

Struktura i uloga alternativne oksidaze u biljaka

Plavec, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:361522>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATI CI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**STRUKTURA I ULOGA ALTERNATIVNE OKSIDAZE U
BILJAKA**

**STRUCTURE AND ROLE OF ALTERNATIVE OXIDASE IN
PLANTS**

ZAVRŠNI SEMINAR

Student: Katarina Plavec

Preddiplomski studij Molekularna biologija

Undergraduet study of Molecular Biology

Mentor: doc. dr. sc. Željka Vidakovi - Cifrek

Zagreb, 2010.

POPIS KRATICA

AOX - alternativna oksidaza

EXXH motiv - slijed od 4 aminokiseline, E - glutamat, H - histidin, X - bilo koja aminokiselina

SADRŽAJ

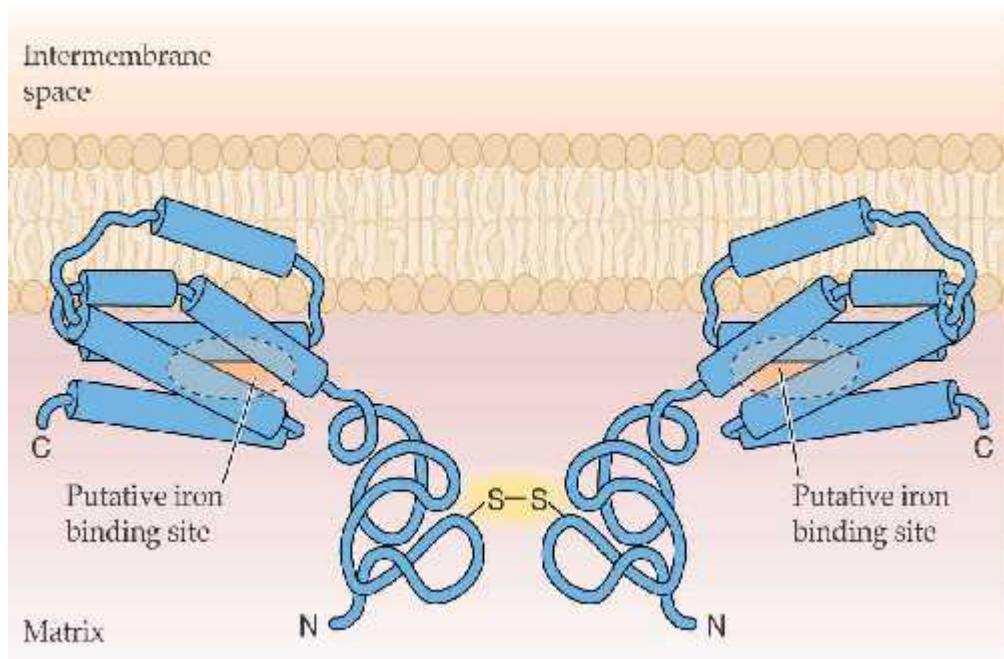
1.	UVOD	3
2.	STRUKTURA ALTERNATIVNE OKSIDAZE	5
3.	ULOGA ALTERNATIVNE OKSIDAZE.....	7
4.	LITERATURA	10
5.	SAŽETAK.....	12
6.	SUMMARY	Error! Bookmark not defined.

1. UVOD

Alternativna oksidaza je sastavnica lanca prijenosa elektrona u mitohondrijima, a osim u mitohondrijima prona ena je i u kloroplastima. Funkcija i struktura najviše su istraživane u biljkama, iako je poznato da je prisutna i u nekim skupinama životinjskih organizama - u bodljikašima, koluti avcima, mekušcima, spužvama i žarnjacima. Nije prona ena u arhebakterijama (McDonald i sur. 2009).

Alternativna oksidaza je integralni membranski protein gra en od dva monomera (slika 1). Masa pojedinog monomera je približno 32 kDa (Siedow i sur. 1995).

