

ŁUKASZ WOJTYŁA, MAŁGORZATA GARNCZARSKA

*Zakład Fizjologii Roślin
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Umultowska 89, 61-614 Poznań
E-mail: lukasz.wojtyla@amu.edu.pl*

EWOLUCJA SYSTEMÓW OBRONY ANTYOKSYDACYJNEJ*

WSTĘP

Życie na Ziemi jest uzależnione od obecności tlenu. Istnieją jednak organizmy, dla których już niewielka ilość tlenu stanowi śmiertelne zagrożenie. Organizmy takie określamy mianem beztlenowych. W obecnie panujących na naszej planecie warunkach występują one tylko w nielicznych środowiskach, ograniczonych dostępem tlenu. Pamiętajmy jednak, że zanim w atmosferze Ziemi pojawił się tlen, to właśnie takie organizmy były jedynymi mieszkańcami naszej planety. W historii życia na Ziemi jest wiele wydarzeń decydujących o kierunku przebiegu doboru naturalnego i rozwoju życia. Jednym z kluczowych wydarzeń było pojawienie się w składzie atmosfery tlenu. Z jednej strony stworzyło to zagrożenie dla organizmów beztlenowych, z drugiej, umożliwiło rozwój nowych form życia. Jednak organizmy żywe, oprócz wykształcenia tzw. metabolizmu tlenowego, musiały poradzić sobie również z jego toksycznym działaniem. Jednocześnie ze wzrostem stężenia tlenu pojawiło się zagrożenie ze strony jego reaktywnych form. Pierwotne organizmy musiały zatem wykształcić szereg mechanizmów zarówno ochrony, obrony i usuwania, jak i naprawiania skutków szkodliwego działania tlenu. Podobieństwo i uniwersalny charakter wielu z tych form pomiędzy różnymi, często odległymi ewolucyjnie grupami organizmów świadczy o ich wczesnym pochodzeniu.

SKĄD NA ZIEMI WZIAŁ SIĘ TLLEN?

Większość żyjących obecnie organizmów żywych to organizmy przystosowane do życia w warunkach tlenowych. Wiadomo jednak, że skład atmosfery ziemskiej ulegał na przestrzeni wieków istotnym zmianom. Około 4,6 miliarda lat temu ($4,6 \times 10^9$ lat) Ziemia została uformowana jako pozbawiona wody masa skał. Pierwotna atmosfera składała się głównie z wodoru i helu, dopiero na skutek wprowadzenia innych gazów, w tym także pary wodnej, w wyniku kolizji z kometami i meteorytami uformowana została wtórna atmosfera. Początkowo składała się ona głównie z pary wodnej, dwutlenku węgla, tlenku węgla, azotu, chlorku wodoru i wodoru (BENZIE 2000, LANE 2004). Powstający w tym okresie w niewielkich ilościach tlen pochodził z procesów fotolizy wody i był zużywany w procesach utleniania gazów atmosferycznych i minerałów na powierzchni planety oraz ulegał w pewnym stopniu przemianie w ozon (BENZIE 2000, DANOWSKI 2000). Istniał wtedy swoisty mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego, zwany efektem Ureya, polegający na tym, że powstający wolny tlen trafiał do atmosfery, tam ulegał przemianie w ozon i hamował dopływ promieniowania ultrafioletowego, co powodowało zmniejszenie nasilenia fotolizy wody. Kiedy ilość tlenu zmalała w związku z jego zużyciem przez utleniające się minerały, zwiększał się dopływ promieniowania ultrafioletowego.

*Praca finansowana ze środków na działalność statutową Zakładu Fizjologii Roślin Wydziału Biologii UAM S/P-B/010.

Słowa kluczowe: antyoksydanty, ewolucja, reaktywne formy tlenu, tlen

W ten sposób ilość tlenu oscylowała wokół tzw. progu Ureya, który wynosi 0,001 P.A.L. (ang. present atmospheric level), czyli około 0,02% (DANOWSKI 2000).

Około 3,5 miliarda lat temu na Ziemi rozpoczęło się życie. Przeprowadzane przez ówczesne organizmy żywe procesy metaboliczne doprowadziły do stopniowych, aczkolwiek znaczących zmian w składzie atmosfery. Sinice wykorzystujące wodę jako źródło elektronów uwalniały do atmosfery tlen jako produkt uboczny, co doprowadziło do wzrostu jego poziomu do tzw. progu Pasteura (0,01 P.A.L., czyli ok. 0,2%). Jest to poziom, przy którym organizmy określane mianem fakultatywnych tlenowców przestawiają się na metabolizm tlenowy. Tlen był również intensywnie wiązany przez minerały, głównie metale, co przyczyniło się do powstania ich złóż (BENZIE 2000, LANE 2004). Około 2 miliardów lat temu, w wyniku wysycenia się minerałów tlenem i znacznego rozmnożenia się organizmów, doszło do wzrostu stężenia tlenu w atmosferze do około 0,1 P.A.L. (ok. 2%, co odpowiada 15 mmHg), na którym to poziomie zawartość tlenu utrzymywała się przez około miliard lat. Dalszy wzrost poziomu zawartości tlenu nastąpił bardzo gwałtownie w okresie od 1 do 0,5 miliarda lat temu, prowadząc do ustabilizowania się zawartości tlenu w atmosferze na poziomie zbliżonym do obecnego stężenia (ok. 150 mmHg) (KOCH i BRITTON 2008). Wzrost stężenia tlenu spowodował dwa wtórne zjawiska. Pierwszym było wykształcenie tlenowego aparatu oddychania, sprawniejszego niż fermentacja i umożliwiającego organizmom żywym szybszy wzrost. Drugim zjawiskiem było wytworzenie warstwy ozonu w górnych partiach atmosfery, co spowodowało odcięcie dopływu zabójczych promieni jonizujących (głównie UV) do powierzchni Ziemi i umożliwiło z czasem wyjście organizmów na ląd (DANOWSKI 2000, LANE 2004). Trzeba jednak w tym miejscu zaznaczyć, iż wzrost stężenia tlenu w atmosferze, która zawierała go bardzo mało, stanowił zanieczyszczenie toksyczne dla dotychczas rozwijających się organizmów beztlenowych. Sytuacja taka mogła być przyczyną ich masowego wymierania.

