

УДК 579.017.7

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ (ОТ ДРОЖЖЕЙ ДО РАСТЕНИЙ)

Обзор

© 2015 А.Г. Рогов*, Р.А. Звягильская

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва;
факс: +7(495)954-2732, электронная почта: lloss@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.11.14

Митохондрии многих организмов (кроме млекопитающих, архей, некоторых грибов и простейших) помимо классической цитохромоксидазы дыхательной цепи содержат нечувствительную к действию цианида т.н. альтернативную оксидазу (АО), локализованную на внутренней митохондриальной мембране, перенос электронов через которую не сопряжен с синтезом АТФ и запасанием энергии. В обзоре рассмотрены механизмы, лежащие в основе многочисленных функций, выполняемых АО у организмов разной сложности организации (от дрожжей до растений). Это, прежде всего, возможность выживания за счет работы АО при ингибировании терминальных компонентов основной дыхательной цепи или утрате способности синтезировать эти компоненты. Очевидна жизненно важная роль альтернативной оксидазы в термогенезе термогенных органов растений, когда АО становится единственной высокоактивной терминальной оксидазой и энергия окисления субстратов через этот окислительный путь превращается в тепло, используемое для испарения летучих веществ, привлекающих насекомых, которые опыляют растения. Важнейшую роль АО играет в уменьшении или предотвращении окислительного стресса, что обеспечивает защиту при действии различных факторов стресса (изменение температуры и интенсивности света, осмотический стресс, засуха, атака несовместимыми штаммами бактериальных патогенов или фитопатогенов или их элиситоров). Показана роль АО при выживании патогенов в клетках хозяина, антивирусной защите, метаболической реорганизации растения во время эмбриогенеза и дифференциации клеток. Приведены примеры использования альтернативной оксидазы в качестве возможного терапевтического средства при различных повреждениях системы митохондриального окислительного фосфорилирования в культивируемых клетках и целых животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: альтернативная оксидаза, активные формы кислорода, атака патогенами, грибы, дрожжи, простейшие, растения, окислительный стресс.

Митохондрии многих организмов (большинства грибов, водорослей и некоторых простейших) в дополнение к канонической цитохромоксидазе дыхательной цепи, ингибируемой цианидом, содержат нечувствительную к действию цианида, но ингибируемую гидроксамовыми кислотами, терминальную оксидазу, названную альтернативной оксидазой (АО). АО – это кодируемый ядерным геномом белок с мол. массой 32–36 кДа, локализованный на внутренней стороне митохондриальной мембраны и катализирующий четырехэлектронное окисление восстановленного убихинона (убихинола) кислородом до воды [1–3]. Перенос электронов через АО не сопряжен с синтезом АТФ и запасанием энергии,

а энергия окисления убихинола кислородом выделяется в виде тепла [1, 4–6].

В ряде дрожжевых организмов аэробного типа обмена, активная АО присутствует на всех исследованных стадиях роста [1]. Напротив, в дрожжах *D. magnusii* (*E. magnusii*) [1] и некоторых других организмах в нормальных условиях (т.е. в условиях функционирования основной, фосфорилирующей дыхательной цепи и в отсутствие факторов стресса) активность АО либо низка, либо совсем не обнаруживается. Однако ее активность (на примере дрожжей) значительно возрастает при ингибировании терминальной части основной дыхательной цепи в результате: 1) выращивания клеток на средах, дефицитных по ионам железа, серы или меди; 2) выращивания или инкубации покоящихся клеток в присутствии антимицина А, цианида или азиды; 3) выращивания или инкубации покоящихся клеток

Принятые сокращения: АО – альтернативная оксидаза; АФК – активные формы кислорода.

* Адресат для корреспонденции.

в присутствии ингибиторов митохондриальной транскрипции и трансляции; 4) мутационных изменений ядерного или митохондриального генома; 5) ингибирования системы окислительного фосфорилирования; 6) снижения концентрации кислорода [1]. Такого рода изменения (выводы сделаны на основании увеличения количества транскрипта или белка АО, а также активации цианид-резистентного альтернативного окислительного пути) показаны не только для дрожжей [1, 7–10] и грибов [11–14], но и водорослей [15], растений [16], простейших [17] и дрозофилы [18].

Появление цианид- и антимицин А-нечувствительного дыхания в митохондриях может быть связано с изменением физиологического состояния ткани, органа или организма. Классический пример – это многократное, лавинообразное возрастание активности АО в термогенных тканях ароидных растений в течение нескольких дней [19–21], при этом АО становится единственной терминальной оксидазой и окисление субстратов в дыхательной цепи сопровождается выделением тепла, достаточного для образования летучих аттрактантов, привлекающих насекомых, опыляющих эти растения. Другой яркий пример – это различная степень экспрессии АО у трипаносом на разных стадиях развития организма. В форме, находящейся в кровотоке, митохондрии лишены цитохромов, и дыхание осуществляется исключительно через АО. С другой стороны, у насекомых имеется полностью сформированная цитохромная система, а стабильность транскрипта АО многократно уменьшается [22]. В клетках дрожжей *Y. lipolytica* (ранее *C. lipolytica*) и *Schizosaccharomyces lipolytica*) и *P. membranifaciens*, выращенных на глюкозе, АО индуцировалась при переходе культуры в стационарную фазу роста, при этом АО функционировала одновременно с цитохромной частью дыхательной цепи [23–25]. В дрожжах *P. pastoris* активность АО монотонно возрастала по мере роста культуры, а затем резко снижалась при исчерпании глюкозы в среде выращивания [2]. В митохондриях гриба *Metarhizium anisopliae* наибольшая активность АО наблюдалась в начале и конце цикла развития, при прорастании воздушных конидий и формировании погруженных конидий [26]. В диморфном грибе *P. brasiliensis*, вызывающем паракокцидиомикоз человека, экспрессия гена, кодирующего АО, существенно возрастала при прорастании конидий и образовании дрожжевой формы [27–28]. У гемиботрофного гриба *M. perniciosus*, тропического патогена, вызывающего болезнь какао, колонизирующего сначала живые ткани хозяина (биотрофная фаза), а затем растущего на

мертвом растении (некротическая фаза), наибольшее количество транскрипта АО имело место в биотрофной фазе [29]. Старение срезов картофеля [30] и созревание плодов [31–32], как было показано, также сопровождается значительной активацией АО.

