

Молекулярно-биологическое исследование альтернативной оксидазы растений

В. С. Кравец

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Ул. Васильковская, 31/17, Киев, 252022, Украина

В обзоре изложены современные данные по молекулярной биологии, иммунологии и регуляции in vivo альтернативной оксидазы (АОК) растений. Описаны гены АОК, белок и механизмы регуляции АОК.

Альтернативная оксидаза (АОК) дыхательной цепи растений катализирует поглощение кислорода, нечувствительное к цианиду. Она является оксидазой убихинона, которая ответвляется от главной цепи на уровне убихинона и обходит протон-транслокирующий цитохромный комплекс.

Полипептиды, имеющие молекулярную массу 35, 36 и 37 кДа, ассоциированы с АОК у цветущих початков *Sauromatum guttatum*, получены моноклональные антитела к этим белкам [1]. Не так давно была выделена кДНК, кодирующая белок АОК [2].

Локализация и ориентация АОК в мембранах митохондрий точно не установлены. Вначале предполагалось, что оксидаза функционирует на матриксной стороне мембраны [3]. Недавние исследования с использованием трипсина субмитохондриальных везикул Agut, имеющих различную ориентацию, также свидетельствуют о том, что активная сторона АОК расположена на матриксной стороне внутренней мембраны митохондрии [4]. Выводы, сделанные на основе определения последовательности аминокислот белка АОК *S. guttatum*, напротив, предполагают, что фермент содержит три спиральных домена, которые, если собраны в мембране в два поворота, образуют белок, пронизывающий мембрану и имеющий относительно большие гидрофильные домены на обеих сторонах внутренней мембраны [2].

Функции АОК у растений полностью не выяс-

нены, исключая ее роль в термогенных тканях цветов, где генерация тепла посредством альтернативного пути содействует опылению [5]. Синтез АОК индуцируется окислительным стрессом у растений [6], а также ингибированием цитохромной цепи в культуре ткани [7, 8]. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что функции АОК состоят в предотвращении чрезмерного восстановления дыхательной цепи и последующей генерации вредных реактивных видов кислорода.

АОК растений кодируется ядерным геномом и состоит из 1—3 полипептидов с молекулярной массой 32—39 кДа в зависимости от видов растений [9]. Вероятно, она функционирует как димер (однородный или же неоднородный [10]) и, скорее всего, содержит железо, как восстанавливаемый лиганд [11].

Регуляция на уровне новообразования белка. У всех растений, исследованных на сегодняшний день, нечувствительное к цианиду дыхание коррелирует с наличием белков, реагирующих с моноклональными антителами, образованными на АОК *S. guttatum* [1, 12].

Следует отметить, что максимум нечувствительного к цианиду поглощения кислорода изолированными митохондриями варьирует пропорционально имеющейся в их клетках АОК. Так, в органеллах из термогенных тканей ароидных количество АОК приблизительно в 20 раз выше, чем у митохондрий сои, и активность АОК варьирует приблизительно в тех же пределах [13]. Индукция дыхания, нечувствительного к цианиду, у цветоч-

ных початков *S. guttatum* на протяжении термогенеза коррелирует с увеличением белка АОК, определяемого с помощью методов иммунологии [12]. У семядолей сои способность к повышению активности АОК после прорастания и в течение старения согласуется с увеличением белка, определяемого с помощью western-блот-гибридизации. Вероятно, самые лучшие иллюстрации данного типа контроля активности АОК посредством синтеза белка были получены в исследованиях с трансгенными растениями табака [14].

У растений, не имеющих АОК, устойчивое к цианиду дыхание фактически не проявлялось, в то время как для растений, экспрессия АОК у которых была сильнее по сравнению с диким типом, отмечена значительно более высокая активность АОК, что свидетельствует о тесной корреляции между новообразованием АОК и уровнем ее активности. Следует подчеркнуть, что одновременно с синтезом белка и, возможно, транскрипцией генов, способных определять потенциал активности АОК в тканях, существует ряд других факторов, обуславливающих уровень реализации потенциала активности АОК.

Регуляция за счет восстановления состояния АОК. Исследования свойств АОК митохондрий сои свидетельствует о том, что активная АОК существует в органеллах в виде нековалентно соединенного димера [10]. Димер может быть также соединен ковалентно дисульфидной связью после введения оксидантов к изолированным митохондриям [10, 15].