POJAWIENIE SIĘ TLENU A ORGANIZMY WIELOKOMÓRKOWE

Pierwotne organizmy żywe, które pojawiły się na Ziemi ok. 3,5 miliarda lat temu, charakteryzowały się budową jednokomórkową. Opierały swój metabolizm energetyczny o reakcje szlaku glikolizy, który funkcjonuje we wszystkich znanych grupach organizmów żywych. Pomimo

tak znaczącego sukcesu ewolucyjnego glikolizy, nie udało się zidentyfikować żadnego współczesnego ani prehistorycznego organizmu żywego zbudowanego z kilku lub z wielu komórek, który opierałby swój metabolizm energetyczny tylko o reakcje glikolizy (CATLING i współaut. 2005). Gwałtowny wzrost poziomu tlenu w atmosferze w wyniku aktywności fotosyntetycznej ówczesnych organizmów żywych, obserwowany ok. 2 miliardy lat temu, związany był z pojawieniem się reakcji oddychania tlenowego. Nabycie nowych możliwości efektywniejszego przetwarzania energii i przejście na metabolizm tlenowy stało się zacznym ewolucji organizmów wielokomórkowych (FALKOWSKI i współaut. 2005, RAYMOND i SEGRE 2006). Reakcje tlenowego oddychania komórkowego dostarczają przynajmniej 4-krotnie więcej użytecznej biologicznie energii niż oddychanie beztlenowe (THANNICKAL 2009). W okresie od 2 do 1 miliarda lat temu pierwsze, małe organizmy wielokomórkowe o prostej budowie osiągnęły znaczny sukces ewolucyjny i szeroko rozprzestrzeniły się na Ziemi. Gwałtowny i znaczny wzrost zawartości tlenu w okresie kolejnych 500 milionów lat, obejmujących okres karbońskiej eksplozji gatunków, wiązał się ze znacznym wzrostem skomplikowania budowy organizmów żywych. W okresie tym powstała większość grup systematycznych zwierząt (KOCH i BRITTON 2008). Porównanie sekwencji aminokwasowych białek przy pomocy metody zegara molekularnego pozwoliło oszacować czas pojawienia się na Ziemi organizmów zbudowanych z różnych typów komórek. Około 2,3 miliarda lat wstecz, czyli krótko po pojawieniu się tlenu w atmosferze, pojawiły się organizmy zbudowane z dwóch lub trzech typów komórek. Wraz ze wzrostem zawartości tlenu wzrastał stopień skomplikowania budowy, prowadząc do powstania organizmów zbudowanych ze 120 różnych typów komórek, co według szacunków miało miejsce 0,5 miliarda lat temu (HEDGES i współaut. 2004). Geofizyczne analizy zawartości tlenu w atmosferze sugerują znaczne wahania jego poziomu w historii dziejów życia na Ziemi. Szacuje się, że w okresie około 300 milionów lat wstecz, wskutek gwałtownego rozwoju roślinności na lądzie, zawartość tlenu znacznie przekraczała obecny poziom, wzrastając do około 35% (ok. 260 mmHg). Wysoka zawartość tlenu w atmosferze sprzyjała rozwojowi owadów o olbrzymich rozmiarach, u których dyfuzja gazów w obrębie ciała ograniczona była sprawnością systemu trachealnego (KOCH i BRITTON 2008). Jednocześnie wysoka zawartość tlenu oraz

wzrost średnich wartości temperatury sprzyjał rozprzestrzenianiu się samoistnych pożarów wielkich lasów karbońskich (LANE 2004).

REAKTYWNE FORMY TLENU

Paradoksalnie, metabolizm tlenowy oprócz istotnych korzyści, niesie ze sobą poważne zagrożenia. W wielu metabolicznych procesach, takich jak transport elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, fotosynteza i fotooddychanie, β -oksydacja kwasów tłuszczowych, oraz w odpowiedzi na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe powstają reaktywne formy tlenu (RFT). Powstają one wówczas, kiedy cząsteczka tlenu nie ulega pełnej redukcji do wody, reaguje z innymi związkami jednonielektronowo lub w wyniku jej wzbudzenia. Ważną cechą charakterystyczną dla tej grupy związków jest ich wysoka reaktywność. Do najważniejszych RFT zalicza się: anionorodnik nadadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) i rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), jak również ozon (O_3), nadtlenek wodoru (H_2O_2), tlenek azotu ($NO\cdot$), rodnik semichinonowy ($H-Ch\cdot$), a także związki takie jak: kwas podchlorawy ($HOCl$), nadtlenki ($ROOH$), czy epitlenki – epoksydy. Najbardziej reaktywne, a więc najbardziej szkodliwe dla komórki są anionorodnik nadadtlenkowy i rodnik hydroksylowy. Ze względu na swoją wysoką reaktywność reagują one niespecyficznie ze składnikami komórek powodując ich uszkodzenia i/lub modyfikacje. Jest to niewątpliwie nierozłączny koszt życia w atmosferze tlenowej (BARTOSZ 2003, LANE 2004).