В дрожжах [33–34] и растениях [35–40] уровень экспрессии АО зависел от доступности питательных веществ и источника углерода.

У грибов активность АО или количество транскрипта АО существенно возрастало при мягком тепловом шоке [41], а также в условиях окислительного [9–10, 19, 28, 41–43] и осмотического [41] стрессов. В грибах-патогенах активность АО резко возрастала при действии антигрибковых препаратов [44]. Для растений также показано, что в зависимости от типа ткани, органа, фазы развития и метаболического статуса [3, 45–47] уровень экспрессии АО значительно возрастал в ответ на широкий диапазон условий стресса и неблагоприятных экологических условий, таких как изменение температуры и интенсивности света [47–53], осмотический стресс [54–56], засуха [54, 57], окислительный стресс [58–59], атака несовместимыми штаммами бактериальных патогенов или фитопатогенов или их элиситорами [60–64], при обработке этиленом [65], NO [65], добавлении салициловой кислоты [66–68].

Роль не связанного с запасанием энергии альтернативного пути привлекает внимание исследователей в течение нескольких десятилетий. Было высказано несколько гипотез, с которыми мы и познакомим читателя.

Очевидна физиологическая роль АО в термогенезе термогенных растений. В митохондриях цветущих термогенных органов происходит кардинальная перестройка структуры дыхательной цепи, при которой АО становится единственной терминальной оксидазой, ее активность очень высока и энергия окисления субстратов через дыхательную цепь превращается в тепло, которое используется для испарения летучих веществ, привлекающих насекомых, опыляющих растения [19, 20].

Понятна роль АО и при ингибировании терминальных компонентов основной дыхательной цепи или утрате способности синтезировать эти компоненты. Функционирование альтернативного пути в этих условиях обеспечивает возможность реокисления цитоплазматического NADH и, следовательно, возможность выживания. Кроме того, при этом поддерживается фосфорилирующая активность за счет совместного функционирования 1-го пункта сопряжения и субстратного фосфорилирования, а также высокая окислительная активность, необходимая

для поддержания биосинтетических процессов, протекающих в митохондриях. Описанная ситуация имеет место и в *T. brucei*, возбудителе сонной болезни. На определенной стадии развития (в форме, живущей в крови) АО является единственной терминальной оксидазой, обеспечивающей дыхание и выживание патогена в клетках хозяина [22]. Сходная картина наблюдается и в патогенном грибе *Philasterides dicentrarchi*, вызывающем болезнь палтуса. В условиях нормоксии дыхание патогена чувствительно к действию антимицина А, ингибитора цитохромной цепи, а в условиях гипоксии индуцируется цианид- и антимицин А-резистентное дыхание [69].

Ясна также фундаментальная функция АО в уменьшении или предотвращении окислительного стресса. Недавние работы показали, что промотор гена *AOX1a* чувствителен к действию пероксида водорода [70]. Снижение степени восстановления коэнзима Q, донора восстановительных эквивалентов для АО, снижает образование супероксид-анион радикала и, в конечном итоге, пероксида водорода, наиболее устойчивой активной формы кислорода. Такие данные получены для дрожжей [2, 9, 24, 26, 71, 72], грибов [28, 41–43, 73–76], водорослей [15] и растений *A. thaliana* [77–78]. Благодаря своему участию в подавлении окислительного стресса АО может снижать порог, вызывающий гибель клеток [79].

В этой связи понятна и функция АО в ответе на засуху, осмотический стресс, действие токсинов, элиситоров и патогенов.

Как известно, засуха и осмотический стресс сопровождаются и окислительным стрессом. В условиях солевого стресса у *A. thaliana* происходило увеличение уровня внутриклеточного Na⁺ и продукции АФК. При этом наблюдалось резкое увеличение экспрессии гена *AtAox1a* [55]. Высокая активность АО в корнях и поросли растения помогает *A. thaliana* расти в среде, насыщенной NaCl и поддерживать низкий уровень внутриклеточного Na⁺ [55]. Участие АО в ответе на солевой стресс показано также для *M. truncatula* [80], а для водоросли *Ch. reinhardtii*, выращенной на среде, насыщенной нитратом, показано участие АО в процессах нитрат- и нитритредукции [81].

Элиситоры и токсины растительных патогенов увеличивают образование митохондриальных АФК [82]. Инфицирование патогенами и вирусами приводит к накоплению пероксида водорода, NO, этилена, салициловой кислоты и метилового эфира жасмоновой кислоты, которые служат сигнальными молекулами для индукции защитной реакции растений и индуцируют экспрессию гена(ов), кодирующего(их) АО

или увеличивают количество белка растений [83]. Все эти соединения ингибируют цитохромный путь переноса электронов в дыхательной цепи. Инфицирование патогенами имеет своим следствием и активацию пентозофосфатного пути и NADP-зависимого малик-фермента, что в свою очередь приводит к увеличению пула NADPH и пирувата, являющегося активатором АО растений. Мутанты *N. tabacum*, не имеющие АО, хуже переносили стресс, связанный с атаками патогенных бактерий и грибов, сосущих насекомых. В клетках было замечено пониженное, по сравнению с диким типом, содержание защитных метаболитов, выше содержание АФК и процент клеточной смерти [62, 84]. Таким образом, АО в растениях может быть универсальным механизмом ответа на окислительный стресс [85] и условия стресса в целом [62].

