

MONIKA OSTASZEWSKA-BUGAJSKA, ANNA PODGÓRSKA,
ANNA M. RYCHTER, BOŻENA SZAL

*Zakład Anatomii i Cytologii Roślin
Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
E-mail: szal@biol.uw.edu.pl*

ROŚLINNY MITOCHONDRIALNY ŁAŃCUCH ODDECHOWY

WSTĘP

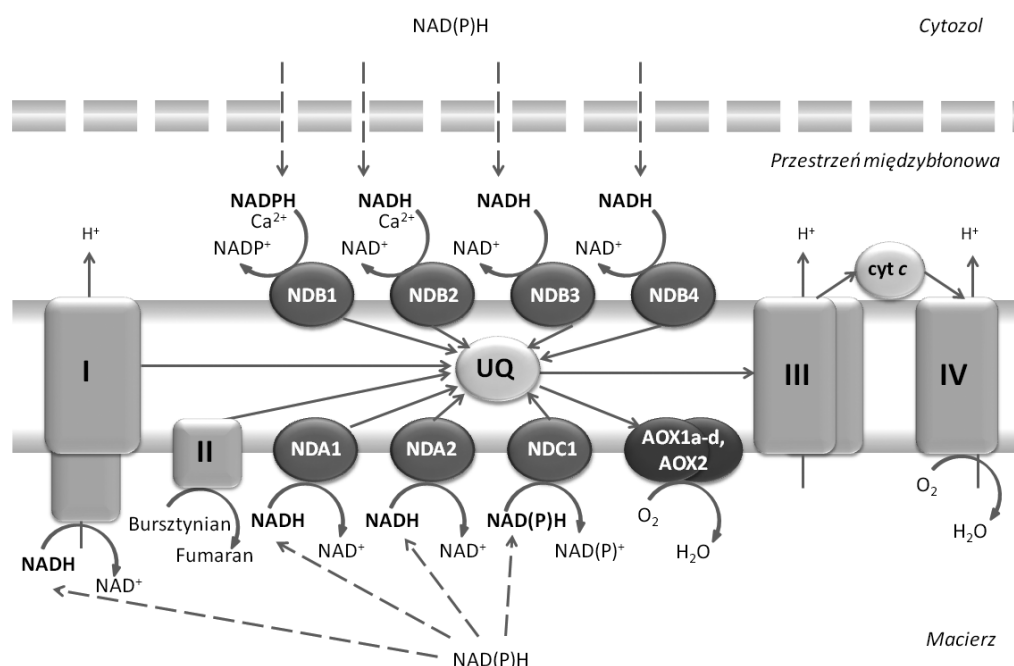
Badanie oddychania roślin stanowiło wyzwanie dla naukowców od początku XX w. Kwestionowano oddychanie na świetle oraz zastanawiano się nad lokalizacją komórkową i rolą tzw. oddychania odporne- go na działanie cyjanku. Izolacja mitochondriów roślinnych jest trudniejsza niż mitochondriów zwierzęcych, ze względu na konieczność rozbicia ściany komórkowej i obecność chloroplastów. Dlatego wcześniej wyizolowano mitochondria zwierzęce i poznano budowę tzw. łańcucha oddechowego zlokalizowanego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

Mitochondrialny łańcuch oddechowy (mtETC) wszystkich organizmów wyższych zbudowany jest z dużych kompleksów białkowych (Kompleksów I-IV) zawierających centra redoks, które umożliwiają transport elektronów z NAD(P)H i FADH₂ na tlen z wytworzeniem cząsteczki wody. Linearny transport elektronów przez transmembranowe Kompleksy I, III i IV związany jest z przemieszczaniem protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej (Ryc. 1) i prowadzi do wytworzenia siły protono-

motorycznej wykorzystywanej do produkcji ATP przez syntazę ATP (tzw. Kompleks V w mtETC). Roślinny łańcuch oddechowy, w odróżnieniu od łańcucha oddechowego mitochondriów zwierzęcych, jest bardziej rozgałęziony i zawiera zarówno dodatkowe dehydrogenazy działające równolegle z Kompleksem I, tzw. dehydrogenazy NAD(P)H typu II (ND), jak i dodatkową, terminalną oksydazę nazwaną oksydazą alternatywną (AOX) odpowiedzialną za oddychanie niewrażliwe na cyjanek. W przeciwieństwie do „klasycznych” elementów mtETC, specyficzne dla roślin składniki mtETC są niewielkimi białkami, a ich aktywność nie prowadzi do wytworzenia siły protonomotorycznej. Są zatem szlakami niefosforylującymi (ang. non-phosphorylating bypasses). Budowa, regulacja aktywności i fizjologiczna rola alternatywnych szlaków transportu elektronów w roślinnym mtETC od wielu już lat stanowi istotną część badań dotyczących metabolizmu roślin. Artykuł ten jest poświęcony głównie omówieniu typowych dla roślin, alternatywnych dróg transportu elektronów w łańcuchu oddechowym.

Materiały do pracy zostały zebrane i opracowane w ramach projektów badawczych finansowanych przez NCN: nr N N303 800240 (M.O.-B.) oraz PRELUDIUM nr N NZ3 02953 (A. P.).

Słowa kluczowe: oksydaza alternatywna, dehydrogenazy typu II, mitochondria roślinne, oddychanie cyjanoodporne, szlaki alternatywne w roślinnym mtETC



Ryc. 1. Mitochondrialny łańcuch oddechowy u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*).

DEHYDROGENAZY TYPU II JAKO AKCEPTORY ELEKTRONÓW ROŚLINNYM mtETC

W latach 60. ubiegłego wieku odkryto kilka niezwykle cich mitochondriów roślinnych. Przede wszystkim udowodniono, że w przeciwieństwie do mitochondriów zwierzęcych, mogą one utleniać dodane z zewnątrz, egzogenne, NADH. Ponadto, wykorzystując specyficzne inhibitory Kompleksu I (m. in. rotenon, piericydynę A i kapsaicynę) wykazano, że mitochondria roślinne mogą również utleniać NADH pochodzące z macierzy mitochondrialnej bez udziału Kompleksu I (MØLLER 2001; RASMUSSEN i współaut. 2004, 2008).

Dehydrogenazy typu II to polipeptydy o masie 50-60 kDa, tworzące oligomery, które są zakotwiczone w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (RASMUSSEN i współaut. 2004). Na podstawie badań z wykorzystaniem wyizolowanych mitochondriów lub frakcji mitochondrialnych stwierdzono, że istnieją cztery typy dehydrogenaz typu II. Wyróżnia się dwie zewnętrzne dehydrogenazy typu II (NDex), które są akceptorami elektronów z NADH lub NADPH pochodzących z przestrzeni międzybłonowej, oraz dwie wewnętrzne dehydrogenazy typu II (NDin) utleniające NADH lub NADPH zlokalizowane

na terenie macierzy mitochondrialnej (Ryc. 1). Powinowactwo dehydrogenaz typu II do NAD(P)H jest ok. dziesięciokrotnie niższe niż Kompleksu I (80 μ M *versus* 8 μ M) (RASMUSSEN i MØLLER 1991). Dlatego też, aktywność dehydrogenaz typu II staje się istotna dla metabolizmu roślinnego dopiero w warunkach, gdy dochodzi do nagromadzenia siły redukcyjnej w macierzy mitochondrialnej lub cytozolu. Obecność NDex/in po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej sugeruje udział tych elementów mtETC w regulacji stanu redoks zarówno wewnątrz mitochondriów, jak i w cytozolu. Charakterystyczną właściwością ND jest też fakt, że, w przeciwieństwie do aktywności Kompleksu I (MØLLER 2001), ich aktywność nie jest związana z wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (ROS). Ponadto sugeruje się, że dehydrogenazy typu II zlokalizowane od strony macierzy mitochondrialnej mogą wytwarzać NAD(P)⁺ niezbędne do reakcji zachodzących wewnątrz mitochondriów (RASMUSSEN i współaut. 2008).

Spekuluje się, że dehydrogenazy typu II wyewoluowały z bakteryjnych FAD-zależnych oksydoreduktaz NAD(P)H: dwusiarczek (RA-

Tabela 1. Izoformy dehydrogenaz typu II zidentyfikowane u różnych gatunków roślin.