Obecność RFT i negatywne skutki ich działania prawdopodobnie przyczyniły się do wytworzenia systemów obronnych, które skutecznie chroniły komórki przed powstawaniem reaktywnych form tlenu, efektywnie eliminowały powstające RFT i nie dopuszczały do reakcji między nimi a składnikami komórek. Ze względu na swoją wysoką reaktywność, RFT mogą reagować niemal ze wszystkimi napotkanymi związkami, powodując zmiany aktywności enzymatycznej białek, uszkodzenia błon komórkowych, modyfikacje struktury ważnych związków, np. nienasyconych kwasów tłuszczowych, a nawet wpływać mutagennie i degradować kwasy nukleinowe, DNA i RNA. Pośrednich dowodów na wykształcenie się mechanizmów obrony antyoksydacyjnej w odpowiedzi na pojawienie się RFT dostarczają wyniki badań nad sympatryczną koewolucją organizmów w układzie pasożyt-żywciciel na przykładzie wzajemnej interakcji (atak-obrona) pomiędzy *Schistosoma mansoni* a *Biomphalaria glabrata*. Badania te wskazują na

bezpośrednią zależność poziomu wolnych rodników i związków antyoksydacyjnych u obu organizmów (MONÉ i współaut. 2011). Znaczenie RFT w interakcji pomiędzy dwoma grupami organizmów i ich wspólnej ewolucji dyskutowane jest również jako kluczowe zagadnienie w komunikacji pomiędzy rośliną a grzybem w symbiotycznym układzie mikoryzowym (RODRIGUEZ i REDMAN 2005). Wzrost poziomu RFT w odpowiedzi na wczesną percepcję czynnika stresowego przez roślinę powoduje zwiększoną syntezę proliny, aminokwasu o właściwościach antyoksydacyjnych, w komórkach grzyba i rośliny. Jednocześnie kontakt rośliny z grzybem może powodować podwyższony poziom proliny w komórkach roślin, co predysponuje ją do zwiększonej odporności na warunki stresowe (CHEN i DICKMAN 2005, RODRIGUEZ i REDMAN 2005).

Jednak hipoteza, że to właśnie akumulacja tlenu w atmosferze w wyniku reakcji oksydacyjnej fotosyntezy oraz ewolucyjne przejście organizmów na metabolizm tlenowy stało się przyczyną i wymusiło powstanie mechanizmów obrony antyoksydacyjnej, nie jest jednoznacznie udowodniona. Alternatywna hipoteza zakłada, że pierwotne mechanizmy antyoksydacyjne mogły wykształcić się już wcześniej w organizmach beztlenowych, chroniąc je przed toksycznym działaniem tlenu powstającego w niebiologicznych reakcjach fotolizy wody (THOMAS i współaut. 2008). Na korzyść tej drugiej hipotezy przemawia fakt, że wiele z ewolucyjnie konserwatywnych enzymów o funkcjach antyoksydacyjnych takich jak: dysmutazy nadadtlenkowe, reduktazy nadadtlenkowe, katalazy, czy peroksydazy, jest szeroko rozpowszechniona wśród różnych grup organizmów żywych, w tym również wśród współczesnych organizmów beztlenowych i archeabakterii (KORNAS i współaut. 2010).

Inną strategią stało się równoczesne wykorzystanie reaktywnych form tlenu, a zwłaszcza niektórych związków do nich zaliczanych, jako substancji sygnałnych. Poprzez wytworzenie mechanizmów wykrywania ich obecności stało się możliwe odbieranie i reagowanie na sytuacje i bodźce, które sprzyjają produkcji RFT. Potencjalne wykorzystanie RFT może mieć miejsce w mechanizmach obronnych w postaci tzw. zjawiska wybuchu tlenowego. Niektóre rośliny zdolne są także do wydzielania do środowiska zewnętrznego związków o charakterze RFT (przeważnie nadadtlenku wodoru), co może mieć znaczenie obronne przed patogenami oraz uczestniczyć w komunikacji ze środowiskiem (SCHOPFER i współaut. 2001).

WCZESNE MECHANIZMY OCHRONY PRZED REAKTYWNYMI FORMAMI TLENU

Postępujące zmiany w składzie atmosfery ziemskiej były czynnikiem, który w istotny sposób wpływał na kierunek zmian ewolucyjnych. Organizmy żywe musiały zaadaptować się do nowych warunków, aby móc przeżyć w nowym środowisku. Te, którym to się udało zwiększały swoje szanse na przeżycie i pozostawienie potomstwa, a te, które nie wykształciły odpowiednich mechanizmów, przegrywały w konkurencji i skazane zostały na wymarcie. Pierwszym czynnikiem mającym ogromny wpływ na kierunek zmian ewolucyjnych stało się zmniejszenie stężenia wodoru w atmosferze do poziomu, który był niewystarczający dla organizmów wykorzystujących go w procesach energetycznych. Sytuacja ta promowała rozwój przodków cyjanobakterii, którzy potrafili wykorzystać wodę jako łatwo dostępne, alternatywne źródło elektronów oraz pojawienie się procesów chemo- i fotosyntezy (BENZIE 2000). Proces ten niósł ze sobą jednak ryzyko zwiększonego narażenia na działanie powstających w jego trakcie reaktywnych form tlenu. Wymusiło to rozwój bardziej zaawansowanych systemów antyoksydacyjnych, w tym również syntezę związków takich jak askorbinian (GEST i współaut. 2012). Ciągłe wzrastające stężenie tlenu wymusiło na organizmach wykształcenie nowych szlaków metabolicznych pozwalających wykorzystać cząsteczkę tlenu jako ostateczny akceptor elektronów. W ten sposób powstały organizmy o metabolizmie tlenowym, które w relatywnie krótkim okresie stały się dominującą formą życia na Ziemi. U części organizmów tlenowych rozwinęła się zdolność do przeprowadzania procesu fotosyntezy. W warunkach tlenowych zachodzi ona tylko u eubakterii (cyjanobakterii i w plastydach powstałych na drodze endosymbiozy), natomiast nie jest spotykana u archeobakterii (CASTRESANA i współaut. 1994). Rozwój metabolizmu tlenowego zachodził równocześnie z ulepszaniem i rozwijaniem systemów chroniących komórki przed toksycznym działaniem produktów niepełnej redukcji cząsteczki tlenu (BENZIE 2000).

Niewątpliwie bardzo ważnymi enzymami w metabolizmie tlenowym są oksydazy końcowe. Katalizują one metaboliczne przeniesienie elektronów na cząsteczkę akceptora, którym w przypadku metabolizmu tlenowego jest atom tlenu, z wytworzeniem wody. Większość białek o funkcji oksydaz końcowych stanowią te zaliczane do nadrodziny białek hemowo-miedziowych. Najważniejszą grupę stanowią oksydazy cytochromowe, w tym głównie cytochromu c.