Окисленный димер легко определяется как белок с высшей молекулярной массой (около 70 кДа) в SDS-ПААГ при отсутствии восстановителей и проявляет незначительную активность до того времени, пока не будет повторно восстановлен [10, 15]. Окисленный димер совершенно не активируется при введении пирувата [15]. Таким образом, потенциальная активность данного количества АОК может быть определена отношением окисленного к восстановленному белку. Это отношение, вероятно, существенно варьирует у разных видов. Так, в митохондриях сои АОК находится в основном в восстановленном состоянии и остается активной после выделения органелл [10, 16]. В митохондриях, изолированных из табака, АОК находится в значительно окисленной форме, и для проявления активности ее необходимо сначала восстановить. Статус восстановленности АОК в изолированных митохондриях необязательно отображает состояние *in vivo*, по крайней мере, в початках ароидных. Вместе с тем современные исследования свидетельствуют о том, что восстановление АОК происходит

относительно медленно в процессе выделения органелл.

Восстановление АОК у изолированных митохондрий, вероятно, зависит от введения некоторых соединений, таких, например, как ДТТ [10], но может произойти и после окисления определенных интермедиатов цикла трикарбоновых кислот. В митохондриях листьев табака цитрат/изоцитрат являются наиболее эффективными интермедиатами даже при условии слабого окисления. Малат также способен восстанавливать АОК, но сукцинат, глицин и 2-оксоглутарат менее эффективны даже в случае быстрого окисления двух первых субстратов.

Изоцитрат и малат являются единственными субстратами, способными восстанавливать NADP непосредственно в митохондриях растений [4]. Эти наблюдения могут свидетельствовать о том, что восстановление АОК зависит от формирования NADPH в матриксе органелл. Результаты указывают также на то, что пулы NADH и NADPH не взаимодействуют легко в митохондриях табака. Очевидно, что NADPH восстанавливает АОК через интермедиаты, но они до сих пор не идентифицированы [13]. Можно назвать два возможных восстановителя для АОК [10] — это тиоредоксин и восстановленный глутатион. Восстановление их обоих, как правило, происходит при участии NADPH в качестве кофактора. Митохондриальная форма тиоредоксина была идентифицирована [17]. Глутатион редуктата также имеется в митохондриях растений [4]. Бактериальный тиоредоксин способен восстанавливать АОК у «вывороченных» наружу субмитохондриальных частичек [10]. Показано также, что экзогенный восстановленный глутатион может в такой же мере осуществлять этот процесс [13].

Регуляция с участием органических кислот. В митохондриях термогенных тканей, таких как ароидные, нечувствительное к цианиду дыхание открывается у различных субстратов, включая хиноны [1, 18]. Вместе с тем в митохондриях нетермогенных тканей наблюдается значительное различие в активности взаимодействия АОК с различными субстратами [19]. Максимальная интенсивность отмечается, как правило, при окислении сукцината. NAD-подобные субстраты часто имеют намного низшую активность, но также восстанавливают убихиноны (Q) в незначительной степени [20]. С другой стороны, экзогенный NADH слабо окисляется через АОК даже при условии, что он поддерживает QH на том же уровне, что и сукцинат, и в результате экзогенный хинол полностью окисляется [20, 21].

Как было показано в дальнейшем, определенные органические кислоты способны активировать АОК и устранять различия между субстратами [22]. Глиоксилат и пируват являются наиболее эффективными активаторами АОК, вместе с тем гидроксипируват и 2-оксоглутарат также эффективны при высоких концентрациях [13]. Активация этими кислотами не включает их метаболизма [22]. Формирование внутримитохондриального пирувата в процессе окисления сукцината и малата может объяснить, почему именно эти соединения служат самыми лучшими субстратами для АОК [16].

В митохондриях картофеля нечувствительное к цианиду окисление экзогенного NADH стимулируется добавлением D-малата или сукцината даже при наличии малоната для блокирования окисления сукцината [23, 24]. Но эти соединения необходимы в высоких концентрациях и неэффективны в митохондриях сои и табака [13, 22].

Пируват стимулирует АОК при низких концентрациях ($K_{0.5} = 0,1$ мМ в условиях его экзогенного использования и, вероятно, место активации находится на матриксной стороне внутренней мембраны [16]. Он также эффективно действует у «вывороченных» наружу субмитохондриальных частичек и в случае с солюбилизированной АОК. Приведенные наблюдения свидетельствуют о том, что пируват взаимодействует непосредственно с АОК. Стимуляция пируватом является обратимой, его присутствие необходимо для поддержания активности АОК [16]. Однако окисленная форма АОК не может быть активирована пируватом [10]. В митохондриях листьев табака, где АОК существенно окисляется после изоляции органелл, активность АОК находится на низком уровне до того периода, пока пируват и восстановитель не будут введены в среду инкубации органелл. Таким образом, степень восстановления АОК определяет потенциальную активность АОК, а уровень пирувата обуславливает, до какой степени эта потенциальная способность реализуется.