Gatunek	NDA	NDB	NDC	Piśmiennictwo
<i>Solanum tuberosum</i>	NDA1	NDB1		RASMUSSEN i współaut. 1999
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NDA1-2,	NDB1-4	NDC1	MICHAŁECKA i współaut. 2003
<i>Oryza sativa</i>	NDA1-2	NDB1-3	NDC1	MICHAŁECKA i współaut. 2003
<i>Physcomitrella patens</i>	NDA1-2	NDB1-3	NDC1	CARRIE i współaut. 2008
<i>Vitis vinifera</i>	NDA1-2	NDB1-3	NDC1	XU i współaut. 2013
<i>Actinida deliciosa</i>	NDA1	NDB1-3		CARRIE i współaut. 2008
<i>Zea mays</i>	NDA1-2	NDB1-4	NDC1	CARNEVALI i DE SANTIS 2009
<i>Selaginella moellendorffii</i>	NDA1	NDB1	NDC1	XU i współaut. 2013
<i>Glycine max</i>	NDA1-6	NDB 1-7	NDC1-2	XU i współaut. 2013
<i>Picea glauca</i>	NDA1	NDB1	NDC1	XU i współaut. 2013
<i>Populus trichocarpa</i>	NDA1-2	NDB1-5	NDC1	XU i współaut. 2013

SMUSSEN i współaut. 1999, KERSCHER 2000). Geny kodujące ND zostały po raz pierwszy scharakteryzowane u *E. coli*, drożdży oraz grzybów *Neurospora crassa* (KERSCHER 2000, MOORE i współaut. 2003). Co ciekawe, u drożdży nie posiadających Kompleksu I jedna z dehydrogenaz typu II przejmuje jego funkcję (MOORE i współaut. 2003). Pierwsze roślinne izoformy dehydrogenaz typu II, *NDA1* i *NDB1*, zostały zidentyfikowane u ziemniaka (RASMUSSEN i współaut. 1999). Następnie znaleziono homologię tych białek u rzodkiewnika (*Arabidopsis*) oraz w ryżu (MICHAŁECKA i współaut. 2003, MOORE i współaut. 2003). Wszystkie izoformy ND są kodowane przez geny jądrowe (MOORE i współaut. 2003). Po analizie filogenetycznej geny te zostały podzielone na trzy grupy: *NDA*, *NDC* kodujące NDin oraz *NDB* kodujące NDex (MICHAŁECKA i współaut. 2003). Roślinne geny *NDA* oraz *NDB* są blisko spokrewnione z genami grzybów, natomiast geny kodujące *NDC* są spokrewnione z genami cyjanobakterii. U *Arabidopsis* zidentyfiko-

wano siedem izoform dehydrogenaz typu II, *NDA1-2*, *NDB1-4* oraz *NDC1* (MOORE i współaut. 2003) (Ryc. 1). Wszystkie izoformy ND akceptują elektrony z NADH, za wyjątkiem izoformy *NDB1*, dla której donorem elektronów jest NADPH. Izoforma *NDC1* wykazuje powinowactwo zarówno do NADH, jak i do NADPH. Wykazano również, że aktywność *NDB1* i *NDB2* jest regulowana przez jony wapnia (GEISLER i współaut. 2007). U rzodkiewnika spośród wszystkich izoform dehydrogenaz typu II *NDA1* i *NDB2* wykazują konstytutywnie najwyższą ekspresję (ELHAFEZ i współaut. 2006), natomiast izoforma *NDB3* wykazuje najniższy poziom ekspresji (MICHAŁECKA i współaut. 2003, ELHAFEZ i współaut. 2006). *NDB1* i *NDC1* są uznawane jako geny cytohomeostatyczne (ang. housekeeping genes), ponieważ ich ekspresja w większości komórek roślinnych jest stosunkowo stała i niezależna od warunków (ELHAFEZ i współaut. 2006). Izoformy ND zidentyfikowane w innych gatunkach roślin zostały wyszczególnione w Tabeli 1.

REGULACJA AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZ TYPU II

Dehydrogenazy typu II mają dwa miejsca wiązania nukleotydów. W pierwszym najprawdopodobniej dochodzi do niekonwalencyjnego wiązania kofaktora FAD, jako grupy prostetycznej niezbędnej w reakcji redoks, w drugim centrum aktywnym enzymu wiązany jest substrat NAD(P)H (KERSCHER 2000). Aktywność ND zależy przede wszystkim od dostępności substratu. NDex zużywają NAD(P)H pochodzące z przestrzeni

międzybłonowej. Trzeba jednak pamiętać, że pory w zewnętrznej błonie mitochondrialnej pozwalają na swobodne przemieszczanie się nukleotydów pomiędzy przestrzenią międzybłonową a cytozolem. NDex konkurują zatem o reduktanty z innymi enzymami zlokalizowanymi na terenie cytozolu, m.in. z reduktazą azotanową (NR) mającą wyższe powinowactwo do NADH ($K_m = 5 \mu M$) (ESCOBAR i współaut. 2006). Dodat-

kowo, aktywność głównych izoform NDex: NDB1 i NDB2, jest zależna od obecności Ca^{2+} w stężeniu mikromolarnym (GEISLER i współaut. 2007). Wzrost stężenia Ca^{2+} w cytozolu stwierdzony podczas działania różnych czynników stresowych (LOGAN i KNIGHT 2003), może aktywować NDex. NDin konkurują z Kompleksem I o NAD(P)H obecne w macierzy mitochondrialnej, przy czym Kompleks I ma znacznie wyższe powinowactwo do substratu (RASMUSSEN i MØLLER 1991). NAD(P)H w mitochondriach wytwarzane jest głównie w cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA).

Aktywność dehydrogenaz typu II zależy w pewnym stopniu od dostępności akceptora elektronów, którym jest ubiquinon (UQ) (RASMUSSEN i współaut. 2008). W warunkach kiedy potencjał elektrochemiczny jest wysoki (nagromadzenie protonów) ND mogą być aktywne w przeciwieństwie do Kompleksu I, którego aktywność podlega zahamowaniu. *In vivo* aktywność ND

jest również zależna od pH (RASMUSSEN i współaut. 2004), przy czym poszczególne izoformy dehydrogenaz typu II w różnym stopniu reagują na zmianę pH. Szczególnie wrażliwa na alkalizację jest forma NDB1; nawet niewielki wzrost pH prowadzi do zahamowania aktywności tego enzymu (GEISLER i współaut. 2007). Zmiany w pH cytozolu roślin, wynikające z działania różnych czynników takich jak: wysokie światło, hipoksja, pobieranie różnych jonów ze środowiska (FELLE 2001), mogą modulować aktywność NDex (GEISLER i współaut. 2007). Aktywność dehydrogenaz typu II jest również zależna od fotoperiodu. Wykazano m.in., że indukcja ekspresji *NDA1* i *NDC1* następuje pod wpływem światła (MICHAŁEKA i współaut. 2003, ESCOBAR i współaut. 2004). Stwierdzono również, że główne izoformy dehydrogenaz – *NDA1* i *NDB2* wykazują rytm dobowy i są indukowane podczas pierwszych godzin oświetlania (EL-HAFEZ i współaut. 2006).

BADANIE AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZ TYPU II

Badania dehydrogenaz typu II utrudniają ich występowanie w niewielkiej ilości w błonach mitochondrialnych (RASMUSSEN i współaut. 2004). Pomiar aktywności ND jest możliwy w izolowanych mitochondriach na podstawie rejestrowania szybkości zużycia tlenu lub utleniania NAD(P)H. W badaniach tych często wykorzystuje się egzogeny akceptor elektronów jakim jest dodecyl-UQ (MICHAŁEKA i współaut. 2004). Pomiar aktywności zewnętrznych dehydrogenaz typu II jest prostszy, ponieważ zewnętrzna błona mitochondrialna nie ogranicza dostępności substratów. Warunkiem koniecznym do prawidłowego badania aktywności NDex jest uzyskanie mitochondriów posiadających integralne błony. Aktywność NDin można oznaczyć po osmotycznej dezintegracji wewnętrznej błony mitochondrialnej lub wykorzystując pęcherzyki z błon mitochondrialnych wywiniete „na drugą stronę” metodą sonikacji (RASMUSSEN i współaut. 2004). Mniej inwazyj-

nym podejściem jest zastosowanie peptydu, alametycyny A, który tworzy kanały jonowe w błonie mitochondrialnej (JOHANSSON i współaut. 2004) i umożliwia dostęp substratu, (NAD(P)H), do enzymu. Trudnością w badaniu aktywności NDin jest rozdzielenie ich aktywności od aktywności zarówno NDex, jak i Kompleksu I. Jednak stosując specyficzne inhibitory można pośrednio wnioskować o aktywności poszczególnych dehydrogenaz mtETC. Kompleks I można zahamować stosując np. rotenon (RASMUSSEN i MØLLER 1991). Inhibitorami zewnętrznych dehydrogenaz typu II są: platanetina (flawon 3,5,7,8-tetrahydroksy,6-izoprenylu) izolowana z platanów oraz difenylojodonian (RASMUSSEN i MØLLER 1991). Obydwa rodzaje dehydrogenaz typu II są hamowane przez dikumarol i mersalyl (RASMUSSEN i MØLLER 1991), jednak do tej pory nie znaleziono specyficznych inhibitorów NDin.

AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZ TYPU II A METABOLIZM KOMÓREK ROŚLINNYCH

Fakt, że istnieją różne rodzaje dehydrogenaz typu II, które są w odmienny sposób

regulowane sugeruje, że mogą mieć one odrębne funkcje. Aktywność ND jest na pew-

no kluczowym elementem sprawnego funkcjonowania roślinnego mtETC, szczególnie, jak wspomniano powyżej, funkcjonowania mtETC w warunkach stresowych. Aktywność NDex/in jest również istotna dla optymalizacji procesu fotosyntezy (ESCOBAR i współaut. 2004). W warunkach, gdy dochodzi do nadprodukcji NAD(P)H w chloroplastach (co mogłoby prowadzić w konsekwencji do fotoinhibicji), reduktanty są eksportowane z chloroplastów, a ich nadmiar jest utleniany w mtETC (DINAKAR i współaut. 2010). Szczególne znaczenie w interakcji chloroplastów z mitochondriami przypisuje się NDA1 (ELHAFFEZ i współaut. 2006). Homolog *NDC1* został odkryty również w chloroplastach, jednak znaczenie jego obecności w tym kompartmentie komórkowym jest nieznane (CARRIE i współaut. 2008). Wyniki niektórych badań wskazują także, że inne izoformy dehydrogenaz typu II mogą również wykazywać podwójną lokalizację (XU i współaut. 2013).

Ponadto, NDin są odpowiedzialne za utlenianie części NADH powstałego w mitochondriach w procesie fotooddychania (RASMUSSEN i współaut. 2004). Wykazano m.in., że w warunkach stresu chłodu, gdy następuje zahamowanie procesu fotooddychania, poziom białka oraz ekspresji *NDA1* był znacznie niższy niż w warunkach kontrolnych (SVENSSON i współaut. 2002). Aktywność ND w znacznym stopniu bilansuje również zmienne zapotrzebowanie na reduktanty wynikające z żywienia azotanowego lub amonowego (SZAL i PODGÓRSKA 2012). W warunkach żywienia azotanowego NDex konkurują z reduktazą azotanową o elektrony z NAD(P)H. Podczas hodowli roślin na jonach amonowych NDex są odpowiedzialne za zużywanie nadmiaru

NAD(P)H z cytozolu, przeciwdziałając stresowi redukcyjnemu (ESCOBAR i współaut. 2006). Dodatkowo, podczas żywienia amonowego gdy w cyklu TCA jest produkowany 2-oksoglutaran niezbędny do wbudowania jonów amonowych w struktury aminokwasów, jednocześnie może zachodzić do wytworzenia dużych ilości NADH w macierzy mitochondrialnej (SZAL i PODGÓRSKA 2012). W tych warunkach NDin jest odpowiedzialne za utlenienie nadmiaru reduktantów w mitochondriach (ESCOBAR i współaut. 2006). W dotychczasowych badaniach udowodniono, że dochodzi do indukcji ekspresji *NDB1* (PODGÓRSKA i współaut. 2013) i *NDA2* (ESCOBAR i współaut. 2006) podczas żywienia amonowego oraz spadku ekspresji *NDB2* i *NDB4* u roślin traktowanych jonami azotanowymi (ESCOBAR i współaut. 2006).

ND mają kluczowe znaczenie dla stabilizacji homeostazy redoks przeciwdziałając nadprodukcji ROS, szczególnie podczas działania niekorzystnych warunków na rośliny. Stwierdzono, że pod wpływem różnych warunków stresowych najczęściej indukowaną izoformą ND jest *NDB2*. W 36 z 38 wypadków traktowania roślin czynnikiem stresowym dochodziło do podwyższenia ekspresji *NDB2* (CLIFTON i współaut. 2005, 2006). Po działaniu abiotycznymi czynnikami stresowymi takimi jak: wysokie natężenie światła (ESCOBAR i współaut. 2004), chłód (SVENSSON i współaut. 2002), żywienie amonowe (ESCOBAR i współaut. 2006, PODGÓRSKA i współaut. 2013) zarejestrowano indukcję aktywności lub ekspresji NDin/ex. Jednak badania dotyczące dehydrogenaz typu II są nieliczne, w porównaniu do wiedzy na temat AOX (RASMUSSEN i współaut. 2009).

WPŁYW ZMIAN EKSPRESJI DEHYDROGENAZ TYPU II NA METABOLIZM ROŚLIN

Działanie dehydrogenaz typu II jest ściśle powiązane z homeostazą redoks komórek roślinnych. Dlatego też rośliny z wyciszoną ekspresją zewnętrznych lub wewnętrznych dehydrogenaz mają podwyższony stan redoks (stosunek NAD(P)H/NADP⁺) w tkankach (MICHAŁECKA i współaut. 2004; WALLSTRÖM i współaut. 2014a, b). Wyciszenie ekspresji wewnętrznej dehydrogenazy *NDA1* u *Arabidopsis* powoduje indukcję ekspresji *NDA2*, prawdopodobnie jako efekt kompensacyjny (MOORE i współaut. 2003). Natomiast wyciszenie ekspresji dwóch izoenzymów *NDA1* i

NDA2 u rzodkiewnika powoduje zmiany w aktywności cyklu TCA i w konsekwencji słabszy wzrost mutantów (WALLSTRÖM i współaut. 2014b). Nie stwierdzono natomiast wpływu defektu *NDA1/2* na fotosyntezę ani na pojemność AOX (WALLSTRÖM i współaut. 2014b).

Wyciszenie ekspresji zewnętrznej dehydrogenazy *NDB1* u rzodkiewnika i tytoniu jest skorelowane głównie ze zmianami w metabolizmie cukrów i również prowadzi do obniżenia wzrostu mutantów (LIU i współaut. 2008, WALLSTRÖM i współaut. 2014a). Co ciekawe, nie stwierdzono wpływu defektu

NDB1 na fotosyntezę. Transgeniczne rośliny tytoniu z nadekspresją *NDB1* wykazują indukcję *AOX*, co sugeruje współzależność tych dwóch komponentów alternatywnych szlaków transportu elektronów w *mtETC* (MICHAŁECKA i współaut. 2004, LIU i współaut. 2008). Wyciszenie ekspresji izoformy *NDB4* u *Arabidopsis* wywołuje indukcję *NDB2* oraz

wzrost pojemności szlaku *AOX*, jednak zaobserwowano tylko niewielkie zmiany w rozwoju tych roślin (SMITH i współaut. 2011). Dotychczas nie uzyskano mutantów z wyciszoną ekspresją głównej izoformy *NDex NDB2*; prawdopodobnie taka dysfunkcja jest letalna (SMITH i współaut. 2011).

OKSYDAZA ALTERNATYWNA – ODDYCHANIE NIEWRAŻLIWE NA CYJANEK

Na początku XX w. zaobserwowano, że oddychanie tkanek roślinnych nie jest całkowicie hamowane przez inhibitory oksydazy cytochromowej (*COX*), takie jak cyjanek, tlenek węgla i azydek, które dla ssaków stanowią truciznę. Obserwacja ta po wielu latach badań doprowadziła do odkrycia, że oddychanie niewrażliwe na cyjanek związane jest z obecnością w łańcuchu oddechowym odgałęzienia na poziomie ubichinonu i aktywnością dodatkowej oksydazy terminalnej (w odniesieniu do oksydazy cytochromowej), tzw. oksydazy alternatywnej (*AOX*). Obecnie wiadomo, że oddychanie cyjanoodporne jest typowe i powszechne w świecie roślin, ale nie jest unikatowe dla tego królestwa. Geny kodujące *AOX* występują u grzybów, protistów i eubakterii. Ponadto, analizy bioinformatyczne wskazują na występowanie *AOX* u niektórych przedstawicieli królestwa zwierząt, między innymi mięczaków, nicieni, parzydełkowców, gąbek, pierścienic, szkarłupni i strunowców (MCDONALD i współaut. 2009).