Duże zainteresowanie budzi także oksydaza alternatywna odporna na cyjanek, obecna w mitochondriach roślin, niektórych grzybów i pierwotniaków. Białka zaliczane do nadrodziny hemowo-miedziowej różnią się budową w dość znacznym stopniu, jednak porównanie modeli trójwymiarowej struktury podjednostek I i II wskazuje na znaczne podobieństwo pomiędzy oksydazami tak odległych grup systematycznych jak ssaki i bakterie (PEREIRA i współaut. 2001). Sekwencje kodujące oksydazę cytochromową występują zarówno w genomach bakterii, jak i u archeobakterii. Może to świadczyć o pojawieniu się pierwotnej oksydazy cytochromowej, zwanej uroksydazą, jeszcze przed oddzieleniem się linii ewolucyjnych prowadzących do bakterii i archeobakterii. Postuluje się, że w pierwotnym organizmie, tzw. LUCA (ang. Last Universal Common Ancestor, Ostatni Uniwersalny Wspólny Praprzodek), obecne były przynajmniej trzy różne typy oksydaz. W okresie kiedy taki pierwotny organizm żył na Ziemi, atmosfera była niemal pozbawiona obecności tlenu. Pewne jego ilości powstawały jednak w procesie fotolizy wody. Mogły one tworzyć lokalne obszary, w których stężenie tlenu w powierzchniowych warstwach wody mogło być wyższe. Obecność oksydaz mogła chronić komórki przed toksycznym działaniem tlenu. Inną możliwością jest istnienie oksydaz, które mogły przekazywać elektrony na cząsteczki o podobnej konfiguracji elektronowej, jak np. azot lub tlenek azotu. Kiedy stężenie tlenu w atmosferze zaczęło rosnąć, enzym ten został włączony w łańcuch transportu elektronów dając tym samym ewolucyjną przewagę tym organizmom (CASTRESANA i współaut. 1994). Odmienne spojrzenie na taką kolejność zdarzeń prezentuje amerykański zespół uczonych. Przeprowadzając dokładną analizę nie tylko sekwencji oksydazy cytochromu c i oksydazy chinolowej, ale uwzględniając również ich funkcje sugerują oni, że proces oddychania tlenowego jest ewolucyjnie starszy od oddychania azotowego i reakcji fotosyntezy. Oba wspomniane typy reakcji wymagają obecności cytochromu *bc1*, który pojawił się w późniejszych stadiach ewolucji oddychania tlenowego (MUSSER i CHAN 1998).

Inna hipoteza proponuje udział w procesie redukcji tlenu do wody prymitywnych enzymów, należących do rodziny dwużelazowych białek typu R2. Hipoteza ta opiera się na badaniach porównawczych sekwencji i struktury białek typu R2 oraz ferrytryn, bakterioferrytryn i rubrerytryn, włączając je, razem z białkami typu R2, do wspólnej nadrodziny białek dwużelazowych. Do rodziny tej należą między innymi: oksydaza alternatywna, podjednostka R2 reduktazy

rybonukleotydowej, podjednostka o aktywności hydroksylazy z monooksygenazy metanu oraz Δ^9 -desaturaza. Cechą wspólną tych białek jest posiadanie w centrum aktywnym enzymu dwóch niehemowo związanych atomów. Obecnie zakres reakcji katalizowanych przez te enzymy jest bardzo szeroki, niemniej jednak większość z nich opiera się o mechanizm reakcji redoks. Najbardziej prymitywnym enzymem z tej grupy wydaje się rubrerytryna (Rbr) i białka jej pokrewne, których sekwencje zlokalizowane zostały we wszystkich żywych organizmach (GOMES i współaut. 2001, MOORE i współaut. 2002). Pewnych odpowiedzi na temat pierwotnych mechanizmów obrony przed RFT dostarczają wyniki badań konserwatywnych sekwencji białkowych, szeroko rozpowszechnionych wśród organizmów żywych. Niezmiernie interesującą pod tym kątem grupę organizmów stanowią termofilne archeobakterie, które ze względu na pozycję w drzewie filogenetycznym posiadają głęboko zakorzenione ewolucyjnie mechanizmy odpowiedzialne za ochronę komórki przed toksycznym działaniem RFT. Do grupy tych organizmów należy m.in. *Sulfolobus solfataricus*, u którego zidentyfikowano białko strukturalnie podobne do klasy białek wiążących się do DNA charakterystycznych dla głodzonych komórek (ang. Dps-like). Białko to posiada motywy charakterystyczne dla nadrodziny białek dwużelazowych, zawierającej inne białka Dps, ferrytyny i bakterioferrytyny, zgrupowane w trzech podklasach. Białka te tworzą multimeryczne struktury klatkowe sekwestrujące jony żelaza. W odróżnieniu jednak od ferrytyn i bakterioferrytyn wiążące jony żelaza tylko przy ich wysokim stężeniu i utleniających jony żelaza Fe^{2+} do Fe^{3+} w obecności tlenu, białka Dps posiadają zdolność do wiązania i utleniania żelaza tylko w obecności nadtlenu wodoru. Podejrzewa się, że białka te pełnią ważną funkcję w obronie komórki przed niekorzystnymi konsekwencjami stresu oksydacyjnego i nadmiernej akumulacji nadtlenu wodoru (WIEDENHEFT i współaut. 2005). Ze względu na ewolucyjnie zakonserwowany charakter tych białek oraz usytuowanie w pozycji filogenetycznej archeobakterii uważa się, że białka te, lub im podobne, mogły pełnić ważną rolę w ewolucji mechanizmów obrony antyoksydacyjnej.