Становится все более понятной и роль АО в ответе растений на световой стресс [48]. В фотосинтезирующих организмах хлоропласты трансформируют энергию света в восстановительные эквиваленты. Поскольку на фиксацию CO₂ используется только ~50% от поглощенной световой энергии, очевидно, что в ходе фотосинтеза образуется избыток восстановительных эквивалентов и, если не происходит рассеивания энергии, этот избыток может вызвать окислительный стресс и повреждение фотосинтетического аппарата. Внешние факторы стресса уменьшают фиксацию CO₂, что способствует еще большему накоплению АФК в хлоропластах. Совершенно очевидно, что необходимы механизмы, предотвращающие перевосстановление компонентов фотосинтетической цепи переноса электронов. Для этого служит индукция АО, наряду с экспортом малата из хлоропластов в митохондрии с помощью малат-оксалоацетатного шунта и экспортом гликолата в пероксисомы, где он превращается в глицин, а затем глицин транспортируется в митохондрии, где окисляется до серина [50]. При ингибировании АО на свету в хлоропластах происходило быстрое накопление NADPH и, как следствие, сверхвосстановление акцепторной части фотосистемы I. При прорастании семян *A. thaliana* на свету мутанты по гену *Aox1a* при долгосрочном сильном освещении характеризовались большим уровнем продукции АФК и неэффективным использованием восстановительных эквивалентов в хлоропластах, чем семена дикого типа [48, 86]. Таким образом, АО, наряду с другими механизмами, указанными выше, осуществляет защиту от светового стресса и предотвращает деструкцию фотосинтетического аппарата.

Помимо уже выше перечисленных функций АО, связанных с оптимизацией дыхательного

обмена, защитой от избыточных АФК, а в ряде случаев и с выживанием клеток, АО, в зависимости от стадии развития, метаболического или физиологического статуса клеток, органов или тканей может выполнять и другие функции.

В патогенных грибах [87] и простейших [17] АО участвует в защите организма при стрессах и обеспечивает выживание в условиях существования внутри хозяина. АО задействована в процессах регуляции роста, развития и ответа на окислительный стресс у патогенного гриба *S. sclerotiorum* [76].

В патогенных дрожжах *C. neoformans* АО экспрессируется в ответ на изменение температуры тела хозяина. Мутант *C. neoformans*, лишенный гена АО, проявлял меньшую вирулентность и не был устойчив к окислительному стрессу [72]. Похожие данные получены и для патогенного гриба *P. brasiliensis* [88], вызывающего у человека паракокцидиомикозы. Одним из важнейших этапов развития *P. brasiliensis* является переход гриба из мицелиальной формы в дрожжевую. Этот переход замедлялся при ингибировании АО или III и IV комплексов дыхательной цепи, либо вообще прекращался при одновременном ингибировании обеих ветвей дыхательной цепи, что свидетельствует о возможной вовлеченности АО в процесс переформирования метаболизма патогенного организма [28].

АО может участвовать в процессах антивирусной защиты. Это показано для томата и петунии [89].

В эмбриогенезе моркови (*Daucus carota* L.) гены АО (*DcAOX1a* и *DcAOX2a*) экспрессируются по-разному. Во время соматического эмбриогенеза ген *DcAOX1a*, кодирующий одну из изоформ АО, не экспрессируется, тогда как ген *DcAOX2a*, кодирующий другую изоформу АО, экспрессируется весьма активно. На более поздних стадиях эмбриогенеза экспрессия *DcAOX2a* также уменьшается. Добавление салицилгидроксамовой кислоты, ингибитора АО, в фазе соматического эмбриогенеза не позволяло эмбрионам развиваться зародышевые структуры, и их рост замедлялся. Этот процесс был обратим и зависел от концентрации добавленного ингибитора. Полученные результаты предполагают участие АО в метаболической реорганизации растения во время эмбриогенеза и дифференциации клеток [90].

Таким образом, индукция АО увеличивает метаболическую пластичность клеток, которая может быть полезной для быстрой адаптации к меняющимся источникам питания, биотическим и абиотическим факторам стресса [5, 91–93]. При этом функции АО могут быть не взаимоисключающими, а дополняющими друг

друга [6, 79]. Более того, в последнее время АО рассматривается как маркер условий стресса и кандидат для клеточного репрограммирования в этих условиях [5, 91, 92].