U gatunków roślin z rodziny *Araceae* (obrazkowatych) w okresie kwitnienia zaobserwowano wzrost temperatury kwiatostanów. Dzięki wydzielaniu ciepła (termogenezie) u obrazkowatych różnica między otoczeniem

a temperaturą kwiatostanu może dochodzić nawet do 20°C. Wyższa temperatura chroni pyłek w trakcie dojrzewania przed uszkodzeniami, które mogłyby spowodować chłód, oraz ułatwia dyfuzję i rozprzestrzenianie się w powietrzu cząsteczek zapachu wabiącego owady pośredniczące w zapylaniu kwiatów tych roślin (VANLERBERGHE 2013). Obecnie wiadomo, że wydzielanie ciepła przy znacznym wzroście oddychania związane jest z aktywnością *AOX*, która przekazuje elektrony z ubichinonu na tlen, z pominięciem dwóch miejsc sprzężenia związanych z generowaniem gradientu protonowego, a zgromadzona energia jest rozpraszana w postaci ciepła. W okresie kwitnienia w organach generatywnych u obrazkowatych oddychanie jest bardzo intensywne i niemal wszystkie elektrony z *UQ* kierowane są na *AOX*. Jednak u większości roślin, ze względu na dużo niższy poziom oddychania i aktywności *AOX*, ciepło wydzielone na skutek rozpraszania energii jest zbyt małe, aby miało znaczenie fizjologiczne (MILLENAAR i LAMBERS 2003). Powszechnie występowanie *AOX* u roślin jest związane zatem z jej innymi funkcjami omówionym dalej.

STRUKTURA BIAŁKA AOX

Białko *AOX* występuje u wszystkich roślin wyższych i jest znajdowane we wszystkich typach tkanek w wewnętrznej błonie mitochondrialnej od strony macierzy mitochondrialnej. Jest to białko homodimeryczne o masie około 70 kDa zbudowane z monomerów o masie około 35 kDa, połączonych odwracalnie za pomocą mostka dwusiarczkowego (MOORE i współaut. 2013). Oksydaza alternatywna zaliczana jest do rodziny dwużelazowych białek karboksylowych typu R2. Wy-

stępowanie niehemowego żelaza w centrum aktywnym *AOX* na C-końcu α -helisy łańcucha polipeptydowego potwierdziły niedawne badania pierwszej struktury krystalicznej *AOX* otrzymanej z pasożyta *Trypanosoma brucei* (SHIBA i współaut. 2013). Miejsce potencjalnego wiązania *UQ* znajduje się w regionie wewnątrzłonowej helisy łączącej oba końce białka. N-końiec białka w pozycji 78 po stronie macierzy mitochondrialnej zawiera natomiast konserwowane reszty cysteinowe

nazywane miejscem Cys₁ (Cys-127 w AOX1a u *Arabidopsis*), które uczestniczą w tworzeniu labilnych mostków dwusiarczkowych, a tym samym w powstawaniu dimerycznej struktury AOX. Domeny zawierające reszty

cysteinowe są także zaangażowane w wiązanie pirogronianu i innych α -ketokwasów (aktywatorów AOX) oraz reduktantów, np. tio-redoksyn czy glutationu (MOORE i współaut. 2013 i prace cytowane).

REGULACJA AOX

Regulacja aktywności alternatywnej drogi oddechowej zachodzi na drodze indukcji syntezy białka AOX w wyniku kontroli ekspresji genu oraz na poziomie potranslacyjnym, poprzez poziom redukcji białka, dostępność substratów, a także obecność specyficznych aktywatorów, jakimi są α -ketokwasy (CLIFTON i współaut. 2006). Czynniki regulacyjne nie działają w izolacji, ale są ściśle ze sobą powiązane, hierarchiczne oraz wykazują współdziałanie.

AOX jest białkiem mitochondrialnym kodowanym przez genom jądrowy. Roślinne AOX należą do małej, wielogenowej rodziny, w której można wyróżnić dwie podrodziny: AOX1 i AOX2 (CONSIDINE i współaut. 2002). Zsekwencjonowanie całego genomu *Arabidopsis thaliana* ujawniło obecność pięciu genów AOX, klasyfikowanych jako: cztery typu AOX1 (*AOX1a*, *AOX1b*, *AOX1c*, *AOX1d*) i jeden typu AOX2 (CLIFTON i współaut. 2006). U innych gatunków roślin wyższych występuje od 1 (np. w rzędzie dyniowców, *Cucurbitales*) do 6 genów AOX (np. w rzędzie kapustowców, *Brassicales*) (COSTA i współaut. 2014) (Tabela 2). Konstytutywna obecność białka AOX w tkankach świadczy o potencjalnej roli AOX w zintegrowanym metabolizmie tkanek roślinnych (JUSZCZUK i RYCHTER 2003). Ekspresja niektórych genów AOX wzrasta znacząco w warunkach stresu. Warunki stresowe prowadzą m.in. do indukcji ekspresji *AOX1a* występującego zarówno u jednoliściennych, jak i dwuliściennych gatunków roślin. Natomiast ekspresja *AOX2* jest zwykle konstytutywna albo powiązana ze specyficznym rodzajem tkanki oraz stadium rozwoju jedynie u gatunków dwuliściennych. W genomach wszystkich gatunków jednoliściennych badanych do 2014 r. nie znaleziono genów z podrodziny AOX2 (COSTA i współaut. 2014). Dlatego też proponuje się dwie role dla izoenzymów AOX: jeden może być niezbędny do pełnienia funkcji metabolizmu podstawowego, a drugi związany z odpowiedzią na stres (CONSIDINE i współaut. 2002). Brak rodziny AOX2 u roślin gatunków jednoliściennych może mieć znaczące

następstwa dla badań naukowych nad rolą i regulacją AOX i wywołuje pytanie o to, czy rola oksydazy alternatywnej jest taka sama u jednoliściennych i dwuliściennych.

AOX kodowana jest przez genom jądrowy, natomiast białko AOX jest związane z wewnętrzną błoną mitochondrialną, dlatego ekspresja AOX w pewnym stopniu musi zależeć od aktywności łańcucha oddechowego i podlegać mitochondrialnej regulacji wstecznej (ang. retrograde). Do indukcji AOX prowadzą zróżnicowane ścieżki sygnałowe. Mogą być one zależne zarówno od ROS, jak i ROS-niezależne (MØLLER 2001). Szlaki zależne od ROS są prawdopodobnie istotne w warunkach stresowych, gdyż wiele stresów biotycznych i abiotycznych wywołuje zwiększone powstawanie ROS. Rolę cząsteczki sygnałowej w warunkach stresowych może pełnić nadtlenek wodoru (H_2O_2), który jest stosunkowo stabilny i łatwo przenika przez błony (MØLLER 2001). Induktorami ekspresji AOX mogą być także metabolity cyklu TCA, w szczególności cytrynian, jabłczan i 2-oksoglutaran oraz kwas salicylowy, salicylan metylu czy etylen lub kwas jasmonowy (MILLENAAR i LAMBERS 2003). Ekspresja AOX w warunkach stresowych dodatkowo jest często koregulowana z genami dehydrogenaz typu II. Najwyższy poziom korelacji specyficznych dla roślin komponentów mtETC, w zależności od etapu rozwojowego rośliny lub w odpowiedzi na różne warunki hodowli, stwierdzono pomiędzy wspólną indukcją *AOX1a* oraz *NDB2* (CLIFTON i współaut. 2005, ELHAFAZ i współaut. 2006, RASMUSSEN i współaut. 2009). Odkrycie to sugeruje istnienie samodzielnego szlaku transportu elektronów niezwiązanego z przetwarzaniem energii i składającego się z tych dwóch białek, mogących aktywnie utleniać reduktanty z cytozolu. Poza tym, *AOX1a* i *NDB2* wydają się być wspólnie regulowane z wewnętrzną dehydrogenazą *NDA2* (ELHAFAZ i współaut. 2006). Współzależność ekspresji podczas traktowania roślin czynnikami stresowymi znaleziono również dla *AOX1c* i *NDA1*. Szlak taki prawdopodobnie umożliwia utlenianie reduktantów z macierzy mitochon-

Tabela 2. Występowanie podrodzin genów AOX u wybranych okrytonasiennych przedstawiona w odniesieniu do drzewa filogenetycznego roślin kwiatowych (wg COSTA i współaut. 2014).