В 1987 году был получен и очищен белок АОК митохондрий термогенных растений *S. guttatum* [1]. Получены также антитела к белку АОК, облегчившие изучение ее структуры и свойств. Установлено, что антитела к АОК распознают три митохондриальных белка, молекулярная масса которых 35, 36 и 37 кДа [1]. Было показано, что эти антитела распознают белок АОК у *Neurospora crassa* [1], а также таковой у высших растений, таких как соя [25, 26], табак [8] и кукуруза [27]. Иммуноблотинг митохондриального белка сои и фасоли сиратро (*Macroptilium atropurpureum*) пока-

зал, что у обоих растений выявляются две полосы (34 и 36 кДа) белков АОК в семядолях и одна полоса (36 кДа) — в органеллах клеток корней, что свидетельствует о тканеспецифической экспрессии АОК.

С использованием антител к АОК была получена кДНК, и геном АОК из *S. guttatum* был изолирован и охарактеризован [2, 28]. В дальнейших исследованиях установлена последовательность кДНК из *Hansenula anomala* [29], *N. crassa* [30], *Trypanosoma brucei* [31] и ряда высших растений, включая *Arabidopsis thaliana* [32], табак [14, 33], сою [34], картофель [35] и манго [36]. Исследования, проведенные с применением Саузерн-гибридизации, указывали на кодирование АОК одним ядерным геном у *S. guttatum* [28] и *A. thaliana* [32]. На основании этих данных было высказано предположение о том, что существование у *S. guttatum* белков АОК с различной молекулярной массой обусловлено посттрансляционной модификацией АОК. Однако проведенные в дальнейшем исследования импорта *in vitro* белков АОК митохондриями, изолированными из различных тканей (семядоли и корни) сои, свидетельствуют о том, что различия в импорте и модификации предшественника АОК между этими тканями отсутствуют [37]. Эти результаты противоречили существующим представлениям о происхождении белков с различной молекулярной массой.

Далее было сообщено о том, что АОК сои и табака кодируются как мультигенное семейство тремя и двумя копиями генов соответственно [38]. Кроме того, клоны кДНК АОК1, АОК2 и АОК3 сои были изолированы и полностью установлены последовательности нуклеотидов и аминокислот [34]. Исследования, проведенные с использованием иммуноблот-анализа и других методов, свидетельствуют о том, что гены АОК сои дифференциально экспрессируются тканеспецифическим образом. Было показано, что белки АОК митохондрий семядолей сои с молекулярной массой 34 и 36 кДа являются белками АОК2 и АОК3.

Установлено также, что белок митохондрий корней с молекулярной массой 36 кДа является белком АОК3 [39]. На основании этих результатов можно сделать вывод о том, что ряд полос АОК на иммуноблоте митохондриального белка различных тканей являются продуктами мультигенного семейства АОК.

Проведенный не так давно анализ наследования белков митохондрий АОК *A. thaliana* свидетельствуют о том, что они, как и аналогичные белки сои и табака, кодируются небольшим семейством генов [39].

В процессе исследования белков АОК сои установлено, что они кодируются, по крайней мере, тремя копиями генов АОК. Показано участие двух копий генов в наследовании белков АОК табака [38]. Кроме того, полностью определена последовательность нуклеотидов кДНК сои АОК1, АОК2 и АОК3 [34].

Показано, что как минимум два из четырех генов АОК *A. thaliana* (АОК1а и АОК1б) организованы в тандем — участок приблизительно 5 тыс. пар нуклеотидов (п. н.) на одной из хромосом *A. thaliana*. Ген АОК1а расположен на 1,5 тыс. п. н. ниже гена АОК1б с той же ориентацией. На сегодня имеется несколько примеров, где два представителя семейства генов образуют кластер в том же направлении в геноме растений (например, гены каталазы (*cat1/cat2*) клешины [40] и индуцируемые низкой температурой и высушиванием (*rd29A/rd29B*) [41], обозначаемые также как *lfi78/lfi65* [42], гены *A. thaliana*). Предполагается, что этот тандем пары генов образовался в результате удвоения генов [39].

Последовательность нуклеотидов АОК1а соответствует таковой последовательности, установленной ранее для гена АОК [32], за исключением отличий в двух нуклеотидах [39]. Была установлена локализация гена АОК для *A. thaliana* на хромосоме 3 [32], поскольку ген АОК1а имеет высокую степень сходства с ранее описанным геном АОК. Есть основания считать местом локализации тандема генов АОК1а/АОК1б хромосому 3 *A. thaliana* [39]. На сегодня еще не установлено, на какой хромосоме локализованы два других гена АОК — АОК1с и АОК2. Несмотря на то, что не получено в изолированном виде клона, содержащего гены АОК1б/АОК1а плюс АОК1с и/или АОК2, не исключена возможность локализации семейства генов АОК в едином месте на хромосоме, например, все гены АОК имеют тандемное расположение [39].