Недавно АО привлекла внимание исследователей в качестве возможного терапевтического средства при различных повреждениях системы митохондриального окислительного фосфорилирования. Гены, кодирующие АО из асцидии *Ciona intestinalis* и ряда ароидных растений, были функционально экспрессированы в культивируемых клетках человека [94–97]. Экспрессия сопровождалась устранением накопления молочной кислоты и избыточного накопления АФК [94–95], двух наиболее часто проявляемых симптомов повреждения системы окислительного фосфорилирования, а также предотвращала ингибирование роста и повышенную чувствительность к прооксидантам в линиях, дефицитных по цитохромоксидазе [96]. Коэкспрессия NADH-дегидрогеназы (Ndi1) *S. cerevisiae* и АО *Emericella nidulans* полностью восстанавливала NADH DH/CoQ-редуктазную и CoQ-оксидазную активности в мышцах, лишенных митохондриальной ДНК и, следовательно, нежизнеспособных [98]. Экспрессия АО из *C. intestinalis* в *D. melanogaster* полностью или в значительной степени предотвращала смертность, вызванную токсинами или глобальным или частичным тканеспецифичным нокаутом субъединиц COX CoVb и cIV цитохромоксидазы дыхательной цепи [18], а также дефицитом фактора Surf1, ответственного за сборку цитохромоксидазы [99]. Она также предотвращала локомоторный дефект и избыточную продукцию АФК в дрозофилах с мутированным геном *dj-1β*, гомологом гена *DJ1* человека, задействованным в болезни Паркинсона [99] и восстанавливала дофаминзависимую нейрорегуляцию [100]. Экспрессия АО в мышцах поддерживала цианид-резистентное дыхание в интактных органах, способствовала длительной защите при действии летальных концентраций цианида в целом животном, при этом свойства самого фермента, как и активность компонентов основной дыхательной цепи и эффективность системы окислительного фосфорилирования в изолированных митохондриях не менялись [101].

Эти данные указывают на возможность использования АО в качестве важного инструмента для борьбы с пагубными последствиями ограничения активности основной дыхательной цепи и системы окислительного фосфорилирования в клетках и целых животных. При этом АО позволяет обходить не только дефектный цитохромный путь, но и поддерживать активность трикарбонового цикла в условиях ограничения

активности основной цитохромной цепи [102] и ослаблять повреждение клеток, вызванное митохондриальными АФК. Напомним, что дисфункция митохондрий и избыточная продукция супероксида митохондриями является существенным фактором, определяющим многие болезни человека, от системной патологии у детей

до кардиомиопатии, ишемии, рака и нейродегенеративных патологий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-01530), РНФ (грант 14-24-00107) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Звягильская Р.А., Котельникова А.В. (1991) Структура и функциональная активность дрожжевых митохондрий (монография), ВИНТИ, Москва, сер. Биол. хим., **36**, с. 172.
2. Kern, A., Hartner, F.S., Freigassner, M., Spielhofer, J., Rumpf, C., Leitner, L., Frohlich, K.U., and Glieder, A. (2007) *Pichia pastoris* «just in time» alternative respiration, *Microbiology*, **153**, 1250–1260.
3. 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.
4. Juszczyk, I.M., and Rychter, A.M. (2003) Alternative oxidase in higher plants, *Acta Biochim. Pol.*, **50**, 1257–1271.
5. Albury, M.S., Elliott, C., and Moore, A.L. (2009) Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants, *Physiol. Plant.*, **137**, 316–327.
6. Vanlerberghe, G.C., Cvetkovska, M., and Wang, J. (2009) Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiol. Plant.*, **137**, 392–406.
7. Звягильская Р.А., Коростелева Н.Л., Котельникова А.В. (1977) Изучение дыхательной системы *Endomyces magnusii*. Свойства митохондрий, выращенных в присутствии антимицина А, *Биохимия*, **42**, 1888–1895.
8. Zvjagil'skaya, R.A., Korosteleva, N.L., and Kotelnikova, A.V. (1978) An antimycin A- and cyanide-insensitive variant of *Endomyces magnusii*, in *Functions of alternative terminal oxidases* (Degn, H., Lloyd, D., and Hill, G.C., eds), Pergamon Press, Oxford, N.Y., pp. 179–185.
9. Yan, L., Li, M., Cao, Y., Gao, P., Cao, Y., Wang, Y., and Jiang, Y. (2009) The alternative oxidase of *Candida albicans* causes reduced fluconazole susceptibility, *J. Antimicrob. Chemother.*, **64**, 764–773.
10. Minagawa, N., Koga, S., Nakano, M., Sakajo, S., and Yoshimoto, A. (1992) Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*, *FEBS Lett.*, **302**, 217–219.
11. Tanton, L.L., Nargang, C.E., Kessler, K.E., Li, Q., and Nargang, F.E. (2003) Alternative oxidase expression in *Neurospora crassa*, *Fungal Gen. Biol.*, **39**, 176–190.
12. Osiewacz, H.D., and Stumpfer, S.W. (2001) Metabolism and aging in the filamentous fungus *Podospira anserina*, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **32**, 185–197.
13. Stumpfer, S.W., Stephan, O., and Osiewacz, H.D. (2004) Impact of a disruption of a pathway delivering copper to mitochondria on *Podospira anserine* metabolism and life span, *Eukaryot. Cell*, **3**, 200–211.
14. Kirimura, K., Matsui, T., Sugano, S., and Usami, S. (1996) Enhancement and repression of cyanide-insensitive respiration in *Aspergillus niger*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **141**, 251–254.
15. Sharpless, T.K., and Butow, R.A. (1970) An inducible alternate terminal oxidase in *Euglena gracilis* mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **245**, 58–70.
16. Strodtkotter, I., Padmasree, K., Dinakar, C., Speth, B., Niazi, P.S., Wojtera, J., Voss, I., Do, P.T., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Linke, V., Raghavendra, A.S., and Scheibe, R. (2009) Induction of the AOX1D isoform of alternative oxidase in *A. thaliana* T-DNA insertion lines lacking isoform AOX1A is insufficient to optimize photosynthesis when treated with antimycin A, *Mol. Plant*, **2**, 284–297.
17. Johnson, C.H., Prigge, J.T., Warren, A.D., and McEwen, J.E. (2003) Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*, *Yeast*, **20**, 381–388.
18. Kempainen, K.K., Rinne, J., Sriram, A., Lakanmaa, M., Zeb, A., Tuomela, T., Popplestone, A., Singh, S., Sanz, A., Rustin, P., and Jacobs, H.T. (2014) Expression of alternative oxidase in *Drosophila* ameliorates diverse phenotypes due to cytochrome oxidase deficiency, *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 2078–2093.
19. Zhu, Y., Lu, J., Wang, J., Chen, F., Leng, F., and Li, H. (2011) Regulation of thermogenesis in plants: the interaction of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein, *J. Integr. Plant Biol.*, **53**, 7–13.
20. Ito, K., Ogata, T., Kakizaki, Y., Elliott, C., Albury, M.S., and Moore, A.L. (2011) Identification of a gene for pyruvate-insensitive mitochondrial alternative oxidase expressed in the thermogenic appendices in *Arum maculatum*, *Plant Physiol.*, **157**, 1721–1732.
21. Ito-Inaba, Y., Hida, Y., and Inaba, T. (2009) What is critical for plant thermogenesis? Differences in mitochondrial activity and protein expression between thermogenic and non-thermogenic skunk cabbages, *Planta*, **231**, 121–130.
22. Walker, R., Jr., Saha, L., Hill, G.C., and Chaudhuri, M. (2005) The effect of over-expression of the alternative oxidase in the procyclic forms of *Trypanosoma brucei*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **139**, 153–162.
23. Veiga, A., Arrabaca, J.D., and Loureiro-Dias, M.C. (2003) Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts, *FEMS Yeast Res.*, **3**, 239–245.
24. Medentsev, A.G., Arinbasarova, A.Y., Golovchenko, N.P., and Akimenko, V.K. (2002) Involvement of the alternative oxidase in respiration of *Yarrowia lipolytica* mitochondria is controlled by the activity of the cytochrome pathway, *FEMS Yeast Res.*, **2**, 519–524.
25. Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Vazquez-Acevedo, M., Gonzalez-Halphen, D., and Uribe-Carvajal, S. (2012) During the stationary growth phase, *Yarrowia lipolytica* prevents the overproduction of reactive oxygen species by activating an uncoupled mitochondrial respiratory pathway, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 353–362.
26. Uribe, D., and Khachatourians, G.G. (2008) Identification and characterization of an alternative oxidase in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, *Canadian J. Microbiol.*, **54**, 119–127.
27. Hernandez, O., Garcia, A.M., Almeida, A.J., Tamayo, D., Gonzalez, A., Restrepo, A., and McEwen, J.G. (2011)

- Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia, *Yeast*, **28**, 771–781.
28. Martins, V.P., Dinamarco, T.M., Soriani, F.M., Tudella, V.G., Oliveira, S.C., Goldman, G.H., Curti, C., and Uyemura, S.A. (2011) Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Eukaryot. Cell*, **10**, 237–248.
 29. Thomazella, D.P., Teixeira, P.J., Oliveira, H.C., Saviani, E.E., Rincones, J., Toni, I.M., Reis, O., Garcia, O., Meinhardt, L.W., Salgado, I., and Pereira, G.A. (2012) The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development, *New Phytol.*, **194**, 1025–1034.
 30. Hiser, C., and McIntosh, L. (1990) Alternative Oxidase of Potato Is an Integral Membrane Protein Synthesized de Novo during Aging of Tuber Slices, *Plant Physiol.*, **93**, 312–318.
 31. Almeida, A.M., Jarmuszkiewicz, W., Khomsi, H., Arruda, P., Vercesi, A.E., and Sluse, F.E. (1999) Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit, *Plant Physiol.*, **119**, 1323–1330.
 32. Considine, M.J., Daley, D.O., and Whelan, J. (2001) The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango, *Plant Physiol.*, **126**, 1619–1629.
 33. Sakajo, S., Minagawa, N., and Yoshimoto, A. (1999) Structure and regulatory expression of a single copy alternative oxidase gene from the yeast *Pichia anomala*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1889–1894.
 34. Huh, W.K., and Kang, S.O. (2001) Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*, *Biochem. J.*, **356**, 595–604.
 35. Parsons, H.L., Yip, J.Y., and Vanlerberghe, G.C. (1999) Increased respiratory restriction during phosphate-limited growth in transgenic tobacco cells lacking alternative oxidase, *Plant Physiol.*, **121**, 1309–1320.
 36. Sieger, S.M., Kristensen, B.K., Robson, C.A., Amirsadeghi, S., Eng, E.W., Abdel-Mesih, A., Moller, I.M., and 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.
 37. Florez-Sarasa, I., Lambers, H., Wang, X., Finnegan, P.M., and Ribas-Carbo, M. (2014) The alternative respiratory pathway mediates carboxylate synthesis in white lupin cluster roots under phosphorus deprivation, *Plant Cell Environ.*, **37**, 922–928.
 38. Escobar, M.A., Franklin, K.A., Salter, M.G., Whitelam, G.C., and Rasmusson, 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.
 39. Watanabe, C.K., Hachiya, T., Takahara, K., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Uesono, Y., Terashima, I., and Noguchi, K. (2010) Effects of *AOX1a* deficiency on plant growth, gene expression of respiratory components and metabolic profile under low-nitrogen stress in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.*, **51**, 810–822.
 40. Hachiya, T., and Noguchi, K. (2011) Integrative response of plant mitochondrial electron transport chain to nitrogen source, *Plant Cell Rep.*, **30**, 195–204.
 41. Honda, Y., Hattori, T., and Kirimura, K. (2012) Visual expression analysis of the responses of the alternative oxidase gene (*aox1*) to heat shock, oxidative, and osmotic stresses in conidia of citric acid-producing *Aspergillus niger*, *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 338–342.
 42. Yukioka, H., Inagaki, S., Tanaka, R., Katoh, K., Miki, N., Mizutani, A., and Masuko, M. (1998) Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide, *Biochim. Biophys. Acta*, **1442**, 161–169.
 43. Angelova, M.B., Pashova, S.B., Spasova, B.K., Vassilev, S.V., and Slokoska, L.S. (2005) Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat, *Mycol. Res.*, **109**, 150–158.
 44. Kunova, A., Pizzatti, C., and Cortesi, P. (2013) Impact of tricyclazole and azoxystrobin on growth, sporulation and secondary infection of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, *Pest Manag. Sci.*, **69**, 278–284.
 45. Clifton, R., Lister, R., Parker, K.L., Sappl, P.G., Elhafez, D., Millar, A.H., Day, D.A., and Whelan, J. (2005) Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.*, **58**, 193–212.
 46. Figueira, T.R., and Arruda, P. (2011) Differential expression of uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase in the plant response to stress, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **43**, 67–70.
 47. Millar, A.H., Whelan, J., Soole, K.L., and Day, D.A. (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **62**, 79–104.
 48. Zhang, D.W., Xu, F., Zhang, Z.W., Chen, Y.E., Du, J.B., Jia, S.D., Yuan, S., and Lin, H.H. (2010) Effects of light on cyanide-resistant respiration and alternative oxidase function in *Arabidopsis* seedlings, *Plant Cell Environ.*, **33**, 2121–2131.
 49. Xu, F., Yuan, S., and Lin, H.H. (2011) Response of mitochondrial alternative oxidase (AOX) to light signals, *Plant Signal. Behav.*, **6**, 55–58.
 50. Yoshida, K., Watanabe, C.K., Hachiya, T., Tholen, D., Shibata, M., Terashima, I., and Noguchi, K. (2011) Distinct responses of the mitochondrial respiratory chain to long- and short-term high-light environments in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Environ.*, **34**, 618–628.
 51. Searle, S.Y., Thomas, S., Griffin, K.L., Horton, T., Kornfeld, A., Yakir, D., Hurry, V., and Turnbull, M.H. (2011) Leaf respiration and alternative oxidase in field-grown alpine grasses respond to natural changes in temperature and light, *New Phytol.*, **189**, 1027–1039.
 52. Searle, S.Y., and Turnbull, M.H. (2011) Seasonal variation of leaf respiration and the alternative pathway in field-grown *Populus X Canadensis*, *Physiol. Plant.*, **141**, 332–342.
 53. Wang, J., Rajakulendran, N., Amirsadeghi, S., and Vanlerberghe, G.C. (2011) Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature, *Physiol. Plant.*, **142**, 339–351.
 54. Costa, J.H., Jolivet, Y., Hasenfratz-Sauder, M.P., Orellano, E.G., da Guia Silva Lima, M., Dizengremel, P., and Fernandes de Melo, D. (2007) Alternative oxidase regulation in roots of *Vigna unguiculata* cultivars differing in drought/salt tolerance, *J. Plant Physiol.*, **164**, 718–727.
 55. Smith, C.A., Melino, V.J., Sweetman, C., and Soole, K.L. (2009) Manipulation of alternative oxidase can influence salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Physiol. Plant.*, **137**, 459–472.
 56. Skirycz, A., De Bodt, S., Obata, T., De Clercq, I., Claeys, H., De Rycke, R., Andriankaja, M., Van Aken, O., Van Breusegem, F., Fernie, A.R., and Inze, D. (2010) Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of *Arabidopsis* leaves to prolonged mild osmotic stress, *Plant Physiol.*, **152**, 226–244.

