

АЛЬТЕРНАТИВНАЯ ОКСИДАЗА: РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ИНДУКЦИЯ, СВОЙСТВА, СТРУКТУРА, РЕГУЛЯЦИЯ, ФУНКЦИИ

©2014 г. А. Г. РОГОВ^{1*}, Е. И. СУХАНОВА¹,
Л. А. УРАЛЬСКАЯ¹, Д. А. АЛИВЕРДИЕВА²,
Р. А. ЗВЯГИЛЬСКАЯ¹

¹ Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва,

² Прикаспийский институт биологических ресурсов,
ДНЦ РАН, Махачкала (pibrdnrcran@mail.ru)

I. Введение. II. История открытия АО. III. Распространение АО.
IV. Свойства АО. V. Индукция АО. VI. Генные структуры, кодирующие
АО. VII. Структура АО. VIII. Биогенез АО. IX. Регуляция АО.
X. Физиологическая роль АО.

I. ВВЕДЕНИЕ

Важной особенностью дыхательной цепи большинства организмов аэробного типа обмена является сосуществование наряду с фосфорилирующей цитохромной цепью нечувствительного к действию цианида и антимицина А окислительного пути с так называемой альтернативной оксидазой (АО) в качестве терминальной оксидазы. В работе приведены сведения об истории открытия АО. Представлены доказательства, что АО широко распространена среди организмов разной степени сложности организации и не ограничивается царством растений. Не найдена она только у архей, млекопитающих, некоторых дрожжей и простейших. Методами биоинформатики найдены последовательности АО у представителей разных таксономических групп и на основе множественного выравнивания этих последовательностей построено филогенетическое дерево, воспроиз-

Принятые сокращения: АО – альтернативная оксидаза, АФК – активные формы кислорода, ПТО – пластидная терминальная оксидаза.

* Адрес для корреспонденции: lloss@rambler.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-01530), Российского научного фонда (грант № 14-24-00107) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

водящее их возможную эволюцию. Описаны способы активации АО, ее регуляции, регуляторные взаимоотношения с основной дыхательной цепью. Суммированы данные о свойствах АО, о кодирующих АО генах, экспрессирующихся как конститутивно, так и индуцируемых различными факторами. Собраны сведения о структуре АО, ее активного центра и сайта связывания убихинона. Описаны важнейшие функции АО, связанные в ряде случаев с выживанием клеток, с оптимизацией дыхательного обмена, защитой от избыточных активных форм кислорода и азота, с адаптацией к меняющимся источникам питания, биотическим и абиотическим факторам стресса. Подчеркивается, что функции АО могут быть не взаимоисключающими, а дополняющими друг друга. Приведены примеры использования АО в качестве важного инструмента для борьбы с пагубными последствиями ограничения активности основной дыхательной цепи в клетках и целых животных. Это первый всеобъемлющий обзор по АО разных организмов от дрожжей и простейших до растений.

Митохондрии всех до сих пор изученных растений, большинства грибов, водорослей и некоторых простейших, в дополнение к канонической цитохромоксидазе дыхательной цепи, ингибируемой цианидом, содержат нечувствительную к действию цианида терминальную оксидазу, названную альтернативной оксидазой (АО). АО – это кодируемый ядерным геномом интегральный белок внутренней митохондриальной мембраны с мол. массой 32–36 кДа, локализованный на внутренней стороне внутренней митохондриальной мембраны и катализирующий четырехэлектронное окисление убихинола (восстановленной формы убихинона) кислородом до воды (рис. 1). В отличие от комплексов I, III и IV дыхательной цепи, в которых перенос электронов сопровождается транслокацией протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану с последующим использованием протонного градиента для синтеза АТФ, перенос электронов через АО не сопряжен с синтезом АТФ и запасанием энергии и энергия окисления убихинола кислородом выделяется в виде тепла [1, 2]. Важная роль АО в таких фундаментальных процессах как термогенез термогенных органов растений, выживание простейших-паразитов, адаптация организмов к многочисленным биотическим и абиотическим факторам стресса, регуляция фотосинтеза у растений и защита фотосинтетического аппарата от деструкции, вызванной окислительным стрессом, регуляция взаимоотношения растение–патоген и степени патогенности у патогенных грибов вызвала интерес к выяснению структуры, свойств и, особенно, регуляции АО.

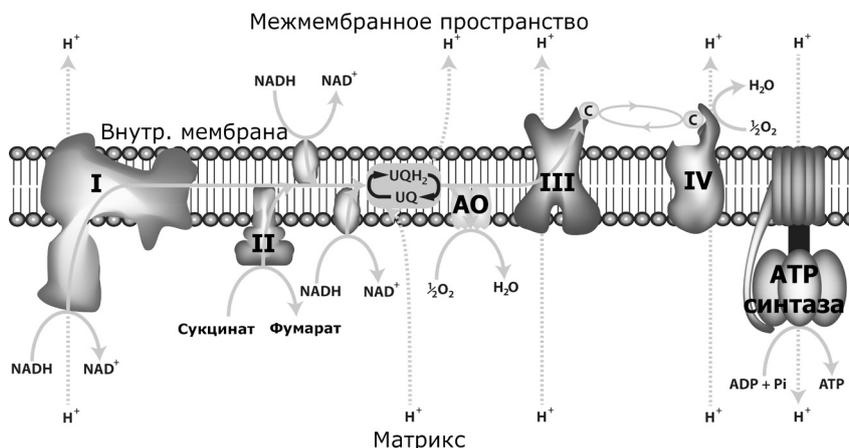


Рис. 1. Структура дыхательной цепи растений и некоторых грибов.

II. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ АО

Первые указания на способность клеток некоторых водорослей и грибов сохранять дыхание даже в присутствии цианида, ингибитора основной митохондриальной дыхательной цепи, были получены в начале прошлого столетия [см. 3]. Затем было найдено, что цианид-резистентное дыхание свойственно также растениям и некоторым простейшим. Было предложено несколько гипотез для объяснения его природы. На роль АО попеременно предлагались флавопротеин с низким сродством к кислороду, цитохром *a*-типа, цитохром *b7* и другие соединения. Не исключалась и возможность того, что активность цианид-резистентного альтернативного пути может объясняться радикальными реакциями с участием компонентов основной дыхательной цепи [см. 3]. В 1971 г. Bendal and Bonner [см. 3] показали несостоятельность этих предположений. Более того, они доказали, что восстановительные эквиваленты поступают на локализованную в митохондриях АО из основной дыхательной цепи на субстратной стороне антимицин А-чувствительной точки и что активность АО ингибируется агентами, хелатирующими катионы с переменной валентностью, главным образом Fe. Это позволило предположить, что наиболее вероятным кандидатом на роль терминальной цианид-резистентной оксидазы является негемовое железо. Открытие более специфических ингибиторов АО – гидроксамовых кислот, блокирующих ее в концентрациях, не влияющих на активность основного цитохромного пути [4], наряду

с разработкой более совершенных методов анализа, способствовали быстрому развитию этой области исследований. В 1978 г. из активных термогенных тканей растения *Arum maculatum* удалось получить высокоочищенный препарат АО [5], в 1986–1987 гг. из термогенного растения *Saurumatum guttatum* был получен высокоочищенный препарат АО, коррелировавший с содержанием белков с мол. массой 35,5–36 кДа [6, 7]. Были получены моноклональные антитела к ним [8], которые разошлись по всему миру. С помощью антител АО была идентифицирована в митохондриях гриба *Neurospora crassa* [9].

Двумя годами позже [10] из ДНК-библиотеки *S. guttatum* была выделена кДНК, кодирующая 38,9-кДа белок, предшественник одной или двух форм АО этого организма. С тех пор высокоочищенные или частично очищенные препараты АО были выделены из водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [11], формы *Trypanosoma brucei*, обитающей в кровотоке [12], термогенной ткани *A. maculatum* [13]. Гены, кодирующие АО, были выделены из сои [14], табака [15], метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* [16], термогенной ткани *Symplocarpus renifolius* [17]. Поскольку выделение высокоочищенных препаратов АО из растений представляет определенные трудности, в ряде случаев для определения структуры, регуляции и функциональной роли АО были использованы рекомбинатные штаммы [18–22]. Стало ясно, что АО широко распространена в природе и, по-видимому, довольно консервативна.

III. РАСПРОСТРАНЕНИЕ АО

Использование методов биоинформатики позволило установить, что АО широко распространена среди организмов разной степени сложности организации и не ограничивается царством растений [23]. Не найдена она только у архей, млекопитающих, некоторых дрожжей и простейших. В растениях АО в качестве терминальной оксидазы найдена у всех покрытосеменных, исследованных на сегодня, у ряда голосеменных, а также в мхах, лишайнике *Physcomitrella patens*, печеночниках, ликоподиях, папоротниках [24].

АО найдена у многих видов дрожжей, включая *Rhodotorula glutinis* [25], *Candida lipolytica* (теперь *Yarrowia lipolytica*) [26, 27], *C. parapsilosis* [28–30], *C. albicans*, *C. krusei* [31], *Pichia anomala* (*Hansenula anomala*) [32], *P. pastoris* [16], *P. stipitis* [33], *Debaryomyces hansenii* [34, 35], патогенных для человека дрожжах *Cryptococcus neoformans* [36] и ряде других. Принимается, что АО свойственна всем видам дрожжей с ярко выраженным аэробным типом обмена,

неспособных поддерживать жизнеобеспечение только за счет гликолиза [см. 37]. Как правило, АО находят в тех видах дрожжей, у которых функционирует комплекс I дыхательной цепи. Исключение составляют, пожалуй, дрожжи *Debaryomyces* (ранее *Endomyces*) *magnusii*, у которых в норме АО отсутствует, а комплекс I функционирует на всех стадиях роста. АО при этом синтезируется при нарушениях основной цитохромной цепи переноса электронов [см. 38]. Не найдена АО в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и *Shizosaccharomyces pombe*, у которых отсутствует комплекс I дыхательной цепи [см. 37]. И это неудивительно, поскольку в противном случае имело бы место неконтролируемое разобщение митохондрий [39, 40]. Было высказано предположение, что в качестве альтернативы полноценной фосфорилирующей цитохромной дыхательной цепи дрожжи стали использовать либо аэробную ферментацию, либо дыхание с помощью АО. Обе стратегии позволяют дрожжам метаболически гибко реагировать на изменения условий роста и обеспечивать антиоксидантную защиту.

АО обнаружена в ряде грибов, включая *Ustilago ayclis* [41], *U. maydis* [42], *Tapesia acuformis* [43], *Aspergillus niger* [44], *A. fumigatus* [19], *Emericella nidulans* [45], *Ajellomyces capsulatus* [46], *Podospora anserina* [47, 48], *Magnaporthe grisea* [49], *Phycomyces blakesleeana* [50], осмофильный дрожжеподобный гриб *Moniliella tomentosa* [51].

АО найдена у ряда патогенов: в фитопатогенных грибах *Sclerotinia sclerotiorum* [см. 52 и ссылки в ней] и *Septoria tritici* [13], патогенном для насекомых грибе *Metarhizium anisopliae* [53], патогенных для человека дрожжах *C. neoformans* [36], термальном диморфном патогенном грибе человека *Paracoccidioides brasiliensis* [54], спорах относящегося к грибам внутриклеточного паразита *Antonospora* (*Paranosema*) *locustae* [55] с редуцированным метаболизмом, лишенных канонических митохондрий и цикла трикарбоновых кислот, но сохранивших транслоказу адениновых нуклеотидов для использования АТФ хозяина, в полубиотрофном грибе-патогене *Moniliophthora perniciosa*, вызывающем болезнь какао [56], и эндемическом патогене диморфном грибе *Histoplasma capsulatum* [57]. Патогены приобрели способность экспрессировать АО в клетках хозяина, при этом АО выполняет важную роль в их выживании, особенно, если клетки хозяина подвергаются действию разных факторов стресса [36].