Аналогичное тандемное расположение генов АОК, АОК1а и АОК1б выявлено не только у *A. thaliana*, но и у риса [43]. Установлено, что аминокислотная последовательность белка АОК1а риса имеет большее сходство с белком гена риса АОК1б, чем с белком гена АОК1а *A. thaliana* [43].

Показано, что повышение активности альтернативного пути в митохондриях клеток ряда растений в процессе их роста при низких температурах [27], сопровождающееся увеличением содержания белка АОК у кукурузы и табака [8, 27], обусловлено, по крайней мере частично, индукцией экспрессии генов АОК [43].

В. С. Кравець

Молекулярно-біологічне дослідження альтернативної оксидази рослин

Резюме

В огляді підсумовано сучасні дані з молекулярної біології, імунології та регуляції *in vivo* альтернативної оксидази (АОК) рослин. Гени АОК і її білок охарактеризовано та описано механізми регуляції активності АОК.

V. S. Kravets

Molecular biology of the alternative plant oxidase

Summary

The review summarizes the recent data on molecular biology, immunology and regulation *in vivo* of the alternative oxidase (AOX) in plant mitochondria. The AOX genes and protein have been characterized and the mechanisms that regulate the AOX activity have been described.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Elthon T. E., McIntosh L. Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84.—P. 8399—8403.
2. Rhoads D. M., McIntosh L. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott) // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88.—P. 2122—2126.
3. Rich P. R., Boveris A., Bonner W. D. Jr., Moore A. L. Hydrogen peroxide generation by the alternative oxidase of higher plants // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1976.—71.—P. 695—703.
4. Rasmussen A. G., Moller I. M. NADP-utilizing enzymes in the matrix of plant mitochondria // Plant Physiol.—1990.—94.—P. 1012—1018.
5. Meeuse B. J. D. Thermogenic respiration in aroids // Annu. Rev. Plant Physiol.—1975.—26.—P. 117—126.
6. Purvis A. C., Shewfelt R. L. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? // Physiol. Plant.—1993.—88.—P. 712—718.
7. Minagawa N., Koga S., Nakano M., Sakajo S., Yoshimoto A. Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala* // FEBS Lett.—1992.—302.—P. 217—219.
8. Vanlerberghe G. C., McIntosh L. Coordinate regulation of cytochrome and alternative pathway respiration in tobacco // Plant Physiol.—1992.—100.—P. 1846—1851.
9. McIntosh L. Molecular biology of the alternative oxidase // Plant Physiol.—1994.—105.—P. 781—786.
10. Umbach A. L., Siedow J. N. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity // Plant Physiol.—1993.—103.—P. 845—854.
11. Minagawa N., Sakajo S., Komiyama T., Yoshimoto A. Essential role of ferrous iron in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala* // FEBS Lett.—1990.—267.—P. 114—116.
12. Elthon T. E., Nickels R. L., McIntosh L. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria // Plant Physiol.—1989.—89.—P. 1311—1317.
13. Day D. A., Wiskich J. T. Regulation of alternative oxidase activity in higher plants // J. Bioenerg. and Biomembr.—1995.—27, N 4.—P. 379—385.
14. Vanlerberghe G. C., McIntosh L. Mitochondrial electron trans-