Kolejną grupą białek o ewolucyjnie zakonserwowanej strukturze są białka podobne do rubrerytryny (ang. Rbr-like). Do tej pory udało się zidentyfikować kilka typów białek zaliczanych do tej grupy. Do grupy tej sklasyfikowano również sulerytrynę zidentyfikowaną w *Sulfolobus tokodaii*, która należy do tlenowych archeobakterii. Białko to charakteryzuje się posiadaniem pojedyn-

czej domeny typu Rbr-like, charakterystycznej dla grupy białek szeroko rozpowszechnionych wśród bakterii o metabolizmie tlenowym lub fakultatywnie tlenowym, podczas gdy białka zawierające typową domenę Rbr występują w grupie bakterii beztlenowych. Sugeruje się zatem udział białek posiadających pojedynczą domenę podobną do rubrerytryny w obronie komórek przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego w środowiskach tlenowych. Wydaje się, że pierwotną funkcją tych białek mogła być redukcja tlenu do wody. Reakcją taką obecnie katalizuje oksydaza alternatywna, jednak inne białka z tej grupy w specyficznych warunkach (brak właściwego substratu, obecność tlenu i reduktora dostarczającego elektrony) również są w stanie katalizować reakcję redukcji tlenu do wody (GOMES i współaut. 2001, MOORE i współaut. 2002). Mechanizm dwuelektronowej redukcji nadtlenu wodoru do wody katalizowanej przez dwużelazową domenę białek podobnych do ferrytyny został zaproponowany przez IYER i współaut. (2005). Oksydaza alternatywna katalizuje czteroelektronową redukcję tlenu do wody, jednak bez wytworzenia energii w postaci biologicznie dostępnej. Energia uwalniana podczas tego procesu ulega rozproszeniu w postaci ciepła. Jej potwierdzoną biologiczną funkcją jest udział w termogenezie u roślin z rodziny Araceae, jednak postuluje się udział oksydazy alternatywnej w regulacji potencjału energetycznego i redukcyjnego komórki oraz ochronę przed powstawaniem reaktywnych form tlenu poprzez utlenianie ubichinolu, który jest jednym ze źródeł RFT (JUSZCZUK i RYCHTER 2003, MAŁECKA i TOMASZEWSKA 2005, VANLERBERGHE 2013).

Kolejną, starą ewolucyjnie grupą białek o właściwościach antyoksydacyjnych są peroksyredoksyny. Obecność białek z tej rodziny stwierdzono u wszystkich grup organizmów żywych, włączając w to bardzo prymitywne archeobakterie. Pierwszym dość szczegółowo poznanym białkiem, zaklasyfikowanym do tej rodziny jest peroksydaza tioredoksyny. Chroni ona białka, DNA i lipidy przed skutkami stresu oksydacyjnego (LIM i współaut. 1993). Peroksyredoksyny charakteryzują się odmiennym od innych znanych enzymów antyoksydacyjnych mechanizmem katalizowanej reakcji. Nie posiadają w swojej strukturze jonów metali, które byłyby mocno związane z cząsteczką białka. Obserwuje się to w przypadku dysmutazy ponadtlenkowej zawierającej atomy żelaza, manganu lub miedzi i cynku, peroksydazy glutationowej wiążącej selen lub hemowe albo flawinowe grupy prostetyczne czy katalazy zawierającej strukturę hemową. Właściwości antyoksydacyjne peroksyredoksyn przypisywane są

ich zdolności do rozkładu nadtlenu alki-
lu i nadtlenu wodoru, co chroni komórki
przed powstawaniem rodnika hydroksylo-
wego (MCGONIGLE i współaut. 1998). Jedno-
cześnie eukariotyczne peroksyredoksy-
ny 2-Cys Prxs nie tylko pełnią funkcje antyoksydacyj-
ne, ale uczestniczą również w regulacji sys-
temów sygnalizacji angażujących nadtlenu
wodoru (WOOD i współaut. 2003). Dane te
pozwalają przypuszczać, że pewne elementy
pierwotnych systemów antyoksydacyjnych w
toku ewolucji nabyły nowych funkcji zwią-
zanych z sygnalizacją i przekazywaniem infor-
macji.

Jedną z najbardziej szkodliwych form
RFT jest rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$), jednak
ze względu na jego wysoką reaktywność nie
jest możliwe istnienie biologicznego mecha-
nizmu wybiórczego usuwania tej właśnie for-
my. Z tego powodu rozwinęły się systemy
zapobiegające jego produkcji i ją ogranicza-
jące. Inne mechanizmy obrony przed RFT,
to usuwanie nadtlenu wodoru, dysmuta-
cja anionorodnika nadadtlenkowego, reakcje
zmiatania wolnych rodników i rozpraszania
nadmiaru energii. Wiele enzymów katalizu-
jących te reakcje obecnych jest w większo-
ści organizmów o metabolizmie tlenowym, co
nasuwa przypuszczenie, że powstały one na
bardzo wczesnych etapach ewolucji. Jednak
nie tylko enzymy zaangażowane są w obro-
nę komórki przed RFT. W usuwaniu i wyła-
pywaniu RFT uczestniczą także systemy nie-
enzymatyczne. Zaliczamy do nich jony meta-
li, głównie manganu, oraz niskocząsteczkowe
antyoksydanty rozpuszczalne w wodzie lub
w tłuszczach. Do związków rozpuszczających
się w wodzie należą: askorbinian, glutation,
homoglutation, cysteinę, melatoninę, kwas
moczowy, kreatyninę, karnozynę, pterydy-
nę, neopterynę, antocyjaniny i flawonoidy.
Głównymi zmiataczami RFT rozpuszczalnymi
w tłuszczach są: α -tokoferol znany jako
witamina E, karotenoidy, oksykarotenoidy,
czyli ksantofile, bilirubina, biliwerdyna, zre-
dukowana forma kwasu α -liponowego oraz
przynajmniej poza mitochondriami koenzym
Q – ubihydrochinon (związek odpowiedzialny
za uwalnianie anionorodnika nadadtlenkowie-
go przez mitochondria), a także żeńskie hor-
mony płciowe, pochodne estronu i estradio-
lu oraz produkty ich metabolizmu (Bartosz
2003). Jony metali, zwłaszcza z grupy meta-
li przejściowych, pełnią bardzo istotną funk-
cję również w powstawaniu RFT. Najistot-
niejsze są jony żelaza Fe^{2+} , które katalizu-
jąc tzw. reakcję Fentona przyczyniają się do
produkcji rodnika hydroksylowego (BARTOSZ
2003). Zaangażowanie jonów żelaza w pro-
ces powstawania rodnika hydroksylowego,
mogło promować rozwój takich układów bio-
logicznych, w których stężenie wolnego żela-