АО присутствует и в митохондриях водорослей [46, 58–60], дрожофилы [61], простейших, включая *Acanthamoeba castellanii* [62, 63], *A. polyphaga*, слизевика *Dictyostelium discoideum* [62, 64, 65] и

в митохондриях ряда паразитарных патогенов, из которых наиболее хорошо изучена *T. brucei*, возбудитель африканской сонной болезни. Т.к. митохондрии кровяных клеток паразита лишены цитохром-оксидазы, ее АО является единственной терминальной оксидазой, что очень важно для выживания в организме хозяина [1], это создает хорошие предпосылки для борьбы с вызываемой *T. brucei* болезнью с помощью ингибиторов АО [1, 20, 66]. АО найдена и у других простейших-патогенов – возбудителя тропической малярии *Plasmodium falciparum* [67], у *Philasterides dicentrarchi*, вызывающего системную болезнь палтуса [68], а также у *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis hominis*, *T. congolense* и *T. evansi* [69].

Среди животных организмов АО или гены, кодирующие АО, были обнаружены у губок, пластинчатых, стрекающих, кольчатых червей *Arenicola marina*, *Nereis pelagica*, *Marenzelleria*, сепункулид *Sipunculus nudus*, устриц *C. gigas* и *C. virginica*, моллюсков *Mytilus californianus* Conrad, *M. mercenaria*, *M. galloprovincialis*, брюхоногих *A. californica*, *Ilyanassa obsoleta*, *Lottia gigantea* Sowerby и *Lymnaea stagnalis*, нематод (круглых червей), иглокожих, первичноротых и вторичноротых [см. 70], асцидии *Ciona intestinalis* [71].

Методами биоинформатики недавно было найдено более 25 видов животных, включая низшие хордовые (*Branchiostoma floridae*, *C. savignyi*, *Molgula tectiformis*), экспрессирующих АО [см. 70]. Полагают [см. 70], что отличительной особенностью АО животных является С-концевой мотив N–P–[YF]–X–P–G–[KQE], не характерный для АО представителей других царств.

Наконец, в α -протеобактерии *Novosphingobium aromaticivorans* был обнаружен гомолог АО эукариот [72]. Ген *N. aromaticivorans*, предположительно кодирующий бактериальную АО, был клонирован и экспрессирован в *Escherichia coli*. Уровень экспрессии зависел от концентрации кислорода и источника углерода в среде. АО протеобактерий особенно сходна с АО растущих на суше растений и красных водорослей [69].

В цианобактериях, а также в хлоропластах высших растений найдены гены пластидной терминальной оксидазы (ПТО), не очень близкого гомолога АО, окисляющего не убихинол, а пластохинол. ПТО при этом функционирует в фотосинтетической цепи переноса электронов. Оба белка содержат ди-железный кластер и 20 консервативных аминокислотных остатков, шесть из которых вовлечены в связывание железа [73]. Существование этих белков соответственно в митохондриях и пластидах позволяет предположить, что АО и ПТО имели общего бактериального предка, являющегося

ди-железным карбоксилатным белком, чьи функции, возможно, были связаны со связыванием и восстановлением молекулярного кислорода из среды, но затем в ходе эволюции они разделились. АО стала функционировать в бактериях гетеротрофного типа обмена, ПТО появилась в автотрофных бактериях, способных к оксигенному фотосинтезу. Белки эволюционировали отдельно, после чего АО посредством эндосимбиоза появилась в митохондриях, а ПТО тем же путем стала присутствовать в хлоропластах растений [1, 74].

Подробное рассмотрение бактериальных гомологов АО и ПТО выходит за рамки обзора, основным предметом которого являются митохондриальные АО. Мы привели эти данные только для того, чтобы показать, что АО распространены в природе гораздо шире, чем считалось 10 или даже 5 лет назад.

Наличие многочисленных последовательностей АО, найденных в эволюционно далеко отстоящих друг от друга организмах, может быть полезным при определении аминокислот или доменов, играющих важную роль в катализе, топографии в мембране и посттрансляционной регуляции, особенно, если такие данные сопровождаются структурными исследованиями.

Поскольку АО, как показано выше, широко распространена среди различных организмов, представляет интерес проследить распределение белка в разных таксонах и воспроизвести возможную эволюцию АО. Для этого нами, в рамках данной работы, методами биоинформатики были найдены первичные структуры АО у представителей разных таксономических групп и на основе множественного выравнивания найденных последовательностей построено филогенетическое дерево, воспроизводящее их возможную эволюцию (рис. 2).

Рис. 2. Филогенетическое древо АО, построенное на основании анализа первичных структур.

Поиск последовательностей производили с помощью программы BLAST [75] (алгоритм blastp, по базе данных кДНК), где в качестве входных данных была использована последовательность АО из *T. brucei* [76]. Выборка составлялась таким образом, чтобы в ней оказались последовательности АО как можно большего числа организмов, но если в одном организме присутствует несколько изоферментов АО, использовали только один, с наибольшим показателем идентичности АО из *T. brucei*. Множественное выравнивание последовательностей производили на сервере BLAST по алгоритму CLUSTALW2 [77]. Визуализация филогенетического дерева проводили с помощью сервиса iTOL [78].

Рис. 2 – см. сл. стр.

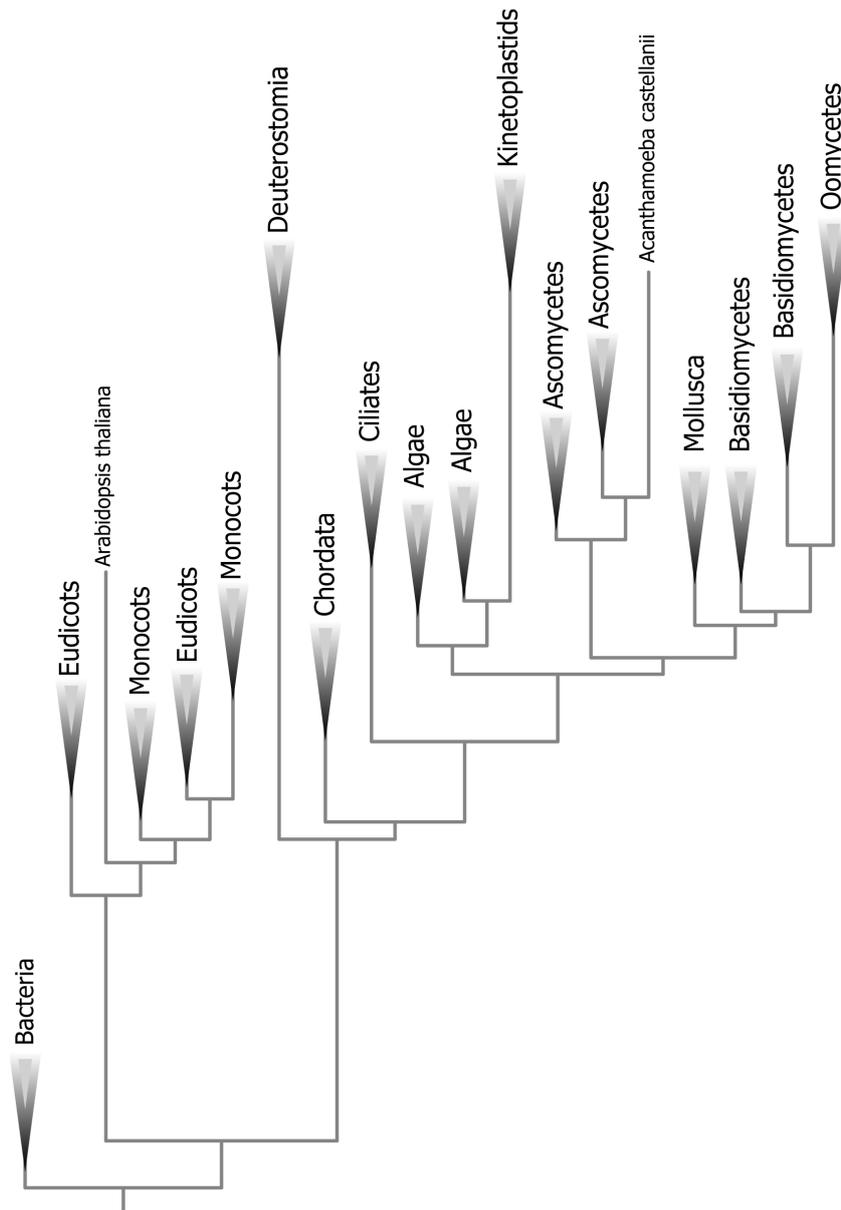


Рис. 2. Подпись к рис. дана на предыдущей стр.

IV. СВОЙСТВА АО

АО локализована во внутренней митохондриальной мембране, ее активность не ингибируется не только цианидом, но и азидом, СО, антимицином А и миксотиазолом. АО ответвляется от основной дыхательной цепи на уровне убихинона (см. рис. 1) и катализирует четырехэлектронное окисление восстановленного убихинона (убихинола) кислородом до воды независимо от основной дыхательной цепи [16, 79]. Как уже указывалось выше, перенос электронов через АО не сопряжен с синтезом АТФ и запасанием энергии, а энергия окисления убихинола кислородом выделяется в виде тепла [1, 2, 80]. Активность АО зависит от природы окисляемого субстрата, общей концентрации убихинона и его редокс-состояния в мембране, а также концентрации кислорода в клетке [81]. Характерной особенностью альтернативного пути является его эффективное ингибирование ароматическими гидроксамовыми кислотами с $K_i = 1,5$ мМ (типичный представитель – салицилгидроксамат). И хотя теперь ясно, что гидроксамовые кислоты не являются «ингибиторами одного фермента», до сих пор они остаются наиболее удобным и часто используемым инструментом при обнаружении цианидрезистентной оксидазы. Описаны и некоторые другие ингибиторы АО: 2,5-дибромо-3-метил-6-изопропил-*n*-бензохинон, дисульфiram, 5-децил-6-гидрокси-4,7-диоксобензотиазол, пропилгаллат и различные гидроксаминные кислоты [37], аскофуранон [20].

Данные о сродстве АО к кислороду противоречивы [см. 38]. Принимается, что критическая концентрация кислорода для альтернативного пути выше, хотя и ненамного, чем для основной дыхательной цепи [1, 2]. Интересно, что замена Thr-179 или Cys-172 в АО из *S. guttatum* приводила к двукратному увеличению сродства фермента к кислороду [82].

Очищенный рекомбинантный препарат АО *T. brucei*, полученный в результате экспрессии фермента в штамме *E. coli*, дефицитном по гему, взаимодействовал с убихинолом-1 в соответствии с классической кинетикой Михаэлис-Ментен ($K_m = 338$ мкМ и $V_{max} = 601$ мкмоль/мин/мг белка) [20].

V. ИНДУКЦИЯ АО

В ряде дрожжевых организмов аэробного типа обмена, включая *C. parapsilosis*, *Debaryomyces occidentalis* и *C. albicans*, активная АО присутствует на всех исследованных стадиях роста, а в дрожжах *D. hansenii* она не обнаруживается только на самых ранних стадиях роста [см. 37]. Напротив, в дрожжах *D. magnusii* (*E. magnusii*) [83], *P. pastoris* [16] и *P. angusta* (*Hansenula polymorpha*) [84], грибе *N. crassa* [85] 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, она значительно возрастает при ингибировании терминальной части основной дыхательной цепи в результате: а) выращивания организмов на средах, дефицитных по ионам железа, серы или меди; б) выращивания или инкубации покоящихся клеток в присутствии антимицина А, цианида или азида; в) выращивания или инкубации покоящихся клеток в присутствии ингибиторов митохондриальной транскрипции и трансляции; г) мутационных изменений ядерного или митохондриального генома; д) ингибирования системы окислительного фосфорилирования; е) снижения концентрации кислорода [см. 38]; ж) ингибирования функционирования цикла трикарбоновых кислот [86]. Такого рода изменения (выводы сделаны на основании увеличения количества транскрипта или белка АО, а также активации цианидрезистентного, чувствительного к действию гидроксаматов окислительного пути) показаны не только для дрожжей *D. magnusii* [83, 87], *C. albicans* [88, 89], *H. anomala* [90], *P. pastoris* [16] и грибов *N. crassa* [85, 91], *P. anserina* [92, 93], *M. grisea* [49], *A. niger* [94], *Phycomyces blakesleeianus* [50], *U. maydis* [42], гриба-патогена насекомых *M. anisopliae* [53], но и для *H. capsulatum* [57], растений [см. 95–97 и ссылки в них] и дрожофилы [71].