57. Wang, J., and Vanlerberghe, G.C. (2013) A lack of mitochondrial alternative oxidase compromises capacity to recover from severe drought stress, *Physiol. Plant.*, DOI: 10.1111/ppl.12059.
58. Costa, J.H., Mota, E.F., Cambursano, M.V., Lauxmann, M.A., de Oliveira, L.M., Silva Lima Mda, G., Orellano, E.G., and Fernandes de Melo, D. (2010) Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (*VuAox1* and *2b*) genes in *Vigna unguiculata*, *J. Plant Physiol.*, **167**, 561–570.
59. Xiao, M., Ma, J., Li, H., Jin, H., and Feng, H. (2010) Effects of hydrogen sulfide on alternative pathway respiration and induction of alternative oxidase gene expression in rice suspension cells, *Z. Naturforsch. C.*, **65**, 463–471.
60. Simons, B.H., Millenaar, F.F., Mulder, L., Van Loon, L.C., and Lambers, H. (1999) Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of *Arabidopsis* with *Pseudomonas syringae* pv tomato, *Plant Physiol.*, **120**, 529–538.
61. Fu, L.J., Shi, K., Gu, M., Zhou, Y.H., Dong, D.K., Liang, W.S., Song, F.M., and Yu, J.Q. (2010) Systemic induction and role of mitochondrial alternative oxidase and nitric oxide in a compatible tomato-Tobacco mosaic virus interaction, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **23**, 39–48.
62. Zhang, L., Oh, Y., Li, H., Baldwin, I.T., and Galis, I. (2012) Alternative oxidase in resistance to biotic stresses: *Nicotiana attenuata* AOX contributes to resistance to a pathogen and a piercing-sucking insect but not *Manduca sexta* larvae, *Plant Physiol.*, **160**, 1453–1467.
63. Liao, Y.W., Shi, K., Fu, L.J., Zhang, S., Li, X., Dong, D.K., Jiang, Y.P., Zhou, Y.H., Xia, X.J., Liang, W.S., and Yu, J.Q. (2012) The reduction of reactive oxygen species formation by mitochondrial alternative respiration in tomato basal defense against TMV infection, *Planta*, **235**, 225–238.
64. Colombatti, F., Gonzalez, D.H., and Welchen, E. (2014) Plant mitochondria under pathogen attack: A sigh of relief or a last breath? *Mitochondrion*, **19**, 238–244.
65. Ederli, L., Morettini, R., Borgogni, A., Wasternack, C., Miersch, O., Reale, L., Ferranti, F., Tosti, N., and Pasqualin, S. (2006) Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants, *Plant Physiol.*, **142**, 595–608.
66. Rhoads, D.M., and McIntosh, L. (1992) Salicylic Acid Regulation of Respiration in Higher Plants: Alternative Oxidase Expression, *Plant Cell*, **4**, 1131–1139.
67. Lei, T., Yan, Y.C., Xi, D.H., Feng, H., Sun, X., Zhang, F., Xu, W.L., Liang, H.G., and Lin, H.H. (2008) Effects of salicylic acid on alternative pathway respiration and alternative oxidase expression in tobacco calli, *Z. Naturforsch. C.*, **63**, 706–712.
68. Matos, A.R., Mendes, A.T., Scotti-Campos, P., and Arrabaca, J.D. (2009) Study of the effects of salicylic acid on soybean mitochondrial lipids and respiratory properties using the alternative oxidase as a stress-reporter protein, *Physiol. Plant.*, **137**, 485–497.
69. Mallo, N., Lamas, J., and Leiro, J.M. (2014) Alternative oxidase inhibitors as antiparasitic agents against scuticociliatosis, *Parasitology*, **14**, 1–11.
70. Ho, L.H., Giraud, E., Uggalla, V., Lister, R., Clifton, R., Glen, A., Thirkettle-Watts, D., Van Aken, O., and Whelan, J. (2008) Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, **147**, 1858–1873.
71. Medentsev, A.G., Arinbasarova, A.Y., and Akimenko, V.K. (2004) Reactivation of the alternative oxidase of *Yarrowia lipolytica* by nucleoside monophosphates, *FEMS Yeast Res.*, **5**, 231–236.
72. Akhter, S., McDade, H.C., Gorlach, J.M., Heinrich, G., Cox, G.M., and Perfect, J.R. (2003) Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*, *Infect. Immun.*, **71**, 5794–5802.
73. Magnani, T., Soriani, F.M., Martins, V.P., Nascimento, A.M., Tudella, V.G., Curti, C., and Uyemura, S.A. (2007) Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress, *FEMS Microbiol. Lett.*, **271**, 230–238.
74. Sierra-Campos, E., Velazquez, I., Matuz-Mares, D., Villavicencio-Queijeiro, A., and Pardo, J.P. (2009) Functional properties of the *Ustilago maydis* alternative oxidase under oxidative stress conditions, *Mitochondrion*, **9**, 96–102.
75. Scheckhuber, C.Q., Houthoofd, K., Weil, A.C., Werner, A., De Vreese, A., Vanfleteren, J.R., and Osiewacz, H.D. (2011) Alternative oxidase dependent respiration leads to an increased mitochondrial content in two long-lived mutants of the aging model *Podospira anserina*, *PLoS One*, **6**, e16620.
76. Xu, T., Yao, F., Liang, W.S., Li, Y.H., Li, D.R., Wang, H., and Wang, Z.Y. (2012) Involvement of alternative oxidase in the regulation of growth, development, and resistance to oxidative stress of *Sclerotinia sclerotiorum*, *J. Microbiol. (Seoul, Korea)*, **50**, 594–602.
77. Maxwell, D.P., Wang, Y., and McIntosh, L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8271–8276.
78. Yip, J.Y., and Vanlerberghe, G.C. (2001) Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake, *Physiol. Plant.*, **112**, 327–333.
79. Van Aken, O.V., Giraud, E., Clifton, R., and Whelan, J. (2009) Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses, *Physiol. Plant.*, **137**, 354–361.
80. Mhadhbi, H., Fotopoulos, V., Mylona, P.V., Jebara, M., Aouani, M.E., and Polidoros, A.N. (2013) Alternative oxidase 1 (*Aox1*) gene expression in roots of *Medicago truncatula* is a genotype-specific component of salt stress tolerance, *J. Plant Physiol.*, **170**, 111–114.
81. Gerin, S., Mathy, G., Blomme, A., Franck, F., and Sluse, F.E. (2010) Plasticity of the mitoproteome to nitrogen sources (nitrate and ammonium) in *Chlamydomonas reinhardtii*: the logic of *Aox1* gene localization, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 994–1003.
82. Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C., and Siedow, J.N. (2006) Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling, *Plant Physiol.*, **141**, 357–366.
83. Koornneef, A., and Pieterse, C.M. (2008) Cross talk in defense signaling, *Plant Physiol.*, **146**, 839–844.
84. Robson, C.A., and Vanlerberghe, G.C. (2002) Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death, *Plant Physiol.*, **129**, 1908–1920.
85. Cvetkovska, M., and Vanlerberghe, G.C. (2012) Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial concentrations of superoxide and nitric oxide, *New Phytol.*, **195**, 32–39.
86. 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., and Whelan, J. (2008) The absence of alternative oxidase-a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress, *Plant Physiol.*, **147**, 595–610.
87. Tudella, V.G., Curti, C., Soriani, F.M., Santos, A.C., and Uyemura, S.A. (2004) In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain

- of *Aspergillus fumigatus*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 162–172.
88. Ruiz, O.H., Gonzalez, A., Almeida, A.J., Tamayo, D., Garcia, A.M., and Restrepo, A. (2011) Alternative oxidase mediates pathogen resistance in *Paracoccidioides brasiliensis* infection, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **5**, e1353.
 89. Ma, H., Song, C., Borth, W., Sether, D., Melzer, M., and Hu, J. (2011) Modified expression of alternative oxidase in transgenic tomato and petunia affects the level of tomato spotted wilt virus resistance, *BMC Biotechnol.*, **11**, 96.
 90. Frederico, A.M., Campos, M.D., Cardoso, H.G., Imani, J., and Arnholdt-Schmitt, B. (2009) Alternative oxidase involvement in *Daucus carota* somatic embryogenesis, *Physiol. Plant.*, **137**, 498–508.
 91. Rasmusson, A.G., Fernie, A.R., and van Dongen, J.T. (2009) Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiol. Plant.*, **137**, 371–382.
 92. Chai, T.T., Colmer, T.D., and Finnegan, P.M. (2010) Alternative oxidase, a determinant of plant gametophyte fitness and fecundity, *Plant Signal. Behav.*, **5**, 604–606.
 93. Hanqing, F., Kun, S., Mingquan, L., Hongyu, L., Xin, L., Yan L., and Yifeng, W. (2010) The expression, function and regulation of mitochondrial alternative oxidase under biotic stresses, *Mol. Plant Pathol.*, **11**, 429–440.
 94. Hakkaart, G.A., Dassa, E.P., Jacobs, H.T., and Rustin, P. (2006) Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration, *EMBO Rep.*, **7**, 341–345.
 95. Matsukawa, K., Kamata, T., and Ito, K. (2009) Functional expression of plant alternative oxidase decreases antimycin A-induced reactive oxygen species production in human cells, *FEBS Lett.*, **583**, 148–152.
 96. Dassa, E.P., Dufour, E., Goncalves, S., Jacobs, H.T., and Rustin, P. (2009) The alternative oxidase, a tool for compensating cytochrome *c* oxidase deficiency in human cells, *Physiol. Plant.*, **137**, 427–434.
 97. Kakizaki, Y., Seymour, R.S., and Ito, K. (2010) A novel functional element in the N-terminal region of *Arum concinatum* alternative oxidase is indispensable for catalytic activity of the enzyme in HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 20–28.
 98. Perales-Clemente, E., Bayona-Bafaluy, M.P., Perez-Martos, A., Barrientos, A., Fernandez-Silva, P., and Enriquez, J.A. (2008) Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18735–18739.
 99. Fernandez-Ayala, D.J., Sanz, A., Vartiainen, S., Kemppainen, K.K., Babusiak, M., Mustalahti, E., Costa, R., Tuomela, T., Zeviani, M., Chung, J., O'Dell, K.M., Rustin, P., and Jacobs, H.T. (2009) Expression of the *Ciona intestinalis* alternative oxidase (AOX) in *Drosophila* complements defects in mitochondrial oxidative phosphorylation, *Cell Metab.*, **9**, 449–460.
 100. Humphrey, D.M., Parsons, R.B., Ludlow, Z.N., Riemensperger, T., Esposito, G., Verstreken, P., Jacobs, H.T., Birman, S., and Hirth, F. (2012) Alternative oxidase rescues mitochondria-mediated dopaminergic cell loss in *Drosophila*, *Human Mol. Genet.*, **21**, 2698–2712.
 101. El-Khoury, R., Dufour, E., Rak, M., Ramanantsoa, N., Grandchamp, N., Csaba, Z., Duvillie, B., Benit, P., Gallego, J., Gressens, P., Sarkis, C., Jacobs, H.T., and Rustin, P. (2013) Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome *c* oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction, *PLoS Genet.*, **9**, e1003182.
 102. Vanlerberghe, G.C., Vanlerberghe, A.E., and McIntosh, L. (2011) Molecular genetic evidence of the ability of alternative oxidase to support respiratory carbon metabolism, *Plant Physiol.*, **113**, 657–661.