Okrytonasienne	Rzędy	Rodziny genów AOX
Wczesne dwuliścienne	grzybieniewce <i>Nymphaeales</i>	AOX1a, AOX1b, AOX1c, AOX2
	magnoliowce <i>Magnoliales</i>	sAOX1a, AOX1b, AOX2
Jednoliścienne <i>Monocotyledones</i>	wiechlinowce <i>Poales</i>	AOX1a, AOX1c, AOX1e, AOX1d1, AOX1d2
	szparagowce <i>Asparagales</i>	AOX1a, AOX1b, AOX1e, AOX1d
Dwuliścienne właściwe <i>Eudicotyledoneae</i>	jaskrowce <i>Ranunculales</i>	AOX1a, AOX1b, AOX2a, AOX2d
	dyniowce <i>Cucurbitales</i>	AOX2
	Różowe <i>Rosidae</i>	
	różowce <i>Rosales</i>	AOX1, AOX2a, AOX2b, AOX2d
	bobowce <i>Fabales</i>	AOX1, AOX2a, AOX2d
	ślazowce <i>Malvales</i>	AOX1, AOX2a, AOX2b, AOX2c
	kapustowce <i>Brassicales</i>	AOX1a1, AOX1a2, AOX1b, AOX1c, AOX1d, AOX2
	Astrowe <i>Asteridae</i>	
	goryczkowce <i>Gentianales</i>	AOX1a, AOX1d, AOX2a, AOX2b
	psiankowce <i>Solanales</i>	AOX1a, AOX1b, AOX1c, AOX1d, AOX2
	astrowce <i>Astrales</i>	AOX1a, AOX1b, AOX1d, AOX2a, AOX2b
	selerowce <i>Apiales</i>	AOX1a, AOX2a, AOX2b

drialnej (CLIFTON i współaut. 2005) lub dla *AOX1c* i *NDB4*, co umożliwiałoby utlenianie NAD(P)H pochodzącego z cytozolu (HO i współaut. 2008). Izoforma *AOX1b* wydaje się podlegać ekspresji wspólnie z *NDB3* w męskich organach generatywnych roślin, natomiast *AOX1d* ma wspólny profil ekspresji z *NDA2* w tkankach płatków kielicha (RASMUSSEN i współaut. 2009). Stwierdzono również, że występuje także pozytywna korelacja ekspresji genów *AOX* z genami dehydrogenaz odpowiedzialnych za alternatywne drogi powstawania NADH (z metabolitów pośrednich cyklu TCA lub aminokwasów) oraz genami kodującymi kilka przekaźników metabolitów zlokalizowanych w mitochondrium (CLIFTON i współaut. 2006).

AOX jest białkiem homodimerycznym i występuje w mniej aktywnej formie utlenionej, gdy podjednostki dimeru pozostają złączone kowalencyjnie, natomiast redukcja mostka dwusiarczkowego prowadzi do powstania bardziej aktywnej formy AOX. Redukcja mostków dwusiarczkowych w obrębie reszt cysteinowych białka AOX *in vivo* zależy prawdopodobnie od obecności w macierzy mitochondrialnej NAD(P)H, systemu tioredoksyn lub też glutationu oraz metabolitów

pośrednich cyklu kwasu cytrynowego: cytrynianu, izocytrynianu lub jabłczanu (RASMUSSEN i MØLLER 2006). Dopiero, gdy AOX znajduje się w stanie aktywnym (w formie zredukowanej), enzym ten może być aktywowany przez α -ketokwasy (2-oksokwasy organiczne), zwłaszcza pirogronian, ale także glioksalan, hydroksypirogronian i 2-oksoglutaran (MILLENAAR i LAMBERS 2003), które asocjują z regulatorową cysteiną w pozycji 78 przy N-końcu łańcucha polipeptydowego (MOORE i współaut. 2013). W wyniku bezpośredniego, allosterycznego oddziaływania tych metabolitów wzrasta powinowactwo AOX do substratu, zredukowanego ubichinonu (ubichinolu). Aktywność AOX regulowana jest także poprzez poziom redukcji ubichinonu. Wzrost stopnia redukcji ubichinonu wywołuje aktywację AOX (MILLENAAR i LAMBERS 2003). Aktywność AOX jest obniżana w ciemności, a zwiększana na świetle (RIBAS-CARBÓ i współaut. 2000, RASMUSSEN i MØLLER 2006). FENG i współaut. (2007) udowodnili, że aktywacja AOX podczas wczesnej fazy zazieleniania ryżu jest niezależna od metabolizmu fotosyntetycznego, a światło jest bezpośrednim sygnałem indukującym AOX. Wykazano również zróżnicowaną ekspresję genów *AOX*

między tkankami rosnącymi na świetle oraz etiolowanymi (RIBAS-CARBÓ i współaut. 2000) oraz wzrost aktywności AOX w warunkach wysokiego światła (FLOREZ-SARASA i współaut. 2009). Regulacja AOX przez światło zachodzi za pośrednictwem fotoreceptorów (fitochromów, fototropin i kryptochromów) (XU i współaut. 2011) i może polegać na kontroli transkrypcyjnej (ESCOBAR i współaut. 2004),

ponieważ w promotorze *AOX1a* w genomie *Arabidopsis* zlokalizowano motywy reagujące na światło (ZHANG i współaut. 2010). Światło może także wpływać na potranslacyjną regulację AOX modyfikując stan redukcji mostka dwusiarczkowego w dimerze AOX lub zwiększając pulę pirogronianu (RIBAS-CARBÓ i współaut. 2000).

METODY POMIARU AKTYWNOŚCI AOX

Przez wiele lat aktywność oddechową organów, tkanek oraz izolowanych mitochondriów badano w roztworach wodnych z zastosowaniem elektrody tlenowej typu Clarka. W celu określenia aktywności AOX hamowano drogę cytochromową przy użyciu specyficznych inhibitorów, takich jak: cyjanek, azydek, antymycyna A. Natomiast w celu określenia aktywności oksydazy cytochromowej (COX) hamowano drogę alternatywną stosując m.in.: kwas salicylohydroksamowy (SHAM), kwas benzohydroksamowy (BHAM), disulfiram oraz gallusan n-propylu (JUSZCZUK i RYCHTER 2001). Błędnie jednak zakładano, że droga alternatywna działa przy wysyczonej drodze cytochromowej (LAMBERS 1985). Obecnie wiadomo, że w warunkach *in vivo* droga alternatywna nie tylko może funkcjonować przy niewysyczonej drodze cytochromowej, ale wręcz współzawodniczy z nią o elektrony. Dawna metoda określania aktywności AOX stała się jedynie sposobem na określenie maksymalnej aktywności drogi alternatywnej (nazywanej pojemnością) przy zachowaniu odpowiednich warunków pomiaru, gwarantujących wysoką aktywność enzymatyczną, takich jak obecność pirogronianu oraz czynnika redukującego (DAY i współaut. 1996). Udział AOX w oddychaniu dotyczy szacunku aktualnego przepływu elektronów przez drogę alternatywną, dlatego też jest o wiele trudniejszy do zmierzenia niż pojemność AOX. Najlepszym sposobem określenia aktywności AOX *in vivo* jest zastosowanie techniki dyskryminacji stabilnych izotopów tlenu (GUY i współaut. 1989). Metoda ta opiera się na różnicach pomiędzy AOX a COX w wybiórczości względem dwuatomowych cząsteczek tlenu zawierających cięższy izotop ^{18}O , a stanowiących zaledwie 0,204% całkowitego tlenu atmosferycznego (ROBINSON i współaut. 1995). Energia potrzebna do zerwania wiązania pomiędzy atomami tlenu w dwuatomowej cząsteczce, którą może-

my symbolicznie zapisać jako $\text{tlen}=\text{tlen}$, jest większa dla cząsteczki zawierającej izotop ^{18}O ($^{18}\text{O}=\text{O}^{16}$) niż dla cząsteczki złożonej z lżejszych izotopów $^{16}\text{O}=\text{O}^{16}$. Zarówno COX, jak i AOX w reakcji katalitycznej preferują $^{32}\text{O}_2$. Jednak enzymy te wykorzystują inne mechanizmy by zerwać kowalencyjne wiązanie w dwuatomowej cząsteczce tlenu, wykazują zatem odmienne wartości dyskryminacji w stosunku do cząsteczek zawierających cięższy izotop. Podczas pomiaru próbka (np. krążek liściowy) umieszczana jest w szczelnym naczyniu pomiarowym, z którego w równych odstępach czasu pobierane są próby powietrza o zmniejszającej się zawartości tlenu pochłanianego w procesie oddychania. Następnie skład izotopowy powietrza pobranego z kuwety pomiarowej jest analizowany przez spektrometr masowy. W celu określenia wartości dyskryminacji, zarówno stężenie tlenu, jak i stosunek izotopów są określane dla poszczególnych prób. Otrzymane wartości są następnie porównywane z końcowymi wartościami dyskryminacji dla AOX i COX, które są otrzymywane oddzielnie dla każdej drogi oddechowej po zahamowaniu każdej z nich (GUY i współaut. 1989). COX wykazuje frakcjonowanie w granicach 18-20‰, podczas gdy wartości te dla AOX oscylują w zakresie 24-31‰ (RIBAS-CARBÓ i współaut. 2005). Różnica tych wartości może zostać wykorzystana przy określaniu względnego przepływu elektronów przez drogę cytochromową i alternatywną, a więc pozwala na pomiar aktywności COX i AOX *in vivo*. Badania mogą być prowadzone w fazie ciekłej, umożliwiając pomiar oddychania izolowanych mitochondriów, lub w fazie gazowej, w celu pomiaru oddychania całej tkanki, w szczególności liści (RIBAS-CARBÓ i współaut. 2005).