Появление цианид- и антимицин А-нечувствительного дыхания в митохондриях может быть связано и с изменением физиологического состояния ткани, органа или организма. Первый классический пример – это многократное, лавинообразное возрастание активности АО в термогенных тканях ароидных растений в течение нескольких дней [10, см. 98, 99 и ссылки в них], 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 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 [100]. У *Philasterides dicentrarchi*, вызывающего болезнь палтуса, в условиях нормоксии дыхание чувствительно к антимицину А, а в условиях гипоксии имеет место активация альтернативного цианид- и антимицину А-резистентного дыхательного пути [68]. В дрожжах *Y. lipolytica* (ранее *C. lipolytica* и *Schizosaccharomyces lipolytica*) и *P. membranifaciens*, выращенных на глюкозе, АО индуцируется при переходе культуры в стационарную фазу роста, при этом АО функционирует одновременно с цитохромной частью дыхательной цепи [37, 79, 101, 102]. В фитопатогене *U. maydis* активность АО зависит от стадии роста культуры, источника углерода и температуры [103]. В дрожжах *P. pastoris* активность АО монотонно возрастала по мере роста культуры, а затем резко снижалась при исчерпании глюкозы в среде выращивания [16]. В митохондриях гриба *Metarhizium anisopliae* наибольшая активность АО наблюдалась в начале и конце цикла развития, при прорастании воздушных конидий и при формировании погруженных конидий [53]. В диморфном грибе *P. brasiliensis*, вызывающем паракокцидиомикоз человека, экспрессия гена, кодирующего АО, существенно возрастала при прорастании конидий и образовании дрожжевой формы [104, 105]. У гембиотрофного гриба *M. perniciosus*, тропического патогена, вызывающего болезнь какао, колонизирующего вначале живые ткани хозяина (биотрофная фаза), а затем растущего на мертвом растении (некротическая фаза), наибольшее количество транскрипта АО имело место в биотрофной фазе [56]. В *Philasterides dicentrarchi* наибольшая активность АО имела место в стационарной фазе роста [68]. Старение срезов картофеля [106] и созревание плодов, как было показано, также сопровождается значительной активацией АО [107, 108].

В дрожжах *P. anomala* (*Hansenula anomala*) уровень экспрессии АО зависел от источника углерода. Он был низким на среде, содержащей глюкозу, но резко возрастал на средах с глицерином, лактатом или рафинозой [109]. Сходные данные были получены для дрожжей *C. albicans*, в которых уровень экспрессии одного из генов, кодирующих АО, увеличивался на среде с глицерином или этанолом [110].

У грибов и дрожжей активность АО или количество транскрипта АО существенно возрастало при мягком тепловом шоке [44, 101], а также в условиях окислительного [19, 44, 49, 89, 90, 105, 111] и осмотического [44] стрессов, хотя имеются и исключения – количество транскрипта АО в *P. anserine* снижалось под действием активных форм кислорода [112]. В грибе *Ph. blakesleeanus* активность АО

увеличивалась в условиях временной гипоксии или аноксии [50]. В грибах-патогенах активность АО резко возрастала при действии антигрибковых препаратов [см. 113 и ссылки в ней].

У растений уровень экспрессии АО зависит от доступности питательных веществ, таких как фосфат [114–116], нитрат или аммоний [117–119]. В зависимости от типа ткани, органа, фазы развития и метаболического статуса [см. 120–123 и ссылки в них], уровень экспрессии АО значительно возрастал в ответ на широкий диапазон условий стресса и неблагоприятных экологических условий, таких как изменение температуры и интенсивности света [122, 124–131], осмотический стресс [132–134], засуха [132, 135 и ссылки в ней], окислительный стресс [126, 136–138], атака несовместимыми штаммами бактериальных патогенов или фитопатогенов или их элиситорами [139–142, 143 и ссылки в ней, 144 и ссылки в ней], при обработке этиленом [145], NO [144 и ссылки в ней], добавлении салициловой кислоты [10, 124, 126, 146, 147], цитрата [124]. В *Arabidopsis*, ген *AOX1a* (один из генов, кодирующих АО) используется как модельный ген при изучении ответа на разные виды стресса [95, 148].

В ряде случаев прослежена взаимосвязь между действием некоторых факторов стресса и индукцией АО у растений. Так, засуха и осмотический стресс сопровождаются и окислительным стрессом. В фотосинтезирующих организмах хлоропласты трансформируют энергию света в восстановительные эквиваленты. Поскольку на фиксацию CO₂ используется только примерно 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. Этой цели служат 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 [см. 128 и ссылки в ней]. Элиситоры и токсины растительных патогенов увеличивают образование митохондриальных АФК [149]. 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, кодирующего АО или увеличивают количество белка растений [см. 150 и ссылки в ней]. Все эти соединения ингибируют цитохромный путь переноса электронов в дыхательной цепи. Недавние работы показали, что промотор гена *AOX1a* чувствителен к действию пероксида водорода [148]. Инфицирование патогенами приводит также к активации пентозофосфатного пути и NADP-зависимого малик-фермента, что, в свою очередь, приводит к увеличению пула NADPH и пирувата, являющегося, как будет показано ниже, активатором АО растений.

В других случаях взаимосвязь между действием фактора стресса и активацией АО еще предстоит выяснить. Но совершенно очевидно, что индукция АО увеличивает метаболическую пластичность клеток, которая может быть полезной в условиях меняющейся температуры, интенсивности освещения, доступности питательных веществ, а также действию биотических и абиотических факторов, ограничивающих активность основного цитохромного пути окисления.

VI. ГЕННЫЕ СТРУКТУРЫ, КОДИРУЮЩИЕ АО

АО имеет ядерное происхождение. Лучше всего генные структуры, кодирующие АО, изучены для растений. В их геномах АО представлена двумя разными подсемействами генов – AOX1 и AOX2 [122, 151]. Первые экспрессируются в однодольных и двудольных растениях, а второе семейство характерно только для двудольных [152]. Гены семейства AOX1 экспрессируются индуцибельно в ответ на некоторые виды стрессов, включая окислительный стресс, атаки паразитов, в то время как гены семейства AOX2 экспрессируются конститутивно или регулируются другими процессами [151, 153]. Считается, что именно с экспрессией генов семейства AOX1 связано участие АО в предотвращении АФК-индуцированного апоптоза [137]. Гены семейства AOX1 в растении *A. thaliana* являются классическим примером генов, активирующихся в ответ на подавление электронтранспортной цепи [15, 95, 120, 151, 154–156]. Это растение имеет в своем геноме 4 гена семейства AOX1 и только один ген семейства AOX2. В зависимости от уровня АФК в митохондриях экспрессируется одновременно разное число генов семейства AOX1 [95, 120, 151], причем экспрессия генов *Aox1a* и *Aox1d* в наибольшей степени усиливается в условиях стресса [127].

Vitis vinifera имеет в геноме 2 гена из семейства AOX1 (*Aox1a* и *Aox1b*), являющихся тканеспецифичными и индуцируемыми в ответ

на окислительный стресс. *Aox1a* экспрессируется только в корнях и листьях, тогда как ген *Aox1b* характерен для цветов. Также растение имеет 1 ген семейства АОХ2, экспрессирующийся конститутивно и во всех тканях [157].

Существуют и исключения, например, в геноме *Vigna unguiculata* (имеет в геноме гены *Aox1*, *Aox2a* и *Aox2b* [126, 158]), *Medicago sativa* и *Medicago truncatula* ген *Aox2b* из подсемейства АОХ2 является индуцибельным, его экспрессия увеличивается в ответ на окислительный стресс [158].

Морковь (*Daucus carota* L.) характеризуется уникальным набором генов АО [159]. Она имеет по 2 гена каждого семейства – *DcAOX1a*, *DcAOX1b*, *DcAOX2a* и *DcAOX2b*. Уровень экспрессии генов варьирует в зависимости от периода развития растения [160].

Методами биоинформатики показано, что гены семейства АОХ1 встречаются и среди низших растений, таких как зеленые и бурые водоросли [24].

Гены, кодирующие АО грибов, в отличие от растений, представлены менее разнообразно, причем обычно в организме существует ген АО только одного из двух подсемейств [1]. Сапрофитный гриб *A. fumigatus* имеет единственный ген АО *EFax*, насчитывающий 1172 пары нуклеотидов, кодирующий белок мол. массой около 40 кДа. Экспрессия гена активируется при добавлении в среду прооксидантов менадиона и параквата, что подтверждает участие АО в процессах антиоксидантной защиты.

N. crassa также имеет только один ген АО, экспрессия которого зависит от функционального состояния митохондрий [85].

В клетках дрожжей *P. anomala* АО кодируется единственным ядерным геном, в дрожжах *S. albicans* – двумя генами семейства АОХ1 [1, 37, 89], причем в этом организме ген *AOX1a* экспрессируется конститутивно, а ген *AOX1b* индуцируется в условиях стресса [110, 161].

Регуляция активности АО гриба *A. niger* в условиях повышенной продукции лимонной кислоты происходит посредством транскрипционной регуляции экспрессии гена *AOX1a* [44, 162].

Для патогенных грибов, например, *P. brasiliensis* и *H. capsulatum*, показана повышенная экспрессия АО, меняющаяся в зависимости от стадии жизненного цикла организма [104]. Пик активности АО из другого патогенного гриба *Metarhizium anisopliae* приходится на период спороношения [53], хотя АО экспрессируется интенсивно в течение всего жизненного цикла.

В настоящее время приходит понимание того, что нормой для дрожжей является наличие одной, а чаще нескольких изоформ АО, а отсутствие АО является скорее исключением, связанным с переходом к факультативному анаэробнозису [35, 163].

В трипаносомах гены АО заключены в большие полицистронные конструкции под единственным промотором. Вследствие этого регуляция уровня АО в организме происходит в основном транскрипционно, а также на уровне стабильности мРНК [1].

В геноме амёбы *A. castellanii* присутствует 2 копии гена АО длиной 1113 и 1125 пар нуклеотидов. Каждый из генов кодирует белок с молекулярной массой около 42 кДа и имеет на N-конце лидерную последовательность, определяющую митохондриальную локализацию [62]. Трансформация любым из этих генов *E. coli* приводит к появлению у бактерии цианидрезистентного дыхания, ингибируемого салицилгидроксаматом.

При изучении промоторов генов АО *A. thaliana* было показано, что промотор гена *AOX1a* состоит из 93 пар нуклеотидов, находящихся перед геном, многие из которых очень консервативны и необходимы для активации транскрипции факторами митохондриальной ретроградной регуляции в ответ на подавление электронтранспортной цепи антимицином А или цикла трикарбоновых кислот монофлуороацетатом [95]. Мутации в последовательности промотора приводили к частичному или полному ингибированию экспрессии гена *AOX1a* [95]. Для гриба *N. crassa* показано наличие индукционного мотива, состоящего из двух повторов CCG, разделенных участком в 7 пар нуклеотидов, характерного также для транскрипционных факторов, имеющих цинковые кластеры. Предполагается, что такой мотив характерен для всех генов, кодирующих грибные АО [164].

Как правило, гены АО имеют по 4 экзона, разделенных 3 геноспецифичными интронами [126], различающимися по длине, что может являться механизмом регуляции интенсивности экспрессии генов. Распространенная теория о том, что гены, экспрессирующиеся конститутивно и в большом количестве, имеют короткие интроны и их число мало, не оправдывается для растительной АО, где конститутивные гены *AOX2* имеют интрон, по длине составляющий более 60% гена (по имеющимся данным для организма *Vitis vinifera* до 62%), в то время как индуцибельные гены семейства *AOX1*, экспрессирующиеся в ответ на окислительный стресс, имеют интроны общей длиной не более 15% гена [157]. В процессе эволюции могла происходить потеря или наоборот, приобретение лишних интронов, поэтому у некоторых организмов встречаются гены, кодирующие АО, с 2 или 4 интронами [165].