PHYSIOLOGICAL ROLE OF THE ALTERNATIVE OXIDASE (FROM YEASTS TO PLANTS)

A. G. Rogov*, R. A. Zvyagilskaya

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33, Moscow 119071, Russia; fax: +7(495)954-2732, E-mail: lloss@rambler.ru

Received November 20, 2014

Mitochondria of all so-far studied organisms, with the exception of Archaea, mammals, some yeasts, and protists, contain, along with the classical phosphorylating cytochrome pathway, a so-called cyanide-insensitive alternative oxidase localized on the matrix side of the mitochondrial inner membrane, electron transport through which is not coupled with ATP synthesis and energy accumulation. Mechanisms underlying plentiful functions of the alternative oxidase in organisms at various levels of organization ranging from yeasts to plants are considered. First and foremost, the alternative oxidase provides a chance for cell survival after inhibiting the terminal components of the main respiratory chain or losing an ability to synthesize these components. The vitally important role of the alternative oxidase is obvious in thermogenesis of thermogenic plant organs, where it becomes the only terminal oxidase with very high activity, and the energy of substrate oxidation by this respiratory pathway is converted into heat, thus promoting evaporation of volatile substances, attracting pollinating insects. The alternative oxidase plays a fundamentally significant role in alleviating or preventing oxidative stress, thus ensuring defense against a wide range of stresses and adverse environmental conditions such as changes in temperature and light intensities, osmotic stress, drought, and attack by incompatible strains of bacterial pathogens, phytopathogens, or their elicitors. The participation of the alternative oxidase in pathogen survival during its existence inside the host, in antiviral defense, as well as in metabolic rearrangements in plants during embryogenesis and cell differentiation is described. Examples are given to demonstrate that the alternative oxidase can be an important tool to overcome the adverse aftereffects of restricted activity of the main respiratory chain in cells and whole animals.

Key words: alternative oxidase, active reactive species, yeasts, fungi, protists, plants, oxidative stress, pathogen attack