Zastosowanie w badaniach AOX techniki wykorzystującej dyskryminację izotopów tlenu okazało się przełomowe. Obecnie uznawana jest ona za jedyną pewną metodę ba-

dania rozdziału elektronów pomiędzy obie drogi oddechowe *in vivo* (DAY i współaut. 1996) i umożliwiającą pomiar rzeczywistej aktywności AOX, która najczęściej jest znacznie niższa niż pojemność, czyli maksymalna aktywność AOX. Oksydaza alternatywna jest jednym z bardzo niewielu białek, których aktywność *in vivo* może być mierzona w stabilnych warunkach z użyciem nieinwazyjnej metody. Niestety istnieje jeszcze kilka ogra-

niczeń w stosowaniu techniki dyskryminacji izotopów tlenu. Przede wszystkim pomiary prowadzi się jedynie w ciemności, by uniknąć wpływu fotosyntetycznej wymiany tlenu. Zatem, mimo iż jest to aktualnie najpewniejsza z metod pomiaru aktywności dróg oddechowych, wciąż nie dostarcza ona najcenniejszej informacji o aktywności oddechowej *in vivo* na świetle.

ROLA AOX W METABOLIZMIE ROŚLIN

Ze względu na niefosforylujący charakter, aktywność AOX może być niezbędna do dostosowania wymagań energetycznych tkanek, zapotrzebowania na metabolity pośrednie oraz usuwania nadmiaru reduktantów (VANLERBERGHE i współaut. 2009). Udział AOX w oddychaniu pełni istotną rolę w różnych stadiach rozwoju roślin oraz w warunkach stresowych (JUSZCZUK i RYCHTER 2003). Rolą AOX może być wspieranie metabolizmu, kiedy pojemność COX (Kompleks IV) lub Kompleksu III jest silnie ograniczona, np. poprzez obecność CN^- , CO, NO, H_2S , niską temperaturę, niskie stężenie fosforu, lub gdy status energetyczny komórki jest wysoki (JUSZCZUK i RYCHTER 2003). W takich warunkach aktywność AOX może służyć także odtwarzaniu utlenionych nukleotydów pirydynowych (NAD^+ i NADP^+) i w ten sposób także zapobiegać hamowaniu metabolizmu węgla (MILLENAAR i LAMBERS 2003). Indukcja ekspresji AOX inhibitorami cyklu TCA i fosforylacji oksydacyjnej może świadczyć o tym, że wzrost aktywności AOX jest ogólną odpowiedzią na zakłócenia w metabolizmie energetycznym. Przykładowo, w deficycie fosforu przy ograniczonej aktywności drogi cytochromowej i obniżonej syntezie ATP, obserwuje się wzrost oddychania odpornego na cyjanek i powiązany z tym wzrost stężenia białka i aktywności AOX (RYCHTER i współaut. 1992).

Oksydaza alternatywna odbierając elektrony z ubichinolu, obniża potencjał błonowy i przeciwdziała wytwarzaniu ROS na poziomie kompleksu III (MØLLER 2001), dzięki temu jej udział w oddychaniu może chronić przed stresem oksydacyjnym.

Aktywność AOX łączona jest także z pełnieniem kilku fizjologicznych funkcji związanych z fotosyntezą: utlenianiem jabłczanu u roślin C_3 (DINAKAR i współaut. 2010), utlenianiem siły redukującej związanej z meta-

bolizmem jabłczanu w metabolizmie kwasowym gruboszowatych (CAM) (VANLERBERGHE i współaut. 2009), podtrzymywaniem aktywności enzymów cyklu Calvina i zapobieganiem nadmiernej redukcji chloroplastowego łańcucha transportu elektronów (DINAKAR i współaut. 2010), zapobiegając tym samym fotooksydacyjnym uszkodzeniom tylakoidów chloroplastów (YOSHIDA i współaut. 2007). Zahamowanie AOX powoduje wzrost redukcji fotosyntetycznego ETC, głównie fotosystemu II oraz zmniejsza natężenie fotosyntezy (YOSHIDA i współaut. 2007).

Oksydaza alternatywna odpowiada za dostosowanie się funkcjonowania mtETC do zmieniającego się środowiska (CLIFTON i współaut. 2006). Dowiedziono, że droga alternatywna może być aktywowana we wczesnej odpowiedzi na utratę równowagi metabolicznej (ARNHOLDT-SCHMITT i współaut. 2006). Ponieważ AOX jest indukowana zarówno w warunkach stresu biotycznego, jak i abiotycznego nazywana jest „białkiem stresu” i jest uważana za białko „przetrwania” wspierające homeostazę komórkową (ARNHOLDT-SCHMITT i współaut. 2006, VANLERBERGHE 2013).

Występowanie genów oksydaz alternatywnych u organizmów należących do różnych gatunków wskazuje na ewolucyjne znaczenie tego białka i wywołuje pytanie o jego początkową funkcję. GOMES i współaut. (2001) zaproponowali, że białko to mogło pełnić rolę reduktazy tlenu funkcjonującej w pierwszych stadiach przejścia z atmosfery beztlenowej do tlenowej. Zakłada się, że pierwsze anaerobowe organizmy żyły w środowisku redukującym, w którym wprowadzenie tlenu mogło skutkować powstawaniem toksycznych ROS. Dlatego też jedną z pierwszych adaptacji, których organizmy potrzebowały by przeżyć, była modyfikacja istniejących białek w celu usuwania tlenu rozpuszczonego w komór-

kach. Jedna z hipotez dotyczących współczesnej roli AOX sugeruje także, że białko to może przyczyniać się do utrzymywania równowagi tlenowej w mitochondrium. Z uwagi na niższe powinowactwo AOX do tlenu w porównaniu z COX [$K_m(O_2)$ wynosi 1,6-30 μM i 0,1-0,125 μM odpowiednio dla AOX i COX (GUPTA i współaut. 2009)], udział oksydazy alternatywnej w oddychaniu nie powinien kolidować z aktywnością COX, natomiast aktywność AOX może zapewniać redukcję stężenia tlenu, zmniejszając tym samym powstawanie ROS w mitochondrium.

Do badań nad rolą AOX konstruowane są specjalne mutanty, najczęściej w genie kodującym AOX1a. Dotychczas otrzymano rośliny wykazujące nadekspresję lub obniżoną ekspresję genu *AOX1a*, takie jak tytoń (VANLERBERGHE i współaut. 1994), ziemniak (HISER i współaut. 1996) oraz rzodkiewnik (UMBACH i współaut. 2005). Stworzono także rośliny z unieczynnionym genem kodującym AOX1a u *Arabidopsis* (GIRAUD i współaut. 2008, WATANABE i współaut. 2008). Nie udało się jednak dotychczas uzyskać mutanta z wyciszoną całkowicie ekspresją wszystkich genów izoform AOX, co prawdopodobnie oznacza, że taka mutacja jest letalna dla roślin. W optymalnych warunkach wzrostu, mutanty AOX nie wykazują różnic fenotypowych w porównaniu do roślin dzikich (VANLERBERGHE i współ-

aut. 1994, SIEGER i współaut. 2005, UMBACH i współaut. 2005, GIRAUD i współaut. 2008, WATANABE i współaut. 2008). Nie stwierdzono także wpływu zmian ekspresji AOX na produkcję ROS u roślin (UMBACH i współaut. 2005, GIRAUD i współaut. 2008). U tytoniu z obniżoną ekspresją *AOX1a*, zaobserwowana aktywacja obrony przeciwrodnikowej prowadziła nawet do obniżenia poziomu ROS w całych komórkach, pomimo zmian w produkcji ROS w mitochondriach (MAXWELL i współaut. 1999).

Podczas niekorzystnych warunków środowiskowych udział AOX w oddychaniu zwiększa się, dlatego najnowsze badania nad rolą AOX skupiają się na analizie wpływu różnych stresów biotycznych lub abiotycznych na mutanty charakteryzujące się zmienioną ekspresją AOX (VANLERBERGHE 2013). Rośliny z wyciszoną ekspresją *AOX1a* narażone na działanie niekorzystnych warunków wolniej rosną oraz wykazują symptomy stresu oksydacyjnego. Rośliny z defektem AOX są bardziej wrażliwe na chłód (WATANABE i współaut. 2008), deficyt azotu lub fosforu (SIEGER i współaut. 2005), wysokie światło (YOSHIDA i współaut. 2007) oraz suszę (GIRAUD i współaut. 2008). Natomiast rośliny z nadekspresją AOX są bardziej odporne na działanie czynników stresowych (GIRAUD i współaut. 2008).