Prvi strukturni model (SUM model) predložili su 1995. godine James N. Siedow, Ann L. Umbach i Anthony L. Moore, a 1999. godine Martin E. Andersson i Pär Nordlund predložili su drugi, mnogo to niji i precizniji, model (AN model) na temelju poznatih sekvenci cDNA molekula koje kodiraju proteinske podjedinice alternativne oksidaze (Buchanan i sur. 2000).



Slika 1. Struktura alternativne oksidaze (Buchanan i sur. 2002)

Ekspresija alternativne oksidaze potaknuta je u razli itim stresnim uvjetima kao što su smrzavanje, napad patogena, otpadanje listova, suša, osmotski stres te tijekom sazrijevanja

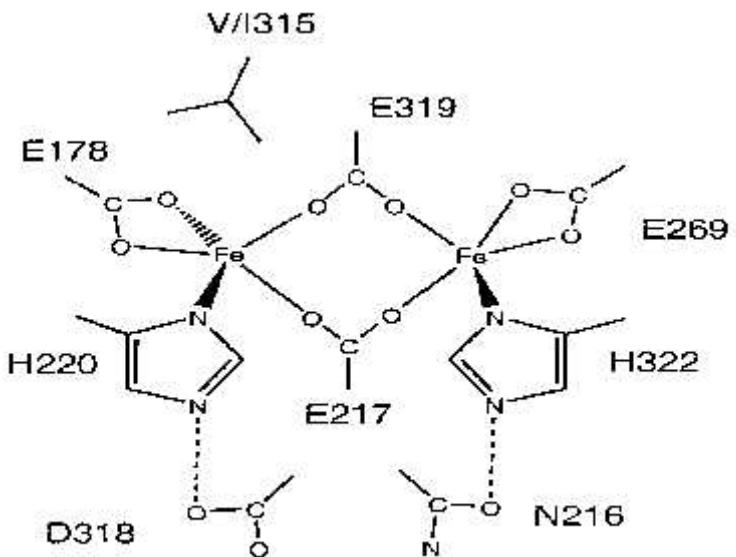
plodova. Aktivnost je regulirana u skladu s redoks stanjem mitohondrija i koncentracijom piruvata.

U normalnim uvjetima u stanici kisik je krajnji akceptor elektrona u lancu prijenosa elektrona i prima ih sa citokrom *c*-oksidaze. U stresnim uvjetima alternativna oksidaza, koja za razliku od citokrom *c*-oksidaze nije hem protein, predaje elektrone kisiku prije nego se zaobilazi citokrom *c*-oksidaza i zato se taj put naziva „put neovisan o citokromu“ (slika 3). Prilikom takvog prijenosa elektrona velika količina energije se oslobađa u obliku topline koja se u nekih biljaka kao što su kozlaci i lotos iskorištava kao poticaj za isparavanje mirisnih komponenti kojima se privlače kukci (Buchanan i sur. 2002). Alternativna oksidaza je kodirana u jezgri, a sintetizira se na ribosomima u citosolu. Sinteza je potaknuta inhibicijom lanca prijenosa elektrona. Za indukciju alternativne oksidaze u vrsti *Arabidopsis thaliana* u prisutnosti inhibitora Krebsovog ciklusa, kao što su antimicin A i monofluoroacetat, potrebna je aktivnost nekoliko gena. U vrste *Neurospora crassa* alternativna oksidaza kodirana je samo jednim *aod-1* genom, a kasnije su otkriveni još neki dodatni geni koji su uključeni u put prijenosa signala za njenu ekspresiju (Chae i sur. 2007).