АО, кодируемая ядерным геномом и синтезируемая на циторибосомах, должна транспортироваться в митохондрии, в ее внутреннюю мембрану – конечный пункт ее дислокации. Чтобы пересечь мембраны, белки должны быть в состоянии, компетентном для импорта, которое достигается взаимодействием с цитоплазматическими шаперонами в присутствии АТР. Чтобы попасть в митохондрии, они должны иметь специфический «адрес», определяющий их транспорт именно в митохондрии. Как правило, эти белки синтезируются в виде предшественников, имеющих большую молекулярную массу, чем зрелые (функционально-компетентные) белки. Несмотря на существенные различия в длине лидерной последовательности у разных митохондриально-направленных белков, все они лишены отрицательно заряженных аминокислот, обогащены положительно заряженными аминокислотными остатками, аланином, лейцином и серином и способны образовывать амфифильную α -спираль. Митохондриальные лидерные последовательности содержат N- и C-конец. Принимается, что N-конец отвечает за «узнавание» оргanelлы, а C-конец содержит информацию, необходимую для «правильного» отщепления лидерной последовательности [см. 166, 167]. Импорт белков во внутреннюю митохондриальную мембрану требует наличия рецепторов на поверхности митохондрий и специфических комплексов транслоказ ТОМ (транслоказы внешней митохондриальной мембраны) и ТИМ (транслоказы внутренней митохондриальной мембраны). Главной движущей силой для импорта большинства (есть исключения) белков внутренней митохондриальной мембраны является мембранный потенциал, генерируемый за счет энергии окисления субстратов компонентами дыхательной цепи. Внутри митохондрий белки-предшественники подвергаются процессингу, в результате которого они под действием специфических пептидаз превращаются в зрелые формы. Информация, необходимая для правильного узнавания места гидролиза лидерной последовательности, как правило, локализована внутри лидерной последовательности [см. 166, 167].

Информация о транспорте АО в митохондрии из разных организмов фрагментарна, мы приведем все имеющиеся сведения. Импорт АО из семян сои и корней сои зависит от мембранного потенциала и АТР и сопровождался процессингом синтезированных на циторибосомах 34- и 36 кДа-белков в зрелый белок с мол. массой 32 кДа. С помощью сайт-направленного мутагенеза найдено, что замена аргинина во втором положении на глутамин полностью подавляет процессинг предшественника [168]. Для импорта предшественника АО в мито-

хондрии шпината важен был не только общий положительный заряд лидерной последовательности, но и положение положительно заряженных аминокислот на С-конце лидерного пептида [166]. Экспрессия АО из *S. guttatum* в дрожжах *S. pombe* приводила к появлению в дрожжах цианидрезистентного дыхания, ингибируемого октил-галлатом. При этом белок в форме предшественника эффективно импортировался, подвергался процессингу с образованием зрелой формы. Эти данные указывают на сходство и взаимозаменяемость систем транслокации белков в растениях и дрожжах [169].

Для АО из патогенной формы *T. brucei*, в которой АО функционирует в качестве единственной терминальной оксидазы, было показано, что сигналы, определяющие ее импорт в митохондрии, находятся на N-конце и внутри молекулы (предположительно между 115-ым и 146 аминокислотными остатками [170]). В двух формах *T. brucei* импорт АО в митохондрии осуществлялся с помощью двух разных механизмов – в проциклической форме импорт АО зависел от мембранного потенциала, требовал внешних цитозольных факторов и АТФ, однако в форме, обитающей в кровотоке, он зависел от АТФ, но не мембранного потенциала [171].

VII. СТРУКТУРА АО

В ранних работах акцент был сделан, главным образом, на выявление мембранной локализации АО в митохондриях растений, причем изначально считалось, что она имеет 2 трансмембранные спирали и между ними имеется небольшой участок, находящийся в матриксе [172, 173]. Позднее выяснилось, что АО является полуинтегральным белком и располагается во внутренней мембране митохондрий таким образом, что активный центр ее локализован в матриксе [76, 174, 175]. Было установлено также, что в состав активного центра АО входит негемовое железо [176, 177], а каталитически активная АО еще контактирует с хинонами, кислородом и мембраной.

Секвенирование геномов хорошо изученных организмов позволило найти в составе АО консервативные остатки глутамата и гистидина [173], которые, как впоследствии выяснилось, составляли лиганды ди-железного активного центра, а сам белок стали относить к семейству ди-железных карбоксилатных белков [173, 174, 178–180]. Негемовые ди-железные ферменты являются разнообразным и повсеместно представленным семейством металлопротеинов, но все они вступают в реакцию с кислородом и большинство из них участвуют в окислительно-восстановительных реакциях [1, 37].

Они используют разные субстраты и подразделяются на разные подсемейства с разным набором каталитических функций, таких как окисление, гидроксирование, десатурация. Несмотря на разнообразные функции, большинство белков, относящихся к семейству, имеют сходные структурные элементы [174]. Они включают в себя 4-спиральный домен, координирующий карбоксилатными группами ди-железный активный центр. В дополнение к этому, домен выполняет функцию активации молекулярного кислорода [см. 1, 2, 22, 37]. Наличие в АО ди-железного кластера было доказано методом парамагнитного резонанса [179, 181]. Ди-железный активный центр АО оксидазы представлен двумя мотивами ExxH, где консервативные аминокислотные остатки гистидина и глутамата участвуют в координации двух атомов железа. Только один из атомов железа вовлечен в процесс связывания кислорода во время каталитического цикла [182].

Растительная АО существует в виде димера и регулируется посттрансляционно альфа-кетокислотами и сукцинатом. В отличие от растительной, грибная (и дрожжевая) АО является мономером, не регулируется альфа-кетокислотами и сукцинатом, но регулируется нуклеотид-моно- и дифосфатами (см. подробнее главу «Регуляция АО»).

В 2000 году Joseph-Horne и коллеги впервые смоделировали структуру ди-железного кластера грибной АО, а также установили, что необходимые для димеризации белка цистеиновые остатки, консервативные для растительных АО, в АО грибов отсутствуют [43].

Первая попытка кристаллизовать и исследовать структуру АО методом рентгеноструктурного анализа была предпринята в 2010 г. В качестве объекта был использован высокочищенный препарат АО из *T. brucei* [20]. В результате была получена структура с разрешением 2.9 Å и величиной R-фактора 9,5%. Было выяснено, что АО *T. brucei* является мономером, установлена структура ди-железного кластера, однако полностью смоделировать структуру АО не удалось.

Кроме ди-железного активного центра, восстанавливающего кислород до воды, АО любых организмов имеет сайт присоединения убихинона, восстанавливающего агента. На основе решенных структур убихинон-связывающих белков были найдены некоторые аминокислотные остатки, характерные для сайта связывания убихинона в АО [см. 183]. Состав и расположение кармана, в который попадает молекула убихинона, были определены путем точечных мутаций подходящих аминокислотных остатков. В результате было установлено, что мутации в остатках Gln-242, Tyr-253, Ser-256, His-261 или Arg-262 приводили к существенному снижению активности АО из

T. brucei, а замена Trp-206 на фенилаланин или тирозин полностью блокировала работу фермента [1].

В АО из *S. guttatum* молекула убихинона скоординирована гидрофобным окружением кармана, образованного аминокислотными остатками консервативных спиралей, погруженных в мембрану (Val-155, Arg-159, Arg-173, Leu-177, Val-180, Leu-267, Glu-270, Ala-271 и Ser-274). Положительно заряженные аминокислотные остатки аргинина и серина координируют положения атомов кислорода посредством электростатических взаимодействий [22]. Точечные мутации по этим аминокислотным остаткам сильно снижали как величину K_m по отношению к кислороду, так и максимальную активность АО. Таким образом, удалось установить, что молекула убихинона находится на расстоянии 4–5 Å от ди-железного центра, а его изопреноидный хвост может контактировать с мембраной [22].

Первая модель пространственной структуры АО (из *T. brucei*), решенная методом рентгеноструктурного анализа, была получена в 2013 г. [76]. Стали ясны и строение активных центров АО, и механизм ее ингибирования [22, 76]. Убихинон-связывающий центр *T. brucei* образует карман между утопленными в мембрану спиральями и сформирован следующими аминокислотными остатками: Arg-96, Asp-100, Arg-118, Leu-122, Glu-123, Ala-126, Asp-162, His-165, Leu-212, Asp-213, Asp-215, Ala-216, Thr-219 и Asp-266. При этом ароматическое кольцо молекулы убихинона находится на расстоянии 4,3 Å от ди-железного центра, что хорошо согласуется с данными, полученными при исследовании АО растений [76]. Точный механизм передачи электрона при восстановлении кислорода до воды остается неизвестным, однако считается, что в четырехэлектронном восстановлении кислорода до воды участвует убихинон и расположенный рядом остаток тирозина (для *T. brucei* это Tyr-220).

Структура АО дрожжей до сих пор не была установлена. Поэтому нами была проведена работа по поиску и построению трехмерной модели АО дрожжей *Y. lipolytica*. Геном *Y. lipolytica* секвенирован [40], и доступна библиотека кДНК этого организма. Однако геном аннотирован не полностью, кроме того, большая часть генов аннотировалась автоматически. Поэтому нам предстояло решить следующие задачи:

1. Поиск последовательности АО в геноме *Y. lipolytica* (UniProt ID – Q6C9M5_YARL1).
2. Определение вторичной структуры выбранного белка, поиск белков-гомологов с решенной пространственной структурой.

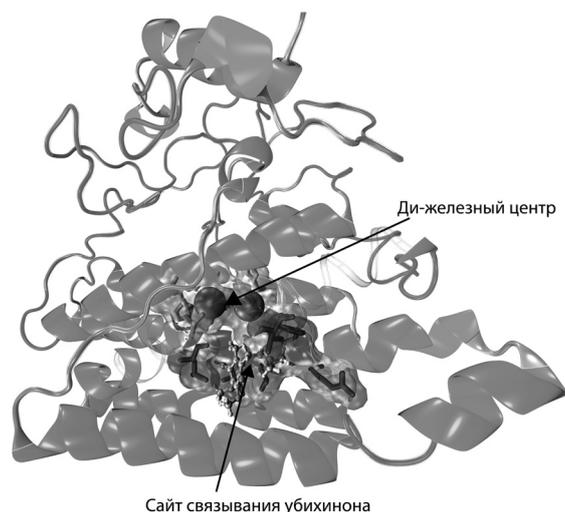


Рис. 3. Модель пространственной структуры АО дрожжей *Y. lipolytica*.

3. Моделирование АО дрожжей по гомологии и получение информации об активных центрах и особенностях строения белка.

В результате была получена модель пространственной структуры АО дрожжей *Y. lipolytica*, схематично изображенная на рис. 3.

По множественному выравниванию известных структур найдены номера и положения остатков активного ди-железного центра. В АО *Y. lipolytica* 6 аминокислотных остатков координируют 2 атома железа: 4 остатка глутаминовой кислоты: Glu-151, Glu-190, Glu-241, Glu-297; а также 2 остатка гистидина: His-193 и His-300. Эти аминокислотные остатки очень консервативны, тогда как остальные остатки, формирующие домен, более вариабельны, и судя по всему, участвуют в поддержании правильного расположения аминокислотных остатков активного центра. Атомы железа вставлены с помощью программы VMD [184].

Был проведен поиск необходимого для функционирования АО сайта связывания убихинона. Были идентифицированы аминокислотные остатки, координирующие молекулу убихинона: Arg-146, Phe-147, Leu-150, Ile-153, Leu-240, Thr-247, и участвующие в создании гидрофобного «кармана», в котором может располагаться молекула убихинона. Взаимное расположение молекулы убихинона и ди-

железного активного центра сходно с таковым в решенной структуре альтернативной оксидазы из организма *T. brucei* [76] и является удобным для процесса передачи электрона между активным центром и убихиноном. Следует отметить, что трехмерная модель АО дрожжей получена нами впервые.

VIII. БИОГЕНЕЗ АО

Изучение биогенеза альтернативного цианидрезистентного окислительного пути показало, что он включает две стадии. Первая, как полагают авторы, включает синтез белкового компонента на цитоплазматических рибосомах (процесс блокируется циклогексимидом, ингибитором цитоплазматического белкового синтеза). Эта стадия сравнительно медленная, зависит от температуры. Второй этап – быстрый, относительно независим от температуры, нечувствителен к действию циклогексимиды, требует присутствия ионов Fe (III) и заключается, вероятно, в активации белкового предшественника, синтезируемого на первой стадии, и встраивании железа [см. 38].