za będzie jak najniższe. Należy pamiętać, że
we wczesnych etapach rozwoju życia na Zie-
mi stężenie żelaza w postaci rozpuszczalnego
jonu Fe^{2+} było wysokie, dopiero na skutek
pojawienia się w atmosferze tlenu doszło do
jego utlenienia do nierozpuszczalnego Fe^{3+}
i wytrącenia się złóż rud żelaza. W układach
biologicznych nastąpiło związanie jonów że-
laza w układach hemowych, a także w nie-
hemowych, jak np. w oksydazie alternatyw-
nej, katalazie czy w peroksydazach i wyko-
rzystanie do katalizowania reakcji biologicz-
nych. Również mangan, który w stanie nie-
związanym pełni funkcję antyoksydacyjną,
został włączony we wczesne systemy usuwa-
nia anionu nadadtlenkowego. Występowanie
jonów manganu, podobnie jak jonów żela-
za, w budowie enzymów antyoksydacyjnych
jest szeroko rozpowszechnione. Podobnie jak
w przypadku żelaza ma to związek z pier-
wotnym składem środowiska zewnętrznego,
ponieważ rozpuszczalne, a zatem bioprzy-
swajalne formy tych właśnie metali były w
tamtych czasach najbardziej dostępne. Młod-
sze ewolucyjnie są układy zawierające w
swoim centrum aktywnym atom miedzi, np.
miedziowo-cynkowe dysmutazy nadadtlenko-
we. Dla przykładu, pierwotnie symbiotyczne
organelle, takie jak mitochondria, zawierają
manganową formę dysmutazy. Dodatkowo,
forma manganowa i żelazowa są struktural-
nie homologiczne, natomiast różnią się bu-
dową od form zawierających miedź (BENZIE
2000, MAŁECKA i TOMASZEWSKA 2005).

Ochrona komórek przed działaniem RFT
nie polegała tylko na rozwoju enzymatycz-
nych mechanizmów inaktywacji szkodli-
wych produktów ubocznych metabolizmu
tlenowego. Również fizyczne bariery zmniejs-
zające ryzyko powstawania RFT stały się
bardzo ważne dla ówczesnych organizmów.
Depozycja w błonach komórkowych sub-
stancji takich jak barwniki zmniejszała na-
rażenie komórki na działanie promieni UV,
które między innymi są źródłem RFT (np.
poprzez prowadzenie do zjawiska fotolizy
wody). Dodatkowo, substancje te zmniejs-
zały skutki negatywnego działania RFT na
błony biologiczne i ich składniki, jak np.
peroksydacja lipidów czy uszkodzenia bia-
łek błonowych. Źródłem RFT są również
stresy biotyczne i abiotyczne: zmiany tem-
peratury, ciśnienia osmotycznego, dostęp-
ności tlenu, atak patogenów, uraz mecha-
niczny. Bariery takie jak błony biologiczne
i ściany komórkowe mają na celu zapew-
nienie maksymalnej stałości środowiska
wewnętrznego, a tym samym ograniczenie
negatywnego wpływu zmian zachodzących
w środowisku zewnętrznym, przekazują-
jąc jednak informacje o tych zmianach do
wnętrza komórki.

WYKORZYSTANIE RFT PRZEZ KOMÓRKI

Od czasów, kiedy w atmosferze ziemskiej pojawił się tlen, organizmy żywe musiały zmagać się ze szkodliwym i toksycznym działaniem jego reaktywnych form. W konsekwencji wszystkie organizmy musiały rozwinąć szereg efektywnych systemów obrony przed toksycznym działaniem RFT. W ostatnich latach odkryto jednak, że RFT oprócz znanej szkodliwej roli, pełnią również bardzo istotne i ważne funkcje. Zaobserwowano bowiem udział reaktywnych form tlenu w regulacji i kontroli różnych procesów biologicznych, takich jak: wzrost, cykl komórkowy, programowana śmierć komórki, sygnalizacja hormonalna, odpowiedź na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe, a także w procesach rozwojowych (HALLIWELL 2006). Udział RFT jako cząsteczek sygnałowych sugeruje, że w toku ewolucji komórki osiągnęły nad nimi wysoki poziom kontroli. Duża liczba zidentyfikowanych genów, których poziom ekspresji zależy od stężenia odpowiednich RFT dowodzi istnienia szerokiej sieci powiązań i zależności związanej z biologią reaktywnych form tlenu (MITTLER i współaut. 2004). Udział w programowanej śmierci komórki oraz w systemach obrony przed patogenami również jest coraz lepiej udokumentowany. Wydzielany do środowiska zewnętrznego nadtlenek wodoru może pełnić podobną rolę jak 3% woda utleniona (również H_2O_2). Wybuch tlenowy, czyli gwałtowne uwolnienie dużych ilości RFT, towarzyszy atakom patogenów, ale obserwowany jest również w sytuacjach kontaktu z substancjami toksycznymi. Jedną z hipotez szukających przyczyn starzenia się komórek wskazuje reaktywne formy tlenu i rodniki jako jedną z głównych przyczyn. Na temat biologicznej roli i znaczenia RFT pojawia się ostatnio dużo nowych doniesień. Prowadzone badania pozwolą na pełniejsze zrozumienie ich biologii, niewątpliwie jednak reaktywne formy tlenu są nieodłącznym produktem ubocznym metabolizmu tlenowego. Początkowo pojawienie się RFT wywoływało niewątpliwie znacznie poważniejsze uszkodzenia komórek niż obecnie. Bezpośredni kontakt RFT z kwasami nukleinowymi sprzyjał pojawianiu się szeregu uszkodzeń i mutacji. Sytuacja ta z jednej strony mogła wywołać presję selekcyjną promującą rozwój tych organizmów, które wyposażone były w lepsze systemy obrony przed negatywnymi skutkami działania RFT, z drugiej, poprzez zwiększenie częstotliwości pojawiania się mutacji, mogła przyspieszyć tempo ewolucji i proces przystosowywania się organizmów do nowych, zmieniających się warunków egzystencji. Wyewoluowanie