PODSUMOWANIE

Rośliny w większości prowadzą osiadły tryb życia i spotykają się ze zmiennymi warunkami zewnętrznymi wegetacji, np. susza, powódź, chłód, ciepło, światło, ciemność. Rozgałęziona budowa mtETC z dodatkowymi enzymami pozwala roślinom na dostosowanie metabolizmu do zmieniających się warunków środowiska. Dodatkowo obecność fotosyntezy, dostarczającej siły redukcyjnej i ATP na świetle, powoduje konieczność regulacji gospodarki energią. Wyniki badań prowadzone wyrafinowanymi technikami pozwoliły na znalezienie odpowiedzi na wiele pytań nurtujących fizjologów zajmujących się badaniami oddychania roślin i funkcjonowaniem roślinnego mtETC. Przykładem mogą być pytania związane z oddychaniem odpornym na cyjanek, zagadnienia termogenezy roślin, współdziałania

procesów fotosyntezy i oddychania czy też reakcji roślin na warunki stresowe środowiska. Badania prowadzone na poziomie genów, białek, aktywności enzymów udowadniają, jak skomplikowanym poziomom regulacji podlega metabolizm roślinny, w tym procesy związane z funkcjonowaniem mitochondrialnego łańcucha oddechowego.

Należy podkreślić, że badania dotyczące roślinnego mtETC mają jednak nie tylko aspekt teoretyczno-poznawczy. Już od lat 90. ubiegłego wieku międzynarodowe konsorcjum prowadzi zaawansowane badania molekularne nad możliwością wykorzystania komponentów alternatywnych szlaków roślinnego mtETC w terapii genowej u pacjentów, u których podłożem choroby są mutacje w genach kodujących białka łańcucha oddechowego (RUSTIN i JACOBS 2009).

LITERATURA

- ARNHOLD-SCHMITT B., COSTA J. H., FERNANDES DE MELO D., 2006. AOX – a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends Plant Sci.* 11, 281–287.
- CARNEVALI F., DE SANTIS A., 2009. Activity and expression of alternative pathways of respiration during postharvest cold storage of kiwifruit. EMBL/GenBank/DBJ databases.
- CARRIE C., MURCHA M. W., KUEHN K., DUNCAN O., BARTHELET M., SMITH P. M., EUBEL H., MEYER E., DAY D. A., MILLAR A. H., WHELAN J., 2008. Type II NAD(P)H dehydrogenases are targeted to mitochondria and chloroplasts or peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 582, 3073–3079.
- CLIFTON R., LISTER R., PARKER K. L., SAPPL P. G., ELHAFEZ D., MILLAR A. H., DAY D. A., WHELAN J., 2005. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 58, 193–212.
- CLIFTON R., MILLAR A. H., WHELAN J., 2006. Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757, 730–741.
- CONSIDINE M. J., HOLTZAPFEL R. C., DAY D. A., WHELAN J., MILLAR H., 2002. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol.* 129, 949–953.
- COSTA J. H., McDONALD A. E., 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.
- DAY D. A., KRAB K., LAMBERS H., MOORE A. L., SIEDOW J. N., WAGNER A. M., WISKICH J. T. 1996. The cyanide-resistant oxidase: to inhibit or not to inhibit, that is the question. *Plant Physiol.* 110, 1–2.
- DINAKAR C., RAGHAVENDRA A. S., PADMASREE K., 2010. Importance of AOX pathway in optimizing photosynthesis under high light stress: role of pyruvate and malate in activating AOX. *Physiol. Plant.* 139, 13–26.
- ELHAFEZ D., MURCHA M. W., CLIFTON R., SOOLE K. L., DAY D. A., WHELAN J., 2006. Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis*: intraorganelle location and expression. *Plant Cell Physiol.* 47, 43–54.
- ESCOBAR M. A., FRANKLIN K. A., SVENSSON A. S., SALTER M. G., WHITELAM G. C., RASMUSSEN A. G., 2004. Light regulation of the *Arabidopsis* respiratory chain. Multiple discrete photoreceptor responses contribute to induction of type II NAD(P)H dehydrogenase genes. *Plant Physiol.* 136, 2710–2721.
- ESCOBAR M. A., GEISLER D. A., RASMUSSEN A. G., 2006. Reorganization of the alternative pathways of the *Arabidopsis* respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. *Plant J.* 45, 775–788.
- FELLE H. H., 2001. pH: signal and messenger in plant cells. *Plant Biol.* 3, 577–591.
- 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.
- FLOREZ-SARASA I., OSTASZEWSKA M., GALLE A., FLEXAS J., RYCHTER A. M., RIBAS-CARBÓ 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.
- GEISLER D. A., BROSELID C., HEDERSTEDT L., RASMUSSEN A. G., 2007. *Ca²⁺-binding and Ca²⁺-independent respiratory NADH and NADPH dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana**. *J. Biol. Chem.* 282, 28455–28464.
- GIRAUD E., HO L. H., CLIFTON R., CARROLL A., ESTAVILLO G., TAN Y. F., HOWELL K. A., IVANOVA A., POGSON B. J., MILLAR A. H., WHELAN J., 2008. The absence of alternative oxidase 1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiol.* 147, 595–610.
- GOMES C. M., LE GALL J., XAVIER A. V., TEIXEIRA M., 2001. Could a diiron-containing four-helix-bundle protein have been a primitive oxygen reductase? *ChemBioChem* 2, 583–587.
- GUPTA K. J., ZABALZA A., VAN DONGEN J. T., 2009. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiol. Plant.* 137, 383–391.
- GUY R. D., BERRY J. A., FOGEL M. L., HOERING T. C., 1989. Differential fractionation of oxygen isotopes by cyanide-resistant and cyanide-sensitive respiration in plants. *Planta* 177, 483–491.
- HISER C., KAPRANOV P., MCINTOSH L., 1996. Genetic modification of respiratory capacity in potato. *Plant Physiol.* 110, 277–286.
- HO L. H., 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.
- JOHANSSON F. I., MICHAŁECKA A. M., MØLLER I. M., RASMUSSEN A. G., 2004. Oxidation and reduction of pyridine nucleotides in alamethicin-permeabilized plant mitochondria. *Biochem. J.* 380, 193–202.
- JUSZCZUK I. M., RYCHTER A. M., 2001. Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej. *Post. Bioch.* 47, 318–327.
- JUSZCZUK I. M., RYCHTER A. M., 2003. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim. Pol.* 4, 1257–1271.
- KERSCHER S. J., 2000. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1459, 274–283.
- LAMBERS H., 1985. Respiration in intact plants and tissues: Its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organisms. [W:] *Higher Plant Cell Respiration (Encyclopedia of Plant Physiology, new series, vol. 18)*. DOUCE R., DAY D. A. (red.). Springer, Berlin, 418–473.
- LIU Y. J., NORBERG F. E. B., SZILÁGYI A., DE PAEPE R., ÅKERLUND H. E., RASMUSSEN A. G., 2008. The mitochondrial external NADPH dehydrogenase modulates the leaf NADPH/NADP⁺ ratio in transgenic *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Physiol.* 49, 251–263.
- LOGAN D. C., KNIGHT M. R., 2003. Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Physiol.* 133, 21–24.
- MAXWELL D. P., WANG Y., MCINTOSH L., 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 8271–8276.
- MCDONALD A. E., VANLERBERGHE G. C., STAPLES J. F., 2009. Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *J. Exp. Biol.* 212, 2627–2634.