IX. РЕГУЛЯЦИЯ АО

Регуляция экспрессии генов АО является чрезвычайно сложным и пока, к сожалению, не очень хорошо изученным процессом. Поскольку АО функционирует в митохондриях, а ее гены закодированы в ядерном геноме, она является хорошим примером ретроградно регулируемого белка [85], однако точная природа ретроградных путей регуляции АОХ пока неизвестна. При изучении коэкспрессии гена АО и других различных факторов у *N. crassa* было получено 62 штамма с уменьшенной активностью АО при ее индукции. Среди факторов, влияющих на уровень АО, выявлены транскрипционные факторы, киназы, монотиолглутаредоксин, митохондриальный рецептор Tom70 (компонент транслоказ внешней митохондриальной мембраны) и др. [см. 85].

Известно, что АО регулируется с помощью двух механизмов: транскрипционного и посттрансляционного. Первый сводится к регуляции экспрессии генов АО и функциональности мРНК, ко второму относятся все механизмы изменения активности АО посредством изменения структуры, активности и свойств созревшего белка.

Для *A. thaliana* известен ряд прямых репрессоров и активаторов АО. Среди них АВА-нечувствительный транскрипционный фактор 4 (ABI4) [154], NAC (для NAM – Non Apical Meristem), ATAF1-2

(*Arabidopsis thaliana* Transcription Activation Factor1-2), CUC2 (Cup-Shaped Cotyledon2), ANAC013 (Arabidopsis NAC domain-containing protein13) [185] и ANAC017 (Arabidopsis NAC domain-containing protein17) (регуляторы *AOX1a2*) [186], транскрипционные факторы WRKY40 и WRKY63 (содержащие мотив Trp–Arg–Lys–Thr), соединяющиеся с промоторным регионом гена *Aox1a* с помощью специальных cis-элементов [187].

Показано, что в регуляции экспрессии АО растений посредством взаимодействия с промотором генов АО принимают участие белки транспорта ауксина гао3р, гао4р, гао5р и гаобр [188], экспрессия которых зависит от функционального состояния митохондрий, а значит, данный вид регуляции можно считать реципроктым ответом на условия стресса.

Для грибов известно несколько генов, ответственных за регуляцию экспрессии АО. В регуляции транскрипции АО *S. albicans* участвует гистидинкиназа [110]. В ранних работах в геноме гриба *N. crassa* был выявлен ген *aod-2*, отвечающий за уровень активности АО (сам ген, кодирующий АО, тогда назывался *aod-1*) [9, 189]. Позднее выяснилось, что в регуляции экспрессии генов АО *N. crassa* и многих других грибов участвует до 5 различных транскрипционных факторов, имеющих и другие функции [164, 190]. Гены были условно названы *aod-4*, *aod-5*, *aod-6* и *aod-7*, и нокаут любого из них приводил к снижению экспрессии АО. Наиболее значительный эффект наблюдался при нокауте генов *aod-2* и *aod-5* [164, 191]. Это транскрипционные факторы, имеющие в своем составе 2 цинковых кластера [192]. Ортологи *aod-2* и *aod-5* найдены во многих организмах, в том числе в *P. anserine* [193], *A. nidulans* [194].

Экспрессия генов АО грибов и растений может зависеть от уровня сАМР и ионов кальция в клетке. Добавление цианида в культуру дрожжей аэробного типа обмена *Y. lipolytica* приводило к двукратному увеличению количества АДФ и пятикратному увеличению количества АМР в клетке, что вызывало активацию цианидрезистентного дыхания [27, 195, 196].

Посттрансляционно активность АО регулируется посредством доступности субстрата – концентрацией убихинона, уровнем его восстановленности и концентрацией кислорода в клетке [81]. Это характерно для целого ряда растений [см. 1], и не только [197].

У высших растений, где АО существует в виде димеров, связанных двумя цистеиновыми «мостиками» в сайтах CysI и CysII, регуляция активности белка происходит посредством изменения типа связи между мономерами. Нековалентно связанные между собой молекулы

АО активны, в то время как образование ковалентных связей между регуляторными цистеиновыми остатками вследствие их окисления [198]) приводит к инактивации фермента [199].

Активный белок (в восстановленной форме) растений может регулироваться α -кетокислотами [200]. Это сложный процесс, зависящий от конкретного активатора, а также от мест расположения остатков цистеина. Стимуляции пируватом не происходит в изоферментах, в которых CysI заменен серином, вместо этого активность АО стимулируется сукцинатом [1, 201]. У термогенного растения *A. maculatum* найдена разновидность АО, не подверженная регуляции с помощью пирувата [99, 202]. Объясняется это тем, что растительные АО имеют консервативный участок – ENV-элемент. Ген *AmAOX1e*, конститутивно экспрессируемый в некоторых тканях *A. maculatum* [99] кодирующий одну из АО, вместо регуляторного ENV-элемента имеется так называемый QNT-элемент, характерный скорее для представителей других царств. Кроме того показано, что *A. maculatum* имеет также изоформу АО, активируемую пируватом, но нечувствительную к сукцинату. Пируват приводит АО в функционально активное состояние вне зависимости от уровня восстановленности убихинона [202].

Что касается грибов и дрожжей, ситуация в корне иная. Дрожжевая АО существует в виде мономеров и не обладает цистеиновыми регуляторными остатками (подробнее см. в главе «Структура АО»), и, таким образом, не может регулироваться α -кетокислотами [1, 172], однако активируется присоединением пуриновых моно- и дифосфатов AMP, ADP, dAMP и GMP [27, 31, 32, 41–44, 172]. АО из гриба *U. maydis* может активироваться как добавлением GMP, так и пирувата при его выращивании на сукцинате [42].

Для паразитического простейшего *A. castellanii* показано, что в отличие от других нуклеотидов, АТФ оказывает ингибирующее действие на АО, причем АТФ конкурентно связывается с белком в месте присоединения GMP. Таким образом, регуляция активности АО происходит за счет соотношения количеств пуриновых нуклеотидов в клетке [62–64]. Такой же механизм регуляции наблюдается у другого простейшего *D. discoideum* [62, 64] и дрожжей *C. maltosa* [62, 64], *Y. lipolytica* [27] и *C. parapsilosis* [29]. Однако, механизм взаимодействия малых молекул с белком АО изучен довольно слабо.

Интересно, что воздействие АФК на гриб *P. anserina* уменьшало количество мРНК и, соответственно, активность АО [112], что является исключением из общей картины, где индукция АО выступает в качестве универсального ответа на окислительный стресс.

Х. ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ АО

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 – 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 [см. 1, 99 и ссылки в них].

Понятна роль АО и при ингибировании терминальных компонентов основной дыхательной цепи или утрате способности синтезировать эти компоненты (см. главу «Индукция АО»). Функционирование альтернативного пути в этих условиях обеспечивает возможность реокисления цитоплазматического NADH и, следовательно, возможность выживания. Кроме того, при этом поддерживается фосфорилирующая активность за счёт 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 [100]. 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 [203].

Ясна также фундаментальная функция АО в уменьшении или предотвращении окислительного стресса. Снижение степени восстановленности коэнзима Q, донора восстановительных эквивалентов для АО, снижает образование супероксид-анионрадикала и, в конечном счете, пероксида водорода, наиболее устойчивой активной формы кислорода. Такие данные получены для дрожжей *Y. lipolytica* [27, 79], *C. krusei* [80], *C. neoformans* [36], *P. pastoris* [16, 153], грибов *U. maydis* [42], *S. sclerotiorum* [204], *P. anserina* [48], *M. grisea* [205], *H. capsulatum* [53], водорослей *E. gracilis* [153], растений *A. thaliana*

[206], *N. tabacum* [131, 141, 207], *O. sativa* [208]. Показано также, что повышенная экспрессия АО уменьшает продукцию активных форм азота [209]. Благодаря своему участию в подавлении окислительного стресса АО может снижать порог, вызывающий гибель клеток [153]. Сверхэкспрессия гена *AtAox1a* в *A. thaliana* превращала индуцированную алюминием клеточную смерть посредством уменьшения уровня АФК на начальной стадии [210].

В этой связи понятна и функция АО в ответе на световой стресс [125]. 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 [125, 206]. При ингибировании АО на свету в хлоропластах происходило быстрое накопление NADPH и, как следствие, сверхвосстановление акцепторной части фотосистемы I. Таким образом, АО в растениях, окисляя восстановительные эквиваленты, обеспечивает защиту от светового стресса [141, 207] и предотвращает деструкцию фотосинтетического аппарата.

Помимо уже вышеперечисленных 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. Принимается, что индукция АО увеличивает метаболическую пластичность клеток, которая может быть полезной для быстрой адаптации к меняющимся источникам питания, биотическим и абиотическим факторам стресса [1, 211–213]. При этом функции АО могут быть не взаимоисключающими, а дополняющими друг друга [см. 2, 153]. Более того, в последнее время АО рассматривается как маркер условий стресса и кандидат для клеточной репрограммирования в этих условиях [1, 211, 212].

В условиях солевого стресса у *A. thaliana* происходило увеличение уровня внутриклеточного Na^+ и продукции АФК. При этом наблюдалось резкое увеличение экспрессии гена *AtAox1a* [133]. Высокая активность АО в корнях и поросли растения помогает *A. thaliana* расти в среде, насыщенной NaCl и поддерживать низкий уровень внутриклеточного Na^+ [133]. Участие АО в ответе на солевой стресс показано также для *M. truncatula* [214], а для водоросли *Ch. reinhardtii*, выращенной на среде, насыщенной нитратом, показано участие АО в процессах нитрат- и нитритредукции [60].

Растения *N. tabacum*, лишенные АО, имели в листьях повышенный уровень H_2O_2 и O_2^- [215–217]. Кроме того, мутанты *N. tabacum*,

не имеющие АО, хуже переносят 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 [141, 218]. Таким образом, АО в растениях может быть универсальным механизмом ответа на окислительный стресс [219] и условия стресса в целом [141].

В патогенных грибах *A. fumigatus* [220] и *H. capsulatum* АО участвует в защите организма при стрессах и обеспечивает выживание в условиях существования внутри хозяина [57]. АО задействована в процессах регуляции роста, развития и ответа на окислительный стресс у патогенного гриба *S. sclerotiorum* [204].

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 [36]. Похожие данные получены и для патогенного гриба *P. brasiliensis* [54], вызывающего у человека паракокцидиомикозы. Одним из важнейших этапов развития *P. brasiliensis* является переход гриба из мицелиальной формы в дрожжевую. Этот переход замедляется 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 [105].

АО может участвовать в процессах антивирусной защиты. Это показано для томата и петунии [221].

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 развивать 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 [159].

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 [222–225]. Экспрессия сопровождалась устранением накопления молочной кислоты и избыточного накопления АФК [222, 223], двух наиболее часто проявляемых симптомов повреждения системы окислительного фосфорилирования, а также предотвращала ингибирование роста и повышенную чувствительность к прооксидантам в линиях, дефицитных по цитохромоксидазе [224]. Коэкспрессия NADH-дегидрогеназы (Ndi1) *S. cerevisiae* и АО *Emericella nidulans* полностью восстанавливала NADH DH/CoQ – редуктазную CoQ-оксидазную активности в мышцах, лишенных митохондриальной ДНК и, следовательно, нежизнеспособных [45]. Экспрессия АО из *C. intestinalis* в *D. melanogaster* полностью или в значительной степени предотвращала смертность, вызванную токсинами или глобальным или частичным ткане-специфичным нокаутом субъединиц COX CoVb и cIV цитохромоксидазы дыхательной цепи [71], а также дефицитом фактора Surf1, ответственного за сборку цитохромоксидазы [226]. Она также предотвращала локомоторный дефект и избыточную продукцию АФК в дрозофилах с мутированным геном *dj-1beta*, гомологом гена *DJI* человека, задействованным в болезни Паркинсона [226] и восстанавливала дофамин-зависимую нейрорегуляцию [61]. 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 [227].