2. STRUKTURA ALTERNATIVNE OKSIDAZE

Alternativna oksidaza ubraja se u 2Fe karboksilatnu skupinu proteina za koju je karakterističan ne-hemski 2Fe centar i u koju se ubrajaju i stearoil-ACP-desaturaza-1, metan monooksigenaza i R2 podjedinica ribonukleotid reduktaze. To je velik homodimerni integralni protein od 32 kDa koji je kodiran u jezgri malom obitelji jezgrinih gena *Aox1*, *Aox2a* i *Aox2b*, a mjesto djelovanja mu je unutarnja membrana mitohondrija (Albury i sur. 2010). Sastoji se od 2Fe centra i četiri uzvojnica koje se provlače kroz membranu, a međusobno su povezane s uzvojnicom. Dva atoma željeza vezana su na četiri uzvojnica pomoću glutaminskih i histidinskih ogranka, i imaju ključnu ulogu u samom procesu redukcije kisika (slika2). Proces odvajanja alternativne oksidaze u svrhu istraživanja je otežan zbog snažnih interakcija koje se ostvaruju između proteina i membrane, to nije između hidrofobne regije proteina koja je okružena s pozitivno nabijenim ograncima i fosfolipidnim glavama lipidnih molekula u membrani. Upravo stoga je većina istraživanja rađena na djelomičnoj proteinu.

Na samom proteinu možemo razlikovati nekoliko domena: aktivno mjesto, vezno mjesto za ubikvinol koji je glavni reducirajući supstrat alternativne oksidaze i veznu domenu koja služi za vezanje na membranu. U aktivnom mestu nalazi se 2Fe centar i javljaju se tri motivi EXXH. Motivi EXXH, to nije glutaminski i histidinski ogranci koji su smješteni na drugoj i četvrtoj uzvojnici i međusobno su antiparalelni, ključni su za stvaranje 2Fe veznog centra. Oba terminalna kraja alternativne oksidaze, i N-terminalni i C-terminalni dio, nalaze se između dviju membranske regije. Pri tome 1/3 sekvence gradi N-, a 2/3 C-terminalni kraj (Umbach i sur. 2005). Jedan EXXH motiv smješten je u blizini N-terminalnog kraja i stoga se nalazi tako da je između dviju membrana, a druga dva se nalaze u međumembranskom prostoru i sudjeluju u stvaranju 2Fe centra. Ukupno je u strukturi uključeno 335 aminokiselinskih ogrankova koji grade četiri uzvojnica i veznu regiju između drugih i trećih uzvojnica. Vezna regija je segment koji je visoko hidrofoban te je okružen s pozitivno nabijenim ograncima i prolazi kroz samu membranu. Pomoću njega se uzvojnica spajaju s C-terminalnim dijelom prve uzvojnica i tako nastaje hidrofobna regija koja može stvarati interakcije sa fosfolipidnim glavama i pomoći u tih interakcijama protein je vezan i stabiliziran na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani.

