxidase of the Trypanosoma brucei bloodstream trypomastigotes*. J. Eur. Microbiol. 42, 467–472.
- CHEN Z., SILVA H., KLESSIG F., 1993. *Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid*. Science 262, 1883–1886.
- DAY A., DRY I. B., SOOLE K. L., WISKICH J. T., MOORE A. L., 1991. *Regulation of alternative pathway in plant mitochondria*. Plant Physiol. 95, 948–953.
- DAY A., MILLAR A. H., WISKICH J. T., WHELAN J., 1994. *Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria*. Plant Physiol. 106, 1421–1427.
- DOUCE R., NEUBURGER M., 1989. *The uniqueness of plant mitochondria*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40, 371–414.
- DRABIKOWSKA A. K., 1978. *Oddychanie niewrażliwe na cyjanek*. Post. Biochem. 24, 59–75.
- DRY B., MOORE A. L., DAY A., WISKICH J. T., 1989. *Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria: nonlinear relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool*. Arch. Biochem. Biophys. 273, 148–157.
- ELTHON T. E., MCINTOSH L., 1987. *Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8399–8403.
- ELTHON T. E., NICKELS R. L., MCINTOSH L., 1989. *Mitochondrial events during development of thermogenesis in Saurogatum guttatum (Schott)*. Planta 180, 82–89.
- HENRY M. P., NYNS E. J., 1975. *Cyanide-insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway*. Sub-Cell. Biochem. 4, 1–65.
- HRYNIEWIECKA L., 1993. *Mitochondria ameby (Acanthamoeba castellanii) łączą energetyczne cechy mitochondriów roślin i zwierząt*. Post. Biol. Komórki. 20, 181–199.
- JARMUSZKIEWICZ W., HRYNIEWIECKA L., 1994. *Regulation of electron flux in the branched respiratory chain in mitochondria of Acanthamoeba castellanii*. Acta Bioch. Polonica 2, 218–220.
- JARMUSZKIEWICZ W., WAGNER A. M., HRYNIEWIECKA L., 1996. *Regulation of the alternative oxidase in amoeba A. castellanii mitochondria*. EBEC Reports 9, 36.
- KEARNS A., WHELAN J., YOUNG S., ELTHON T. E., DAY D., 1992. *Tissue-specific expression of the alternative oxidase in soybean and stratro*. Plant Physiol. 99, 712–717.
- KRAB K., 1995. *Kinetic and regulatory aspects of the function of the alternative oxidase in plant respiration*. J. Bioenerg. Biomembr. 27, 387–396.
- KRÖGER A., KLIGENBERG M., 1973. *The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to the electron-transport activity in the respiratory chain*. Eur. J. Biochem. 34, 358–368.
- KUMAR A. M., SOLI D., 1992. *Arabidopsis alternative oxidase sustains Escherichia coli respiration*. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 10842–10846.
- LAMBERS H., 1982. *Cyanide-resistant respiration: A non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow*. Physiol. Plant 55, 478–485.
- LANCE C., CHAUEAU M., DIZENGREMEL P., 1985. *The cyanide-resistant pathway of plant mitochondria*. [W:] *Encyclopedia of Plant Physiology Higher Plant Cell Respiration*, DOUCE R., DAY D.A., (red.), Berlin-New York: Springer-Verlag. 8, 202–247.
- LAMBOWITZ A. M., SABOURIN J. R., BERTRAND H., NICKELS R., MCINTOSH L., 1989. *Immunological identification of the alternative oxidase of Neurospora crassa mitochondria*. Mol. Cell. Biol. 9, 1362–1364.
- LEACH G. R., KRAB K., WHITEHOUSE D. G., 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.

- LLOYD D., 1974. *The mitochondria of microorganisms*. Academic Press, London-New-York.
- MCINTOSH L., 1994. *Molecular biology of the alternative oxidase*. *Plant Physiol.* 105, 781-786.
- MILLAR A. H., HOEFNAGEL M. H. N., DAY D. A., WISKICH J. T., 1996. *Specificity of the organic acid activation of alternative oxidase in plant mitochondria*. *Plant Physiol.* 111, 613-618.