precyzyjnych mechanizmów chroniących komórki przed uszkodzeniami powodowanymi przez RFT oraz niedopuszczających do ich nadmiernego nagromadzenia się umożliwiło jednocześnie ukształtowanie się systemu reagowania na zmiany ich zawartości. Takie rozwiązanie stwarzało niewątpliwie duże korzyści poprzez możliwość szybkiego reagowania na zmieniające się warunki, co pozwoliło wykorzystać zmiany poziomu RFT jako jednego z elementów układu sensorycznego (LANE 2004). Sugeruje się, że pierwszym układem sensorycznym, jaki funkcjonował u pierwotnych organizmów żywych, na długo zanim atmosfera ziemską została wzbogacona w tlen, był system sygnalizacji oparty na zmianach poziomu redukcji komponentów komórkowych, tzw. system redoks (FOYER i ALLEN 2003), w którym RFT, jako cząsteczki o właściwościach utleniających, są tylko jednym z elementów. W system sygnalizacji poprzez zmiany poziomu redoks zaangażowane są również tioredoksyny, peroksyredoksyny i sulforedoksyny, w modyfikacji których uczestniczą zarówno reaktywne formy tlenu, jak i azotu (SEVILLA i współaut. 2015) oraz inne związki zawierające grupy tiolowe, w tym glutation (ŚLESIAK i współaut. 2007). Wraz z upływem czasu komórki nie tylko „nauczyły się” żyć w obecności RFT, ale także „wykorzystywać” je dla swoich potrzeb i korzyści (LANE 2004). Współczesne analizy zależności pomiędzy różnymi szlakami sygnalizacji wewnątrz- i międzykomórkowej wskazują na centralną rolę RFT w komunikacji i krzyżowym przekazywaniu informacji pomiędzy różnymi komponentami komórki (PETROV i BREUSEGEM 2012). Zarówno systemy usuwania, jak i produkcji RFT współtworzą skomplikowaną sieć zależności i komunikacji regulującą metabolizm komórki i uczestniczącą w odpowiedzi na zmiany zachodzące w środowisku (MAATY i współaut. 2009, MITTLER i współaut. 2011). Złożoność i powszechność szlaków sygnalizacji angażujących RFT i związki im pokrewne, takie jak reaktywne formy azotu i siarki oraz produkty ich reakcji ze składnikami komórki, świadczą o korzyściach ewolucyjnych wynikających z takiego rozwiązania.

Streszczenie

Życie na Ziemi rozwijało się w drodze ewolucji przez około 3,5 miliarda lat. Procesowi temu towarzyszyły zmiany składu atmosfery, w tym zmiany zawartości tlenu. Pierwotne organizmy rozwinęły się w warunkach, kiedy zawartość tlenu w atmosferze oscylowała wokół poziomu 0,02%. Nabycie przez organizmy zdolności do pozyskiwania energii na drodze reakcji fotosyntezy i katalizowania rozszczepienia cząsteczki wody z wykorzystaniem energii słonecznej zapoczątkowało stopniowe zwiększenie się zawartości tlenu w atmosferze i umożliwiło wykształcenie metabolizmu tlenowego. Wzrastająca

zawartość tlenu, ze względu na jego właściwości utleniające, była toksyczna dla ówczynie żyjących organizmów. Stało się to przyczyną promowania w toku ewolucji rozwoju wczesnych mechanizmów antyoksydacyjnych oraz wykształcenia nowych sprawniejszych układów mających na celu usuwanie nadmiaru niebezpiecznych reaktywnych form tlenu. Przez lata organizmy nabyły zdolność do regulowania ilości powstających reaktywnych form tlenu oraz wykorzystywania ich obecności w procesach sygnalizacji i przekazywania informacji.