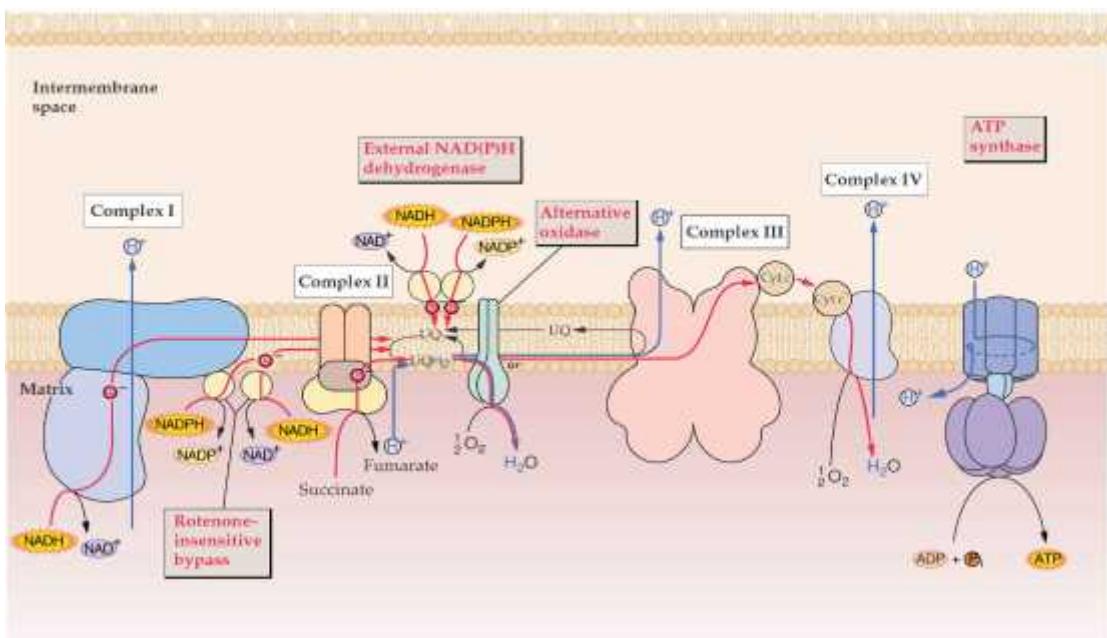


Slika 2. Fe centar alternativne oksidaze (Andresson i Nodlund 1999)

Vežno mjesto za ubikvitin je utor širok 0,5 nm i dug 1 nm, a sadrži ogranke L177, A181, P184, G185, V187, L210, A/S214, G265, L268 i V/I272. Svi ti ogranci su smješteni jedan ili dva okreta uzvojnice od veznih mjesta za željezo na prvoj, drugoj i treoj uzvojnici (Tanton i sur. 1999). Prisutnost piruvata ili tiamin pirofosfata uzrokuje konformacijsku promjenu kojom se omoguava da ubikvitin pristupi svom veznom mjestu (Umbach i sur. 2005). Promjena konformacije podjedinica ograničena je veznom regijom kojom se protein spaja s membranom i dva cisteinska ogranka Cys_I i Cys_{II}. Cys_I ogrankak jednog monomera inaktivira alternativnu oksidazu stvaranjem disulfidne veze sa Cys_I ogrankom drugog monomera. Ukoliko se na reducirani Cys_I ogrankak veže -keto kiselina, kao što je piruvat, dolazi do aktivacije alternativne oksidaze. Ukoliko se Cys_I ogrankak zamijeni nekom pozitivno nabijenom aminokiselinom, zbog onemogućenog nastanka disulfidnog mosta kojim bi se enzim inaktivirao, dobivamo konstitutivno aktivran enzim. Vezanjem manjih -keto kiselina i glioksilata na Cys_{II} ogrankak takođe mogu regulirati aktivnost alternativne oksidaze (Buchanan i sur. 2000).

3. ULOGA ALTERNATIVNE OKSIDAZE

Respiratori lanac biljnih mitohondrija vrlo je sličan respiratornom lancu sisavaca koji se sastoji od četiri proteinska kompleksa: kompleksa I ili NADH-dehidrogenaze, kompleksa II ili sukcinat-dehidrogenaze, kompleksa III ili citokrom bc_1 kompleksa i kompleksa IV ili citokrom c -oksidaze te ATP-sintaze (Slika 3). Alternativna oksidaza je uz citokrom c -oksidazu mogući terminalni akceptor elektrona u respiratornom lancu prijenosa elektrona u mitohondrijima. Na njeno djelovanje ne utječe u inhibitori citokrom c -oksidaze i citokrom bc_1 kompleksa. Katalizira redukciju O_2 u H_2O prije nego što je stopa prijenosa protona odvija prijenos preko unutarnje mitohondrijske membrane niža pa se u manjoj mjeri se uspostavlja gradijent protona. Naime, prelazak elektrona na kisik odvija se preko alternativne oksidaze, a tada u prijenosu ne učestvuju kompleksi III i IV koji bi značajno doprinjeli stvaranju protonskog gradijenta (Berthold i sur. 2000).