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 [228] 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Albury, M.S., Elliott, C., and Moore, A.L. (2009) Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants, *Physiologia plantarum*, **137**, 316–327.
2. Vanlerberghe, G.C., Cvetkovska, M., and Wang, J. (2009) Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiologia plantarum*, **137**, 392–406.
3. Lloyd, D., and Edwards, S.W. (1978) Electron transport pathways alternative to the main phosphorylating respiratory chain. In: Functions of alternative terminal oxidases (eds. Degn H, Lloyd D., Hill G.C.), *Pergamon Press*, pp. 1–10.
4. Schonbaum, G.R., Bonner, W.D.Jr., Storey, B.T., and Bahr, J.T. (1971) Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids, *Plant Physiology*, **47**, 124–128.
5. Huq, S., and Palmer, J.M. (1978) Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria, *FEBS Letters*, **95**, 217–220.
6. Elthon, T.E., and McIntosh, L. (1986) Characterization and Solubilization of the Alternative Oxidase of *Saurum guttatum* mitochondria, *Plant physiology*, **82**, 1–6.
7. Elthon, T.E., and McIntosh, L. (1987) Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 8399–8403.
8. Elthon, T.E., Nickels, R.L., and McIntosh, L. (1989) Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria, *Plant physiology*, **89**, 1311–1317.
9. Lambowitz, A.M., Sabourin, J.R., Bertrand, H., Nickels, R., and McIntosh, L. (1989) Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria, *Molecular and cellular biology*, **9**, 1362–1364.
10. Rhoads, D.M., and McIntosh, L. (1992) Salicylic Acid Regulation of Respiration in Higher Plants: Alternative Oxidase Expression, *Plant Cell*, **4**, 1131–1139.
11. Eriksson, M., Gardestrom, P., and Samuelsson, G. (1995) Isolation, Purification, and Characterization of Mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant physiology*, **107**, 479–483.
12. Chaudhuri, M., Ajayi, W., Temple, S., and Hill, G.C. (1995) Identification and partial purification of a stage-specific 33 kDa mitochondrial protein as the alternative oxidase of the *Trypanosoma brucei brucei* bloodstream trypomastigotes, *The Journal of eukaryotic microbiology*, **42**, 467–472.
13. Affourtit, C., and Moore, A.L. (2004) Purification of the plant alternative oxidase from *Arum maculatum*: measurement, stability and metal requirement, *Biochimica et biophysica acta*, **1608**, 181–189.
14. Whelan, J., McIntosh, L., and Day, D.A. (1993) Sequencing of a soybean alternative oxidase cDNA clone, *Plant physiology*, **103**, 1481.
15. Vanlerberghe, G.C., and McIntosh, L. (1994) Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression. Studies with the alternative oxidase gene of tobacco, *Plant physiology*, **105**, 867–874.
16. Kern, A., Hartner, F.S., Freigassner, M., Spielhofer, J., Rumpf, C., Leitner, L., Fröhlich, K.U., and Glieder, A. (2007) *Pichia pastoris* «just in time» alternative respiration, *Microbiology*, **153**, 1250–1260.

17. 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.
18. Nihei, C., Fukai, Y., Kawai, K., Osanai, A., Yabu, Y., Suzuki, T., Ohta, N., Minagawa, N., Nagai, K., and Kita, K. (2003) Purification of active recombinant trypanosome alternative oxidase, *FEBS Letters*, **538**, 35–40.
19. 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 Microbiology Letters*, **271**, 230–238.
20. Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki, T., Yabu Y., Saimoto, H., Yamakura, F., Ohmori, D., Moore, A., Harada, S., and Kita, K. (2010) Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*, *Biochimica et biophysica acta*, **1797**, 443–450.
21. Elliott, C., Young, L., May, B., Shearman, J., Albury, M.S., Kido, Y., Kita, K., and Moore, A.L. (2014) Purification and characterization of recombinant DNA encoding the alternative oxidase from *Sauromatum guttatum*, *Mitochondrion*, S1567–7249(14)00028-2.
22. Young, L., May, B., Pendlebury-Watt, A., Shearman, J., Elliott, C., Albury, M.S., Shiba, T., Inaoka, D.K., Harada, S., Kita, K., and Moore, A.L. (2014) Probing the ubiquinol-binding site of recombinant *Sauromatum guttatum* alternative oxidase expressed in *E. coli* membranes through site-directed mutagenesis, *Biochimica et biophysica acta*, **1837**, 1219–1225.
23. McDonald, A.E. (2009) Alternative oxidase: what information can protein sequence comparisons give us? *Physiologia Plantarum*, **137**, 328–341.
24. Neimanis, K., Staples, J.F., Hüner, N.P., and McDonald, A.E. (2013) Identification, expression, and taxonomic distribution of alternative oxidases in non-angiosperm plants, *Gene*, **526**, 275–286.
25. Matsunaka, S., Morita, S., and Conti, S.F. (1966) Respiratory system of *Rhodotorula glutinis*. I. Inhibitor tolerance and cytochrome components, *Plant physiology*, **41**, 1364–1369.
26. Nyns, E.J., and Hamaide-Deplus, M.C. (1972) Cyanide-insensitive respiration of *Candida lipolytica*, *Archives internationales de physiologie et de biochimie*, **80**, 978–980.
27. Medentsev, A.G., Arinbasarova, A.Y., and Akimenko, V.K. (2004) Reactivation of the alternative oxidase of *Yarrowia lipolytica* by nucleoside monophosphates, *FEMS yeast research*, **5**, 231–236.
28. Guérin, M., and Camougrand, N. (1986) The alternative oxidase of *Candida parapsilosis*, *European journal of biochemistry / FEBS*, **159**, 519–524.
29. Milani, G., Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C.M., Schreiber, A.Z., Vercesi, A.E., and Sluse, F.E. (2001) Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways, *FEBS letters*, **508**, 231–235.
30. Ruy, F., Vercesi, A.E., and Kowaltowski, A.J. (2006) Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation, *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **38**, 129–135.

31. Costa-de-Oliveira, S., Sampaio-Marques, B., Barbosa, M., Ricardo, E., Pina-Vaz, C., Ludovico, P., and Rodrigues, A.G. (2012) An alternative respiratory pathway on *Candida krusei*: implications on susceptibility profile and oxidative stress, *FEMS yeast research*, **12**, 423–429.
32. Sakajo, S., Minagawa, N., and Yoshimoto, A. (1997) Effects of nucleotides on cyanide-resistant respiratory activity in mitochondria isolated from antimycin A-treated yeast *Hansenula anomala*, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **61**, 396–399.
33. Shi, N.Q., Cruz, J., Sherman, F., and Jeffries, T.W. (2002) SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipites*, *Yeast*, **19**, 1203–1220.
34. Cabrera-Orefice, A., Guerrero-Castillo, S., Luévano-Martínez, L.A., Peña, A., and Uribe-Carvajal, S. (2010) Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?), *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **42**, 11–19.
35. Cabrera-Orefice, A., Chiquete-Félix, N., Espinasa-Jaramillo, J., Rosas-Lemus M., Guerrero-Castillo, S., Peña, A., and Uribe-Carvajal, S. (2014) The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: components and supramolecular organization, *Biochimica et biophysica acta*, **1837**, 73–84.
36. Akhter, S., McDade, H.C., Gorchach, J.M., Heinrich, G., Cox, G.M., and Perfect, J.R. (2003) Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*, *Infection and immunity*, **71**, 5794–5802.
37. Veiga, A., Arrabaça, J.D., and Loureiro-Dias, M.C. (2003) Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts, *FEMS yeast research*, **3**, 239–245.
38. Звягильская Р.А. и Котельникова А.В. (1991) Структура и функциональная активность дрожжевых митохондрий (монография). М.: ВИНТИ, сер. Биол. Хим., Т. 36, 172 сс.
39. Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W., and Wood, P.M. (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components, *Biochimica et biophysica acta*, **1504**, 179–195.
40. Kerscher, S., Durstewitz, G., Casaregola, S., Gaillardin, C., and Brandt, U. (2001) The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*, *Comparative and functional genomics*, **2**, 80–90.
41. Juarez, O., Guerra, G., Martínez, F., and Pardo, J.P. (2004) The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*, *Biochimica et biophysica acta*, **1658**, 244–251.
42. Sierra-Campos, E., Velázquez, 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.
43. Joseph-Horne, T., Babij, J., Wood, P.M., Hollomon, D., and Sessions, R.B. (2000) New sequence data enable modelling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by pyruvate, *FEBS Letters*, **481**, 141–146.
44. 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*, *Journal of bioscience and bioengineering*, **113**, 338–342.
45. Perales-Clemente, E., Bayona-Bafaluy, M.P., Pérez-Martos, A., Barrientos, A., Fernández-Silva, P., and Enriquez, J.A. (2008) Restoration of electron transport without proton

- pumping in mammalian mitochondria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 18735–18739.
46. Dinant, M., Baurain, D., Coosemans, N., Joris, B., and Matagne, R.F. (2001) Characterization of two genes encoding the mitochondrial alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Current genetics*, **39**, 101–108.
 47. El-Khoury, R., and Sainsard-Chanet, A. (2010) Deletion of the mitochondrial NADH kinase increases mitochondrial DNA stability and life span in the filamentous fungus *Podospora anserina*, *Experimental gerontology*, **45**, 543–549.
 48. 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 *Podospora anserina*, *PLoS One*, **6**, e16620.
 49. 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, *Biochimica et biophysica acta*, **1442**, 161–169.
 50. Stanić, M., Zakrzewska, J., Hadžibrahimović, M., Zizić, M., Marković, Z., Vučinić, Z., and Živić, M. (2013) Oxygen regulation of alternative respiration in fungus *Phycomyces blakesleeanus*: connection with phosphate metabolism, *Research in microbiology*, **164**, 770–778.
 51. Vanderleyden, J., Kurth, J., and Verachtert, H. (1979) Characterization of cyanide-insensitive respiration in mitochondria and submitochondrial particles of *Moniliella tomentosa*, *The Biochemical journal*, **182**, 437–443.
 52. Xu, T., Wang, Y.T., Liang, W.S., Yao, F., Li, Y.H., Li, D.R., Wang, H., and Wang, Z.Y. (2013) Involvement of alternative oxidase in the regulation of sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to the fungicides azoxystrobin and procymidone, *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, **51**, 352–358.
 53. Uribe, D., and Khachatourians, G.G. (2008) Identification and characterization of an alternative oxidase in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, *Canadian journal of microbiology*, **54**, 119–127.
 54. 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 neglected tropical diseases*, **5**, e1353.
 55. Dolgikh, V.V., Senderskiy, I.V., Pavlova, O.A., Naumov, A.M., and Beznoussenko, G.V. (2011) Immunolocalization of an alternative respiratory chain in *Antonospora (Paranosema) locustae* spores: mitochondria retain their role in microsporidial energy metabolism, *Eukaryotic cell*, **10**, 588–593.
 56. 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 *Monilophthora pernicioso* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development, *The New phytologist*, **194**, 1025–1034.
 57. 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.
 58. Sharpless, T.K., and Butow, R.A. (1970) An inducible alternate terminal oxidase in *Euglena gracilis* mitochondria, *The Journal of biological chemistry*, **245**, 58–70.