- MILLAR A. H., WISKICH J. T., WHELAN J., DAY D. A., 1993. *Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria*. *Fed. Europ. Biochem. Societ.* 329, 259-262.
- MOLLER I. M., LIN W., 1986. *Membrane-bound NAD/P/H dehydrogenases in higher plant cells*. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37, 309-334.
- MOORE A. L., SIEDOW J. M., 1991. *The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria*. *Biochim. Biophys. Acta* 1059, 121-140.
- MOORE A. L., UMBACH A. L., SIEDOW J. N., 1995. *Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: a model of the active site*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 367-377.
- RHOADS D. M., MCINTOSH L., 1991. *Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott)*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 2122-2126.
- RHOADS D. M., MCINTOSH L., 1993. *Cytochrome and alternative pathway respiration in tobacco. Effect of salicylic acid*. *Plant Physiol.* 103, 877-883.
- RUSTIN P., MOREAU F., LANCE C., 1980. *Malate oxidation in plant mitochondria via malic enzyme and the cyanide-insensitive electron transport pathway*. *Plant Physiol.* 66, 457-462.
- RYCHTER A. M., 1982. *Alternatywna droga oddechowa w roślinach wyższych*. *Post. Biochem.* 28, 89-111.
- RYCHTER A. M., 1996. *Roślinny łańcuch oddechowy*. *Post. Biochem.* 42, 268-276.
- SAKAJO S., MINAGAWA N., KOMIYAMA T., YOSHIMOTO A., 1991. *Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala**. *Bioch. Biophys. Acta* 1090, 102-108.
- SAKAJO S., MINAGAWA N., YOSHIMOTO A., 1993. *Characterization of the alternative oxidase protein in the yeast *Hansenula anomala**. *FEBS Lett.* 318, 310-312.
- SIEDOW J. M., MOORE A. L., 1993. *A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria*. *Bioch. Biophys. Acta* 1142, 165-174.
- SIEDOW J. N., UMBACH A. L., 1995. *Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology*. *Plant Cell* 7, 821-831.
- UMBACH A. L., 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.
- UMBACH A. L., WISKICH J. T., SIEDOW J. N., 1994. *Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria*. *FEBS Lett.* 348, 181-184.
- VAN DEN BERGEN C. W. M., WAGNER A. M., KRAB K., MOORE A. L., 1994. *The relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool in plant mitochondria. Interplay between quinol-oxidizing and quinone-reducing pathways*. *Eur. J. Biochem.* 226, 1071-1078.
- VANLERBERGHE G. C., DAY D. A., WISKICH J. T., VANLERBERGHE A. E., MCINTOSH L., 1994. *Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria. Dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation*. *Plant Physiol.* 109, 353-361.
- VANLERBERGHE G. C., MCINTOSH L., 1994. *Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression. Studies with the alternative oxidase gene of tobacco*. *Plant Physiol.* 105, 867-874.
- VANLERBERGHE G. C., MCINTOSH L., 1996. *Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria*. *Plant Physiol.* 111, 589-595.
- WAGNER A. M., VAN EMMERIK W. A. M., ZWIERS J. H., KAAGMAN H. M. C. M., 1992. *Energy metabolism of *Petunia hybrida* cell suspensions growing in the presence of antimycin A*. [W:] *Molecular, Biochemical and Physiological Aspects of Plant Respiration*, LAMBERS H., VAN DER PLAS L. H. W. (red), Academic Press, The Hague, The Netherlands, 609-614.
- WAGNER A. M., 1995. *A role active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells*. *FEBS Letters* 368, 339-342.
- WAGNER A. M., KRAB K., 1995. *The alternative respiration pathway in plants: Role and regulation*. *Physiol. Plant.* 95, 318-325.
- WHELAN J., HUGOSSON M., GLASER E., DAY D. A., 1995. *Studies on the import and processing of the alternative oxidase precursor by isolated soybean mitochondria*. *Plant Mol. Biol.* 27, 769-778.
- WHELAN J., MILLAR A. H., DAY D. A., 1996. *The alternative oxidase is encoded in a multigene family in soybean*. *Planta* 198, 197-201.