Slika 3. Položaj alternativne oksidaze u dišnom lancu biljnih mitohondrija (Buchanan i sur. 2002)

često se za alternativnu oksidazu kaže da joj aktivnost ovisi o stresnim uvjetima u kojima je učinko znatno povećane ekspresije. Stresni imbenici koji potiču u ekspresiju alternativne oksidaze su ranjavanje, smrzavanje, suša, osmotski stres, napad patogena,

tretman salicilnom kiselinom ili vodikovim peroksidom, ili nekom drugom tvari koja smanjuje ili inhibira aktivnost osnovnog respiratornog lanca (Juszczuk i Rychter 2003). Aktivnost alternativne oksidaze nešto je niža u nefotosintetskim biljkama, zna ajno varira od organizma do organizma, a pokazuje i tkivnu specifi nost (Moore i sur. 2002). U uvjetima smanjene ili ograni ene dostupnosti adenilata ili ograni enog prijenosa elektrona omogu ava normalno odvijanje ciklusa limunske kiseline. Istraživanja su pokazala da je u stresnim uvjetima pove ana ekspresija *Aox1* gena, a da ekspresija *Aox2* gena ovisi o razvojnom stadiju i starosti same biljke i da se ekspresijom tih gena održava ravnoteža respiratornog metabolizma. Neprestano se u biljnim stanica odvija niska ekspresija alternativne oksidaze što upu uje na njenu ulogu u održavanju integriranog biljnog metabolizma. Isti stresni uvjeti koji uzrokuju stvaranje reaktivnih oblika kisika uzrokuju pove anu ekspresiju alternativne oksidaze što upu uje na to da alternativna oksidaza umanjuje njihovo štetno djelovanje. Biljka djelovanjem alternativne oksidaze uspostavlja energetsku ravnotežu sa okolišem i prilago ava se nastalim promjenama. Tako er omogu ava prilagodbu biljke na uvjete smanjene koli ine fosfata. Ima i ulogu u sprje avanju programirane stani ne smrti (Moore i sur. 2002). U transgeni nom duhanu koji je imao ograni enu ekspresiju alternativne oksidaze uo eno je da su dvije tvari koje uzrokuju programiranu stani nu smrt prisutne u mnogo ve oj koncentraciji od uobi ajene, a to su bile salicilna kiselina i vodikov peroksid. Kod S4 mutanta duhana uo eno je da prekomjerna ekspresija alternativne oksidaze zna ajno reducira veli inu štetnih lezija i da pove ava otpornost na programiranu stani nu smrt uzrokovanu vodikovim peroksidom, kao i da u takvim mutantima imamo pet puta manju koli inu reaktivnih oblika kisika. Prepostavlja se da se razvila u davnoj prošlosti u mitohondrijima biljaka kao prilagodba na prelazak iz anoksi ne u atmosferu bogatu kisikom te da se je zatim primarnim endosimbiotskim doga ajem „preselila“ i u kloroplaste. Plastidna alternativna oksidaza je strukturalno jednaka onoj iz mitohondrija pri emu mogu nastati reaktivni oblici kisika koji mogu narušiti strukturu i funkciju kloroplasta (Juszczuk i Rychter 2003).

U najnovijim istraživanjima se pokazalo da je osim u biljnim prisutna i u životinjskim mitohondrijima. Tako er je važna u uspostavljanju tolerancije na stres, osobito pri niskoj vrijednosti pH, povišenoj temperaturi i visokoj koncentraciji štetnih metala u okolišu (McDonald i sur 2009).

Tijekom godina istraživanja alternativne oksidaze uo eno je zna ajno naslje ivanje njenih gena vertikalnom linijom, dok gotovo da i nije bilo uo enih primjera horizontalnog prijenosa. Na temelju toga je zaklju eno da se alternativna oksidaza javlja u mnogo ve em broju organizama nego što je do danas poznato, a da su u svega nekoliko skupina organizama njeni geni tijekom evolucijskog razvoja izgubljeni. Time je potvr ena pretpostavka o njenoj važnosti prilikom prelaska života iz vode na kopno (McDonald i sur 2009).