- port regulation of nuclear gene expression // *Plant Physiol.*—1994.—105.—P. 867—874.
15. Umbach A. L., Wiskich J., Siedow A. L. Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria // *FEBS Lett.*—1994.—348.—P. 181—184.
 16. Day D. A., Millar H. A., Wiskich J. T., Whelan J. Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria // *Plant Physiol.*—1994.—106.—P. 1421—1427.
 17. Bodenstern-Lang J., Buch A., Follman H. Animal and plant mitochondria contain specific thioredoxins // *FEBS Lett.*—1989.—258.—P. 22—26.
 18. Siedow J. N., Moore A. L. A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria // *Biochim. et biophys. acta.*—1993.—1142.—P. 165—174.
 19. Lance C., Chauveau M., Dizengremel P. The cyanide-resistant pathway of plant mitochondria // *Encyclopedia of Plant Physiology / Eds R. Douce, D. A. Day.*—Berlin: Springer, 1985.—Vol. 18.—P. 202—247.
 20. Day D. A., Dry I. B., Soole K. L., Wiskich J. T., Moore A. L. Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria // *Plant Physiol.*—1991.—95.—P. 948—953.
 21. Moore A. L., Siedow J. N. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria // *Biochim. et biophys. acta.*—1991.—1058.—P. 121—140.
 22. Millar A. H., Wiskich J., Whelan J., Day D. A. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria // *FEBS Lett.*—1993.—329.—P. 259—262.
 23. Wagner A. M., Kraak M. H. S., van Emmerick W. A. M., van der Plas L. H. W. Respiration of plant mitochondria with various substrates: Alternative pathway with NADH and TCA cycle derived substrates // *Plant Physiol. Biochem.*—1989.—27.—P. 837—845.
 24. Liden A. C., Akerlund H. E. Induction and activation of the alternative oxidase of potato tuber mitochondria // *Physiol. Plant.*—1993.—87.—P. 134—141.
 25. Kearns A., Whelan J., Young S., Elthon T. E., Day D. A. Tissue specific expression of the alternative oxidase in soybean and siratro // *Plant Physiol.*—1992.—99.—P. 712—717.
 26. Obenland D., Diethelm R., Shibles R., Stewart C. Relationship of alternative respiratory capacity and alternative oxidase amount during soybean seedling growth // *Plant Cell Physiol.*—1990.—31.—P. 897—901.
 27. Stewart C. R., Martin B. A., Reding L., Cerwick S. Seedling growth, mitochondrial characteristics, and alternative respiratory capacity of corn genotypes differing in cold tolerance // *Plant Physiol.*—1990.—92.—P. 761—766.
 28. Rhoads D. M., McIntosh L. The salicylic acid-inducible alternative oxidase gene AOX1 and genes encoding pathogenesis-related proteins share regions of sequence similarity in their promoters // *Plant Mol. Biol.*—1993.—21.—P. 615—624.
 29. Sakajo S., Minagawa N., Komiyama T., Yoshimoto A. Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala* // *Biochim. et biophys. acta.*—1991.—1090.—P. 102—108.
 30. Li Q., Ritzel R. G., McLean L. L. T., McIntosh L., Ko T., Bertrand H., Nargang F. E. Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa* // *Genetics.*—1996.—142.—P. 129—140.
 31. Chaudhuri M., Hill G. C. Cloning, sequencing and functional activity of the *Trypanosoma brucei brucei* alternative oxidase // *Mol. Biochem. Parasitol.*—1996.—83.—P. 125—129.
 32. Kumar A. M., Soll D. *Arabidopsis* alternative oxidase sustains *Escherichia coli* respiration // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1992.—89.—P. 10842—10846.
 33. Whelan J., Smith M. K., Meijer M., Yu J. W., Badger M. R., Price G. D., Day D. A. Cloning of an additional cDNA for alternative oxidase in tobacco // *Plant Physiol.*—1995.—107.—P. 1469—1470.
 34. Whelan J., McIntosh L., Day D. A. Sequencing of a soybean alternative oxidase cDNA clone // *Plant Physiol.*—1993.—103.—P. 1481.
 35. Hiser C., Kapranov P., McIntosh L. Genetic modification of respiratory capacity in potato // *Plant Physiol.*—1996.—110.—P. 277—286.
 36. Cruz-Hernandez A., Gomez-Lim M. A. Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica* L.) is differentially regulated during fruit ripening // *Planta.*—1995.—197.—P. 569—576.
 37. Whelan J., Hugosson M., Glaser E., Day D. A. Studies on the import and processing of the alternative oxidase precursor by isolated soybean mitochondria // *Plant Mol. Biol.*—1995.—27.—P. 769—778.
 38. Whelan J., Millar A. H., Day D. A. The alternative oxidase is encoded in a multigene family in soybean // *Planta.*—1996.—198.—P. 197—201.
 39. Saisho D., Nambara E., Naito S., Tsutsumi N., Hirai A., Nakazono M. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.*—1997.—35.—P. 585—596.
 40. Suzuki M., Ario T., Hattori T., Nakamura K., Asahi T. Isolation and characterization of two tightly linked catalase genes from castor bean that are differentially regulated // *Plant Mol. Biol.*—1994.—25.—P. 507—516.
 41. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants // *Mol. and Gen. Genet.*—1993.—236.—P. 331—340.
 42. Nordin K., Vahala T., Palva E. T. Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.*—1993.—21.—P. 641—653.
 43. Ito Y., Saisho D., Nakazono M., Tsutsumi N., Hirai A. Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature // *Gene.*—1997.—203.—P. 121—129.

УДК 577.23: 581.198

Поступила в редакцию 21.12.98