LITERATURA

- BARTOSZ G., 2003. *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- BENZIE I. F. F., 2000. *Evolution of antioxidant defence mechanisms*. Eur. J. Nutr. 39, 53-61.
- CASTRESANA J., LÜBBEN M., SARASTE M., HIGGINS D. G., 1994. *Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen*. EMBO 13, 2516-2525.
- CATLING D. C., GLEIN C. R., ZAHNLE K. J., MCKAY C. P., 2005. *Why O₂ is required by complex life on habitable planets and the concept of planetary 'oxygenation time'*. Astrobiology 5, 415-438.
- CHEN C., DICKMAN M. B., 2005. *Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen Colletotrichum trifolii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 3459-3464.
- DANOWSKI J., 2000. *Repetitorium dla kandydatów na akademie medyczne. Biologia tom I*. Oficyna Wydawnicza MEDYK, Warszawa.
- FALKOWSKI P. G., KATZ M. E., MILLIGAN A. J., FENNEL K., CRAMER B. S., AUBRY M. P., BERNER R. A., NOVACEK M. J., ZAPOL W. M., 2005. *The rise of oxygen over the past 205 million years and the evolution of large placental mammals*. Science 309, 2202-2204.
- FOYER C. H., ALLEN J. F., 2003. *Lessons from redox signaling in plants*. Antioxid. Redox Signal. 5, 3-5.
- GEST N., GAUTIER H., STEVENS R., 2012. *Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule?* J. Exp. Bot. doi:10.1093/jxb/ers297.
- 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. 7/8, 583-585.
- HALLIWELL B., 2006. *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. Plant Physiol. 141, 312-322.
- HEDGES S. B., BLAIR J. E., VENTURI M. L., SHOE J. L., 2004. *A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life*. BMC Evol. Biol. 4, 2.
- IYER R. B., SILAGHI-DUMITRESCU R., KURTZ D. M. JR., LANZILLOTTA W. N., 2005. *High resolution crystal structures of Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough) nigerthrin: facile, redox-dependent iron movement, domain interface variability, and peroxidase activity in the rubrerythrins*. J Biol Inorg Chem 10, 407-416.
- JUSZCZUK I. M., RYCHTER A. M., 2003. *Alternative oxidase in higher plants*. Acta Biochim. Polon. 50, 1257-1271.
- KOCH L. G., BRITTON S. L., 2008. *Aerobic metabolism underlies complexity and capacity*. J. Physiol. 586, 83-95.
- KORNAS A., KUZNIAK E., ŚLESIAK I., MISZALSKI Z., 2010. *The key role of the redox status in regulation of metabolism in photosynthesizing organisms*. Acta Biochim. Polon. 57, 143-151.
- LANE N., 2004. *Tlen. Cząsteczka, która stworzyła świat*. Prószyński i S-ka, Warszawa.
- LIM Y. S., CHA M. K., KIM H. K., UHM T. B., PARK J. W., KIM K., KIM I. H., 1993. *Removal of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 192, 273-280.
- MAATY W. S., WIEDENHEFT B., TARLYKOV P., SCHAFF N., HEINEMANN J., ROBISON-COX J., VALENZUELA J., DOUGHERTY A., BLUM P., LAWRENCE C.M., DOUGLAS T., YOUNG M. J., BOTHNER B., 2009. *Something old, something new, something borrowed; How the thermoacidophilic archaeon Sulfolobus solfataricus responds to oxidative stress*. PLoS ONE 4, e6964. doi:10.1371/journal.pone.0006964.
- MAŁECKA A., TOMASZEWSKA B., 2005. *Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne*. Post. Biol. Kom. 32, 311-325.
- MCGONIGLE S., DALTON J. P., JAMES E. R., 1998. *Peroxidoxins: a new antioxidant family*. Parasitology Today 14, 139-145.
- MITTLER R., VANDERAUWERA S., GOLLERY M., VAN BREUSEGEM F., 2004. *Reactive oxygen gene network of plants*. Trends Plant Sci. 9, 490-498.
- MITTLER R., VANDERAUWERA S., SUZUKI N., MILLER G., TOGNETTI V. B., VANDEPOELE K., GOLLERY M., SHULAEV V., VAN BREUSEGEM F., 2011. *ROS signaling: the new wave?* Trends Plant Sci. 16, 300-309.
- MONÉ Y., RIBOU A. C., COSSEAU C., DUVAL D., THÉRON A., MITTA G., GOURBAL B., 2011. *An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata interactions*. Int. J. Parasitol. 41, 721-730.
- MOORE A. L., ALBURY M. S., CRICHTON P. G., AFFOURTIT C., 2002. *Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger?* Trends Plant Sci. 7, 478-481.
- MUSSER S. M., CHAN S. I., 1998. *Evolution of the cytochrome c oxidase proton pump*. J. Mol. Evol. 46, 508-520.
- PEREIRA M. M., SANTANA M., TEIXEIRA M., 2001. *A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases*. Biochim. Biophys. Acta 1505, 185-208.
- PETROV V. D., BREUSEGEM F. V., 2012. *Hydrogen peroxide - a central hub for information flow in plant cells*. AoB Plants pls014; doi:10.1093/aobpla/pls014.
- RAYMOND J., SEGRE D., 2006. *The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life*. Science 311, 1764-1767.
- RODRIGUEZ R., REDMAN R., 2005. *Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 3175-3176.
- SEVILLA F., CAMEJO D., ORTIZ-ESPÍN A., CALDERÓN A., LÁZARO J. J., JIMÉNEZ A., 2015. *The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species*. J. Exp. Bot. 66, 2945-2955.
- SCHOPFER P., PLACHY C., FRAHRY G., 2001. *Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid*. Plant Physiol. 125, 1591-1602.

- ŚLESIAK I., LIBIK M., KARPINSKA B., KARPINSKI S., MISZALSKI Z., 2007. *The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses*. Acta Biochim. Polon. 54, 39-50.
- THANNICKAL V. J., 2009. *Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 40, 507-510.
- THOMAS D. J., BOLING J., CROWELL C. M., EUBANKS L. M., MCCARTHY N., MC-SPADEN T., RECTOR C., SCHUCHARDT C. L., SPURLOCK C. J., WARRINGTON J., 2008. *A test of the oxygen paradox using antioxidant-deficient cyanobacteria*. Gravitacion Space Biol. 21, 27-28.
- 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.
- WIEDENHEFT B., MOSOLF J., WILLITS D., YEAGER M., DRYDEN K. A., YOUNG M., DOUGLAS T., 2005. *An archaeal antioxidant: Characterization of a Dps-like protein from Sulfolobus solfataricus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 10551-10556.
- WOOD Z. A., POOLE L. B., KARPLUS P. A., 2003. *Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling*. Science 300, 650-653.

KOSMOS Vol. 65, 2, 207-215, 2016

EVOLUTION OF ANTIOXIDATIVE SYSTEMS

ŁUKASZ WOJTYŁA, MAŁGORZATA GARNCZARSKA

Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznan, Umultowska 89, 61-614 Poznan, E-mail: lukasz.wojtyla@amu.edu.pl

Summary

Life on Earth had evolved about 3.5 billion years ago. Evolutionary processes were accompanied by changes in the composition of the atmosphere, including changes in oxygen level. Primitive organisms have evolved in an environment in which the atmospheric oxygen content was fluctuating around 0.02% . These organisms, after having acquired the ability to generate energy through the process of photosynthesis and to catalyze splitting of water using solar energy, gave rise to gradual increase of the oxygen level in the atmosphere and provided a basis for the evolution of aerobic metabolism. The increased oxygen level, due to its oxidizing properties, appeared toxic to living organisms. This led to the development of early antioxidant mechanisms and their further evolution to more efficient systems for removal of dangerous reactive oxygen species. In the course of the evolution, organisms have acquired ability to control the amount of generated reactive oxygen species and to use them in signaling processes and transduction of information.