4. LITERATURA

Albury, S. M., Elliott, C., Moore, L. A. (2010) Ubiquinol-binding site in the alternative oxidases: Mutagenesis reveals features important for substrate binding and inhibition, Elsevier 46400, 14-21

Andersson, E. M., Nordlund, P. (1999) A revised model of the active site of alternative oxidases, FEBS Letters 449, 17-22

Austin, J. II, Scott, Z., Webber A. N. (2010) Plastid alternative oxidase functions as an alternative electron acceptor in *Arabidopsis* and may protect young plastids from photodamage, Lycris Universe AZ 85287 - 1601

Buchanan, B., Gruissem, W., Russel, J.(2002) Biochemistry and Molecular Biology of Plants, John Wiley & Sons, Inc , USA , str. 696 - 706

Berthold,A. D., Andersson, E. M., Nordlund, P. (2000) New insight into the structure and function of the alternative oxidases, Elsevier 1460, 241-254

Chae, S. M., Nargang, E. C.I, Cleary ,A. I., Lin C. C., Todd, T. A., Nargang, E. F. (2007) Two Zinc – Cluster Transcription Factors Control Induction of Alternative Oxidase in *Neurospora crassa* , Genetics 177, 1997-2006

Juszczuk, M. I., Rychter, M. A. (2003) Alternative oxidases in higher plants, Science 50, 1257-1271

McDonald, A. E., Vanlerberghe, C. G., Staples, F. J. (2009) Alternative oxidases in animals: unique characteristics and taxonomic distribution, Experimental Biology 212, 2627 - 2634

Moore, L. A., Albury, S. M., Crichton, G. P., Affourtit, C. (2002) Function of the alternative oxidases: is it still a scavenger? , Plant Science 7, 478 - 481

Siedow, N. J., Umbach, L. A., Moore, L. A. (1995) The active site of the cyanide – resistant oxidases from plant mitochondria contains a binuclear iron center, FEBS Letters 362, 10-14

Tanton, L. L., Nargang. E. C., Kessler E. K., Li, Q., Nargang, E. F. (2002) Alternative oxidases expression in *Neurospora crassa* , Academic press 39, 176-190

Umbach, L. A., Ng, S. V., Siedow, N. J. (2005) Regulation of plant alternative oxidases activity: A tale of two cysteines, 1757, 135-142

5. SAŽETAK

Alternativna oksidaza nalazi se u dišnom lancu mitohondrija biljaka, a također i u nekim plastidima kao što su kloroplasti. Nije prisutna samo u biljkama, kao što se prvotno mislilo, već je dokazana i u nekim životinjama. Ekspresija alternativne oksidaze usko je povezana s pojavom različitih stresnih uvjeta što dovodi do zaključka da doprinosi otpornosti na takve uvjete, ali i zaštiti biljnog tkiva od štetnih u inaka reaktivnih oblika kisika. Pretpostavlja se da se tijekom evolucije razvila kao prilagodba na nove životne uvjete u kojima su se našli biljni, ali i životinjski organizmi prilikom prilagodbe na život na kopnu. Danas je poznat velik broj biljnih, ali i neki životinjski organizmi, u kojima je zastupljena pa se pretpostavlja se da će se dalnjim istraživanjima upotpuniti saznanja o njezinoj ulozi.

6. SUMMARY

Alternative oxidase is a component of mitochondrial respiratory chain in plants, but it is also found in some plastids such as chloroplasts. It is not only present in plants, as it was originally meant. It is already found in some animals. Expression of alternative oxidase is closely associated with various stress conditions, which leads to the conclusion that it is important in survival in such conditions, but also in protecting plant tissues from the harmful effects of reactive oxygen species. It is supposed that it was developed during evolution as an adaptation of plant and animal organisms to life on land. Today it known that alternative oxidase is present in a great number of plant species and also in some animal oragnisms. It could be expected that the knowledge about its role will be completed in further investigations.

.