59. Mathy, G., Cardol, P., Dinant, M., Blomme, A., Gérin, S., Cloes, M., Ghysels, B., DePauw, E., Leprince, P., Remacle, C., Sluse-Goffart, C., Franck, F., Matagne, R.F., and Sluse, F.E. (2010) Proteomic and functional characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant lacking the mitochondrial alternative oxidase 1, *Journal of proteome research*, **9**, 2825–2838.
60. Gérin, 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, *Biochimica et biophysica acta*, **1797**, 994–1003.
61. 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 molecular genetics*, **21**, 2698–2712.
62. Henriquez, F.L., McBride, J., Campbell, S.J., Ramos, T., Ingram, P.R., Roberts, F., Tinney, S., and Roberts, C.W. (2009) *Acanthamoeba* alternative oxidase genes: identification, characterization and potential as antimicrobial targets, *International journal for parasitology*, **39**, 1417–1424.
63. Antos-Krzeminska, N., and Jarmuszkiewicz, W. (2014) Functional expression of the *Acanthamoeba castellanii* alternative oxidase in *Escherichia coli*; regulation of the activity and evidence for *AcAox* gene function, *Biochemistry and cell biology*, **92**, 235–241.
64. Woyda-Ploszczyca, A.M., Sluse, F.E., and Jarmuszkiewicz, W. (2009) Regulation of *Acanthamoeba castellanii* alternative oxidase activity by mutual exclusion of purine nucleotides; ATP's inhibitory effect, *Biochimica et biophysica acta*, **1787**, 264–271.
65. Kimura, K., Kuwayama, H., Amagai, A., and Maeda, Y. (2010) Developmental significance of cyanide-resistant respiration under stressed conditions: experiments in *Dictyostelium* cells, *Development, growth & differentiation*, **52**, 645–656.
66. Chaudhuri, M., Ott, R.D., and Hill, G.C. (2006) Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function, *Trends in parasitology*, **22**, 484–491.
67. Murphy, A.D., and Lang-Unnasch, N. (1999) Alternative oxidase inhibitors potentiate the activity of atovaquone against *Plasmodium falciparum*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **43**, 651–654.
68. Mallo, N., Lamas, J., and Leiro, J.M. (2013) Evidence of an alternative oxidase pathway for mitochondrial respiration in the scuticociliate *Philasterides dicentrarchi*, *Protist*, **164**, 824–836.
69. Suzuki, T., Hashimoto, T., Yabu, Y., Majiwa, P.A., Ohshima, S., Suzuki, M., Lu, S., Hato, M., Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Kita, K., and Ohta, N. (2005) Alternative oxidase (AOX) genes of African trypanosomes: phylogeny and evolution of AOX and plastid terminal oxidase families, *The Journal of eukaryotic microbiology*, **52**, 374–381.
70. McDonald, A.E., Vanlerberghe, G.C., and Staples, J.F. (2009) Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution, *The Journal of experimental biology*, **212**, 2627–2634.
71. Kemppainen, K.K., Rinne, J., Srinam, A., Lakanmaa, M., Zeb, A., Tuomela, T., Popplestone, A., Singh, S., Sanz, A., Rustin, P., Jacobs, H.T. (2014) Expression of alternative oxidase in *Drosophila* ameliorates

- diverse phenotypes due to cytochrome oxidase deficiency, *Human molecular genetics*, **23**, 2078–2093.
72. Stenmark, P., and Nordlund, P. (2003) A prokaryotic alternative oxidase present in the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*, *FEBS Letters*, **552**, 189–192.
73. Fu, A., Aluru, M., and Rodermel, S.R. (2009) Conserved active site sequences in *Arabidopsis* plastid terminal oxidase (PTOX): in vitro and in planta mutagenesis studies, *The Journal of biological chemistry*, **284**, 22625–25632.
74. McDonald, A.E., and Vanlerberghe, G.C. (2006) Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase, *Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & proteomics*, **1**, 357–364.
75. Madden, T.L., Tatusov, R.L., and Zhang, J. (1996) Applications of network BLAST server, *Methods in enzymology*, **266**, 131–141.
76. Shiba, T., Kido, Y., Sakamoto, K., Inaoka, D.K., Tsuge, C., Tatsumi, R., Takahashi, G., Balogun, E.O., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Saimoto, H., Moore, A.L., Harada, S., and Kita, K. (2013) Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 4580–4585.
77. McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., and Lopez, R. (2013) Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI, *Nucleic acids research*, **41**, 597–600.
78. Letunic I., and Bork P. (2006) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation, *Bioinformatics*, **23**, 127–128.
79. 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 research*, **2**, 519–524.
80. Juszczuk, I.M., and Rychter, A.M. (2003) Alternative oxidase in higher plants, *Acta biochimica Polonica*, **50**, 1257–1271.
81. Sluse, F.E., and Jarmuszkiewicz, W. (1998) Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role, *Brazilian journal of medical and biological research*, **31**, 733–747.
82. Crichton, P.G., Albury, M.S., Af-fourtit, C., and Moore, A.L. (2010) Mutagenesis of the *Sauromatum guttatum* alternative oxidase reveals features important for oxygen binding and catalysis, *Biochimica et biophysica acta*, **1797**, 732–737.
83. Звягильская Р.А., Коростелева Н.Л. и Котельникова А.В. (1977) Изучение дыхательной системы *Endomycetes magnusii*. Свойства митохондрий, выращенных в присутствии антимицина А, *Биохимия*, **42**, 1888–1895.
84. Veiga, A., Arrabaca, J.D., and Loureiro-Dias, M.C. (2000) Cyanide-resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation, *FEMS microbiology letters*, **190**, 93–97.
85. Nargang, F.E., Adames, K., Rüb, C., Cheung, S., Easton, N., Nargang, C.E., and Chae, M.S. (2012) Identification of genes required for alternative oxidase production in the *Neurospora crassa* gene knockout library, *G3 (Bethesda, Md.)*, **2**, 1345–1356.
86. Gupta, K.J., Shah, J.K., Brotman, Y., Jahnke, K., Willmitzer, L., Kaiser, W.M., Bauwe, H., and Igamberdiev,

- A.U. (2012) Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids, *Journal of experimental botany*, **63**, 1773–1784.
87. 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 (ed. by H. Degn et al), Pergamon Press, Oxford, New-York, pp. 179–185.
88. Helmerhorst, E.J., Stan, M., Murphy, M.P., Sherman, F., and Oppenheim, F.G. (2005) The concomitant expression and availability of conventional and alternative, cyanide-insensitive, respiratory pathways in *Candida albicans*, *Mitochondrion*, **5**, 200–211.
89. 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, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **64**, 764–773.
90. 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 Letters*, **302**, 217–219.
91. Tanton, L.L., Nargang, C.E., Kessler, K.E., Li, Q., and Nargang, F.E. (2003) Alternative oxidase expression in *Neurospora crassa*, *Fungal genetics and biology*, **39**, 176–190.
92. Osiewacz, H.D., and Stumpf, S.W. (2001) Metabolism and aging in the filamentous fungus *Podospira anserina*, *Archives of gerontology and geriatrics*, **32**, 185–197.
93. Stumpf, S.W., Stephan, O., and Osiewacz, H.D. (2004) Impact of a disruption of a pathway delivering copper to mitochondria on *Podospira anserina* metabolism and life span, *Eukaryotic cell*, **3**, 200–211.
94. Kirimura, K., Matsui, T., Sugano, S., and Usami, S. (1996) Enhancement and repression of cyanide-insensitive respiration in *Aspergillus niger*, *FEMS microbiology letters*, **141**, 251–254.
95. Dojcinovic, D., Krosting, J., Harris, A.J., Wagner, D.J., and Rhoads, D.M. (2005) Identification of a region of the *Arabidopsis AtAOX1a* promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression, *Plant molecular biology*, **58**, 159–175.
96. Strodtkötter, 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, *Molecular plant*, **2**, 284–297.
97. Zubo, Y.O., Potapova, T.V., Tarasenko, V.I., Börner, T., and Konstantinov, Y.M. (2014) The rate of transcription in Arabidopsis chloroplasts depends on activity of alternative electron transfer pathway in mitochondria, *Doklady. Biochemistry and biophysics*, **455**, 76–79.
98. 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, *Journal of integrative plant biology*, **53**, 7–13.
99. 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 physiology*, **157**, 1721–1732.

100. 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*, *Molecular and biochemical parasitology*, **139**, 153–162.
101. Бирюкова Е.Н., Аринбасарова А.Ю. и Меденцев А.Г. (2008) Адаптация дрожжей *Yarrowia lipolytica* к этанолу, *Микробиология*, **78**, 186–191.
102. Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Vázquez-Acevedo, M., González-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, *Biochimica et biophysica acta*, **1817**, 353–362.
103. Juárez, O., Guerra, G., Velázquez, I., Flores-Herrera, O., Rivera-Pérez, R.E., and Pardo, J.P. (2006) The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*, *The FEBS journal*, **273**, 4603–4615.
104. 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.
105. 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*, *Eukaryotic cell*, **10**, 237–248.
106. Hiser, C., and McIntosh, L. (1990) Alternative Oxidase of Potato Is an Integral Membrane Protein Synthesized de Novo during Aging of Tuber Slices, *Plant physiology*, **93**, 312–318.
107. 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 physiology*, **119**, 1323–1330.
108. Considine, M.J., Daley, D.O., and Whelan, J. (2001) The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango, *Plant Physiology*, **126**, 1619–1629.
109. Sakajo, S., Minagawa, N., and Yoshimoto, A. (1999) Structure and regulatory expression of a single copy alternative oxidase gene from the yeast *Pichia anomala*, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **63**, 1889–1894.
110. Huh, W.K., and Kang, S.O. (2001) Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*, *The Biochemical journal*, **356**, 595–604.
111. 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, *Mycological research*, **109**, 150–158.
112. Borghouts, C., Scheckhuber, C.Q., Stephan, O., Osiewacz, H.D. (2002) Copper homeostasis and aging in the fungal model system *Podospora anserina*: differential expression of *PaCtr3* encoding a copper transporter, *The international journal of biochemistry & cell biology*, **34**, 1355–1371.
113. 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 management science*, **69**, 278–284.

114. 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 Physiology*, **121**, 1309–1320.
115. Sieger, S.M., Kristensen, B.K., Robson, C.A., Amirsadeghi, S., Eng, E.W., Abdel-Mesih, A., Møller, 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, *Journal of experimental botany*, **56**, 1499–1515.
116. 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 & environment*, **37**, 922–928.
117. Escobar, M.A., Franklin, K.A., Svensson, A.S., Salter, M.G., Whitelam, G.C., and Rasmusson, A.G. (2005) during macronutrient stress in tobacco cells, *Journal of experimental botany*, **56**, 1499–1515.
118. Watanabe, C.K., Hachiya, T., Takahara, K., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Uesono, Y., Tera-shima, 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 physiology*, **51**, 810–822.
119. Hachiya, T., and Noguchi, K. (2011) Integrative response of plant mitochondrial electron transport chain to nitrogen source, *Plant cell reports*, **30**, 195–204.
120. 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 molecular biology*, **58**, 193–212.
121. Figueira, T.R., and Arruda, P. (2011) Differential expression of uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase in the plant response to stress, *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **43**, 67–70.
122. Millar, A.H., Whelan, J., Soole, K.L., and Day, D.A. (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants, *Annual review of plant biology*, **62**, 79–104.
123. Vanlerberghe, G.C. (2013) Alternative Oxidase: A mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants, *International journal of molecular sciences*, **14**, 6805–6847.
124. Djajanegara, I., Finnegan, P.M., Mathieu, C., McCabe, T., Whelan, J., and Day, D.A. (2002) Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean, *Plant molecular biology*, **50**, 735–742.
125. 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 & environment*, **33**, 2121–2131.
126. 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*, *Journal of plant physiology*, **167**, 561–570.
127. Xu, F., Yuan, S., and Lin, H.H. (2011) Response of mitochondrial alternative oxidase (AOX) to light signals, *Plant signaling & behavior*, **6**, 55–58.

128. 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 & environment*, **34**, 618–628.
129. 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, *The New phytologist*, **189**, 1027–1039.
130. Searle, S.Y., and Turnbull, M.H. (2011) Seasonal variation of leaf respiration and the alternative pathway in field-grown *Populus* × *Canadensis*, *Physiologia plantarum*, **141**, 332–342.
131. 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, *Physiologia plantarum*, **142**, 339–351.
132. 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, *Journal of plant physiology*, **164**, 718–727.
133. Smith, C.A., Melino, V.J., Sweetman, C., Soole, K.L. (2009) Manipulation of alternative oxidase can influence salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Physiologia plantarum*, **137**, 459–472.
134. 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 Inzé, D. (2010) Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of *Arabidopsis* leaves to prolonged mild osmotic stress, *Plant Physiology*, **152**, 226–244.
135. Wang, J., and Vanlerberghe, G.C. (2013) A lack of mitochondrial alternative oxidase compromises capacity to recover from severe drought stress, *Physiologia plantarum*, [Epub ahead of print] doi: 10.1111/ppl.12059.
136. 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, *Zeitschrift für Naturforschung. Section C: Biosciences*, **65**, 463–471.
137. Mlejnek, P. (2013) Cytokinin-induced cell death is associated with elevated expression of alternative oxidase in tobacco BY-2 cells, *Protoplasma*, **250**, 1195–1202.
138. Andronis, E.A., Moschou, P.N., Toumi, I., and Roubelakis-Angelakis, K.A. (2014) Peroxisomal polyamine oxidase and NADPH-oxidase cross-talk for ROS homeostasis which affects respiration rate in *Arabidopsis thaliana*, *Frontiers in plant science*, **5**, 132.
139. 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 Physiology*, **120**, 529–538.
140. 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, *Molecular plant-microbe interactions*, **23**, 39–48.