- MICHAŁECKA A. M., SVENSSON A. S., JOHANSSON F. I., AGIUS S. C., JOHANSON U., BRENNICKE A., BINDER S., RASMUSSEN A. G., 2003. *Arabidopsis* genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiol.* 133, 642–652.
- MICHAŁECKA A. M., AGIUS S. C., MØLLER I. M., RASMUSSEN A. G., 2004. Identification of a mitochondrial NADPH dehydrogenase by overexpression in transgenic *Nicotiana sylvestris*. *Plant J.* 37, 415–425.
- MILLENAAR F. F., LAMBERS H., 2003. The alternative oxidase: *in vivo* regulation and function. *Plant Biol* 5, 2–15.
- MØLLER I. M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 561–591.
- MOORE A. L., 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.
- MOORE C. S., COOK-JOHNSON R. J., RUDHE C., WHELAN J., DAY D. A., WISKICH J. T., SOOLE K. L., 2003. Identification of AtNDI1, an internal nonphosphorylating NAD(P)H dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* mitochondria. *Plant Physiol.* 133, 1–11.
- PODGÓRSKA A., GIECZEWSKA K., ŁUKAWSKA-KUŻMA K., RASMUSSEN A. G., 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.
- RASMUSSEN A. G., MØLLER I. M., 1991. NAD(P)H dehydrogenases on the inner surface of the inner mitochondrial-membrane studied using inside-out submitochondrial particles. *Physiol. Plant.* 83, 357–365.
- RASMUSSEN A. G., MØLLER I. M., 2006. Multiple energy-conservation bypasses in oxidative phosphorylation of plant mitochondria plant physiology. <http://4c.plantphys.net/article.php?ch=7&id=350>.
- RASMUSSEN A. G., SVENSSON A. S., KNOOP V., GROHMANN L., BRENNICKE A., 1999. Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J.* 20, 79–87.
- RASMUSSEN A. G., SOOLE K. L., ELTHON T. E., 2004. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 23–39.
- RASMUSSEN A. G., GEISLER D. A., MØLLER I. M., 2008. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion* 8, 47–60.
- RASMUSSEN A. G., FERNIE A. R., VAN DONGEN J. T., 2009. Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiol. Plant.* 137, 371–382.
- RIBAS-CARBÓ M., ROBINSON S. A., GONZÁLEZ-MELER M. A., LENNON A. M., GILES L., SIEDOW J. N., BERRY J. A., 2000. Effects of light respiration and oxygen isotope fractionation in soybean cotyledons. *Plant Cell Environ.* 23, 983–989.
- RIBAS-CARBÓ M., ROBINSON S. A., GILES L., 2005. The application of the oxygen-isotope technique to assess respiratory pathway partitioning. [W:] *Plants Respiration: From Cell to Ecosystem*. LAMBERS H., RIBAS-CARBÓ M. (red.). Springer, Berlin, 31–41.
- ROBINSON S. A., RIBAS-CARBÓ M., YAKIR D., GILES L., REUVENI Y., BERRY J. A., 1995. *Beyond SHAM and cyanide: opportunities for studying the alternative oxidase in plant respiration using oxygen isotope discrimination*. *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 487–496.
- RUSTIN P., JACOBS H. T., 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.
- RYCHTER A. M., CHAUVEAU M., BOMSEL J. L., LANCE C., 1992. The effect of phosphate deficiency on mitochondrial activity and adenylate levels in bean roots. *Physiol. Plant.* 84, 80–86.
- SHIBA T., KIDO Y., SAKAMOTO K., INAOKA D. K., TSUGE C., TATSUMI R., TAKAHASHI G., BALOGUN E. O., NARA T., AOKI T., HONMA T., TANAKA A., INOUE M., MATSUOKA S., SAIMOTO H., MOORE A. L., HARADA S., KITA K., 2013. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 110, 4580–4585.
- SIEGER S. M., KRISTENSEN B. K., ROBSON C. A., AMIRSADEGHI S., ENG E. W., ABDEL-MESIH A., MØLLER I. M., VANLERBERGHE G. C., 2005. The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells. *J. Exp. Bot.* 56, 1499–1515.
- SMITH C., BARTHET M., MELINO V., SMITH P., DAY D., SOOLE K., 2011. Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress. *Plant Cell Physiol.* 52, 1222–1237.
- SVENSSON A. S., JOHANSSON F. I., MØLLER I. M., RASMUSSEN A. G., 2002. Cold stress decreases the capacity for respiratory NADH oxidation in potato leaves. *FEBS Lett.* 517, 79–82.
- SZAL B., PODGÓRSKA A., 2012. The role of mitochondria in leaf nitrogen metabolism. *Plant Cell Environ.* 35, 1756–1768.
- UMBACH A. L., FIORANI F., SIEDOW J. N., 2005. Characterization of transformed *Arabidopsis* with altered oxidase levels and analysis of effect on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiol.* 139, 1806–1820.
- VANLERBERGHE G. C., 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.
- VANLERBERGHE G. C., VANLERBERGHE A. E., MCINTOSH L., 1994. Molecular genetic alteration of plant respiration. Silencing and overexpression of alternative oxidase in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 106, 1503–1510.
- VANLERBERGHE G. C., 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.
- WALLSTRÖM S. V., FLOREZ-SARASA I., ARAÚJO W. L., AIDEMARK M., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ M., FERNIE A. R., RIBAS-CARBÓ M., RASMUSSEN A. G., 2014a. Suppression of the external mitochondrial NADPH dehydrogenase, NDB1, in *Arabidopsis thaliana* affects central metabolism and vegetative growth. *Mol. Plant.* 7, 356–368.
- WALLSTRÖM S. V., FLOREZ-SARASA I., ARAÚJO W. L., ESCOBAR M. A., GEISLER D. A., AIDEMARK M., LAGER I., FERNIE A. R., RIBAS-CARBÓ M., RASMUSSEN A. G., 2014b. Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mito-

- chondrial electron transport*. Plant Cell Physiol. 55, 881–896.
- WATANABE C. K., HACHIYA T., TERASHIMA I., NOGUCHI K., 2008. *The lack of alternative oxidase at low temperature leads to a disruption of the balance in carbon and nitrogen metabolism, and to an up-regulation of antioxidant defence systems in Arabidopsis thaliana leaves*. Plant Cell Environ. 31, 1190–1202.
- XU F., YUAN S., LIN H. H., 2011. *Response of mitochondrial alternative oxidase (AOX) to light signals*. Plant Signal. Behav. 6, 55–58.
- XU L., LAW S. R., MURCHA M. W., WHELAN J., CARRIE C., 2013. *The dual targeting ability of type II NAD(P)H dehydrogenases arose early in land plant evolution*. BMC Plant Biol. 13, 100.
- YOSHIDA K., TERASHIMA I., NOGUCHI K., 2007. *Up-regulation of mitochondrial alternative oxidase concomitant with chloroplast over-reduction by excess light*. Plant Cell Physiol. 48, 606–614.
- ZHANG D. W., XU F., ZHANG Z. W., CHEN Y. E., DU J. B., JIA S. D., YUAN S., LIN H. H., 2010. *Effects of light on cyanide-resistant respiration and alternative oxidase function in Arabidopsis seedlings*. Plant Cell Environ. 33, 2121–2131.

MONIKA OSTASZEWSKA-BUGAJSKA, ANNA PODGÓRSKA, ANNA M. RYCHTER, BOŻENA SZAL

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin

Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin

Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

ROŚLINNY MITOCHONDRIALNY ŁAŃCUCH ODDECHOWY

Streszczenie

Roślinny mitochondrialny łańcuch oddechowy, oprócz dużych kompleksów białkowych (Kompleksów I-IV) zawiera dodatkowe elementy: wewnętrzne i zewnętrzne dehydrogenazy typu II (NDin/NDex) utleniające NAD(P)H pochodzące odpowiednio z macierzy mitochondrialnej lub cytozolu oraz dodatkową terminalną oksydazę nazwaną oksydazę alternatywną (AOX). Udział szlaków alternatywnych w oddychaniu musi być ściśle regulowany ponieważ aktywność tych enzymów nie jest związana z translokacją protonów w poprzek błony i w konsekwencji nie prowadzi do produkcji ATP. Aktywność ta pozwala natomiast rozproszyć nadmiar siły redukcyjnej, co jest szczególnie ważne w warunkach stresowych. W tym artykule przeglądowym omówiono budowę szlaków alternatywnych roślinnego mtETC, regulację ich aktywności na różnych poziomach oraz opisano role jakie pełnią NDin/ex i AOX w metabolizmie komórek roślinnych.

MONIKA OSTASZEWSKA-BUGAJSKA, ANNA PODGÓRSKA, ANNA M. RYCHTER, BOŻENA SZAL

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin

Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin

Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

PLANT MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN

Summary

Plant mitochondrial electron transport chain (mtETC), besides large complexes (Complex I-IV), consists of additional elements: internal and external type II NAD(P)H dehydrogenases (NDin/NDex) and an additional terminal oxidase, named alternative oxidase (AOX). The engagement of alternative pathways in respiration must be tightly regulated since their activity is not linked to pumping protons across membrane and, as a consequence, is not associated with ATP synthesis. The activity of plant-specific components in mtETC allows to dissipate the excess of reducing power and may be especially important under stress conditions. In this review the structure, the regulation of activities and the role of NDin/NDex and AOX in metabolism of plant cells is described.