141. 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 physiology*, **160**, 1453–1467.
142. 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., Yu, J.Q. (2012) The reduction of reactive oxygen species formation by mitochondrial alternative respiration in tomato basal defense against TMV infection, *Planta*, **235**, 225–38.
143. Colombatti, F., Gonzalez, D.H., and Welchen, E. (2014) Plant mitochondria under pathogen attack: A sigh of relief or a last breath? *Mitochondrion*, S1567–7249(14)00032–4.
144. Li, Z., Liang, W.S., and Carr, J.P. (2014) Effects of modifying alternative respiration on nitric oxide-induced virus resistance and PR1 protein accumulation, *The Journal of general virology*, **95**, 2075–2081.
145. 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 physiology*, **142**, 595–608.
146. 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, *Zeitschrift für Naturforschung. Section C: Biosciences*, **63**, 706–712.
147. Matos, A.R., Mendes, A.T., Scotti-Campos, P., and Arrabaça, 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, *Physiologia Plantarum*, **137**, 485–497.
148. Ho, L.H., Giraud, E., Uggalla, V., Lister, R., Clifton, R., Glen, A., Thirkettle-Watts, D., Van Aken, O., Whelan, J. (2008) Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis*, *Plant physiology*, **147**, 1858–1873.
149. Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C., Siedow, J.N. (2006) Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling, *Plant physiology*, **141**, 357–366.
150. Koornneef, A., and Pieterse, C.M. (2008) Cross talk in defense signaling, *Plant physiology*, **146**, 839–844.
151. Clifton, R., Millar, A.H., and Whelan, J. (2006) Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses, *Biochimica et biophysica acta*, **1757**, 730–741.
152. Considine, M.J., Holtzapffel, R.C., Day, D.A., Whelan, J., and Millar, A.H. (2002) Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots, *Plant Physiology*, **129**, 949–953.
153. Van Aken, O.V., Giraud, E., Clifton, R., and Whelan, J. (2009) Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses, *Physiologia Plantarum*, **137**, 354–361.
154. Giraud, E., Van Aken, O., Ho, L.H., and Whelan, J. (2009) The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of ALTERNATIVE OXIDASE1a, *Plant Physiology*, **150**, 1286–1296.
155. Gray, G.R., Villarimo, A.R., Whitehead, C.L., and McIntosh, L. (2004) Transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants with

- increased expression levels of mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase: evidence implicating this enzyme in the redox activation of the alternative oxidase, *Plant & cell physiology*, **45**, 1413–1425.
156. Vanlerberghe, G.C., and McIntosh, L. (1996) Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria, *Plant Physiology*, **111**, 589–595.
157. Costa, J.H., de Melo, D.F., Gouveia, Z., Cardoso, H.G., Peixe, A., and Arnholdt-Schmitt, B. (2009) The alternative oxidase family of *Vitis vinifera* reveals an attractive model to study the importance of genomic design, *Physiologia plantarum*, **137**, 553–565.
158. Cavalcanti, J.H., Oliveira, G.M., Saraiva, K.D., Torquato, J.P., Maia, I.G., de Melo, D.F., and Costa, J.H. (2013) Identification of duplicated and stress-inducible *Aox2b* gene co-expressed with *Aox1* in species of the *Medicago* genus reveals a regulation linked to gene rearrangement in leguminous genomes, *Journal of plant physiology*, **170**, 1609–1619.
159. Frederico, A.M., Campos, M.D., Cardoso, H.G., Imani, J., and Arnholdt-Schmitt, B. (2009) Alternative oxidase involvement in *Daucus carota* somatic embryogenesis, *Physiologia Plantarum*, **137**, 498–508.
160. Campos, M.D., Cardoso, H.G., Linke, B., Costa, J.H., de Melo, D.F., Justo, L., Frederico, A.M., and Arnholdt-Schmitt, B. (2009) Differential expression and co-regulation of carrot AOX genes (*Daucus carota*), *Physiologia plantarum*, **137**, 578–591.
161. Huh, W.K., and Kang, S.O. (1999) Molecular cloning and functional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*, *Journal of bacteriology*, **181**, 4098–4102.
162. Hattori, T., Kino, K., and Kirimura, K. (2009) Regulation of alternative oxidase at the transcription stage in *Aspergillus niger* under the conditions of citric acid production, *Current microbiology*, **58**, 321–325.
163. González-Barroso, M.M., Ledesma, A., Lepper, S., Pérez-Magán, E., Zaragoza, P., and Rial, E. (2006) Isolation and bioenergetic characterization of mitochondria from *Pichia pastoris*, *Yeast (Chichester, England)*, **23**, 307–313.
164. Chae, M.S., Lin, C.C., Kessler, K.E., Nargang, C.E., Tanton, L.L., Hahn, L.B., and Nargang, F.E. (2007) Identification of an alternative oxidase induction motif in the promoter region of the *aod-1* gene in *Neurospora crassa*, *Genetics*, **175**, 1597–1606.
165. Polidoros, A.N., Mylona, P.V., and Arnholdt-Schmitt, B. (2009) Aox gene structure, transcript variation and expression in plants. *Physiologia Plantarum*, **137**, 342–353.
166. Tanudji, M., Sjöling, S., Glaser, E., and Whelan, J. (1999) Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria, *The Journal of biological chemistry*, **274**, 1286–1293.
167. Mokranjac, D., and Neupert, W. (2009) Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling, *Biochimica et biophysica acta*, **1793**, 33–41.
168. Whelan, J., Hugosson, M., Glaser, E., and Day, D.A. (1995) Studies on the import and processing of the alternative oxidase precursor by isolated soybean mitochondria, *Plant molecular biology*, **27**, 769–778.
169. Albury, M.S., Dudley, P., Watts, F.Z., and Moore, A.L. (1996) Targeting the plant alternative oxidase protein to *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria confers cyanide-insensitive

- respiration, *The Journal of biological chemistry*, **271**, 17062–17066.
170. Hamilton, V., Singha, U.K., Smith, J.T., Weems, E., and Chaudhuri, M. (2014) Trypanosome alternative oxidase possesses both an N-terminal and internal mitochondrial targeting signal, *Eukaryotic Cell*, **13**, 539–547.
 171. Williams, S., Saha, L., Singha, U.K., and Chaudhuri, M. (2008) *Trypanosoma brucei*: differential requirement of membrane potential for import of proteins into mitochondria in two developmental stages, *Experimental parasitology*, **118**, 420–433.
 172. Umbach, A.L., and Siedow, J.N. (2000) Covalent and Noncovalent Dimers of the Cyanide-Resistant Alternative Oxidase Protein in Higher Plant Mitochondria and Their Relationship to Enzyme Activity, *Plant physiology*, **103**, 845–854.
 173. Siedow, J.N., Umbach, A.L., and Moore, A.L. (1995) The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center, *FEBS Letters*, **362**, 10–14.
 174. Berthold, D.A., and Stenmark, P. (2003) Membrane-bound diiron carboxylate proteins, *Annual review of plant biology*, **54**, 497–517.
 175. Moore, A.L., Shiba, T., Young, L., Harada, S., Kita, K., and Ito, K. (2013) Unraveling the heater: new insights into the structure of the alternative oxidase, *Annual review of plant biology*, **64**, 637–663.
 176. Bendall, D.S., and Bonner, W.D. (1971) Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria, *Plant physiology*, **47**, 236–245.
 177. Minagawa, N., Sakajo, S., Komiyama, T., and Yoshimoto, A. (1990) Essential role of ferrous iron in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*, *FEBS Letters*, **267**, 114–116.
 178. Moore, A.L., Umbach, A.L., and Siedow, J.N. (1995) Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: a model of the active site, *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **27**, 367–377.
 179. Berthold, D.A., Voevodskaya, N., Stenmark, P., Gräslund, A., and Nordlund, P. (2002) EPR studies of the mitochondrial alternative oxidase. Evidence for a diiron carboxylate center, *The Journal of biological chemistry*, **277**, 43608–43614.
 180. Maréchal, A., Kido, Y., Kita, K., Moore, A.L., and Rich, P.R. (2009) Three redox states of *Trypanosoma brucei* alternative oxidase identified by infrared spectroscopy and electrochemistry, *The Journal of biological chemistry*, **284**, 31827–31833.
 181. Moore, A.L., Carré, J.E., Affourtit, C., Albury, M.S., Crichton, P.G., Kita, K., and Heathcote, P. (2008) Compelling EPR evidence that the alternative oxidase is a diiron carboxylate protein, *Biochimica et biophysica acta*, **1777**, 327–330.
 182. Young, L., Shiba, T., Harada, S., Kita, K., Albury, M.S., Moore, A.L. (2013) The alternative oxidases: simple oxidoreductase proteins with complex functions, *Biochemical Society transactions*, **41**, 1305–1311.
 183. Albury, M.S., Elliott, C., and Moore, A.L. (2010) Ubiquinol-binding site in the alternative oxidase: mutagenesis reveals features important for substrate binding and inhibition, *Biochimica et biophysica acta*, **1797**, 1933–1939.
 184. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD – Visual Molecular Dynamics, *Journal of molecular graphics*, **14**, 33–38.
 185. De Clercq, I., Vermeirssen, V., Van Aken, O., Vandepoele, K., Murcha, M.W., Law, S.R., Inzé, A., Ng, S., Ivanova, A., Rombaut, D., van

- de Cotte, B., Jaspers, P., Van de Peer, Y., Kangasjärvi, J., Whelan, J., and Van Breusegem, F. (2013) The membrane-bound NAC transcription factor ANAC013 functions in mitochondrial retrograde regulation of the oxidative stress response in *Arabidopsis*, *The Plant cell*, **25**, 3472–3490.
186. Ng, S., Ivanova, A., Duncan, O., Law, S.R., Van Aken, O., De Clercq, I., Wang, Y., Carrie, C., Xu, L., Kmiec, B., Walker, H., Van Breusegem, F., Whelan, J., and Giraud, E. (2013) A membrane-bound NAC transcription factor, ANAC017, mediates mitochondrial retrograde signaling in *Arabidopsis*, *The Plant cell*, **25**, 3450–3471.
187. Van Aken, O., Zhang, B., Law, S., Narsai, R., and Whelan, J. (2013) AtWRKY40 and AtWRKY63 modulate the expression of stress-responsive nuclear genes encoding mitochondrial and chloroplast proteins, *Plant physiology*, **162**, 254–271.
188. Ivanova, A., Law, S.R., Narsai, R., Duncan, O., Lee, J.H., Zhang, B., Van Aken, O., Radomiljac, J.D., van der Merwe, M., Yi, K., and Whelan, J. (2014) A Functional Antagonistic Relationship between Auxin and Mitochondrial Retrograde Signaling Regulates Alternative Oxidase1a Expression in *Arabidopsis*, *Plant physiology*, **165**, 1233–1254.
189. Li, Q., Ritzel, R.G., McLean, L.L., McIntosh, L., Ko, T., Bertrand, H., and Nargang, F.E. (1996) Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*, *Genetics*, **142**, 129–140.
190. Chae, M.S., and Nargang, F.E. (2009) Investigation of regulatory factors required for alternative oxidase production in *Neurospora crassa*, *Physiologia plantarum*, **137**, 407–418.
191. Descheneau, A.T., Cleary, I.A., Nargang, F.E. (2005) Genetic evidence for a regulatory pathway controlling alternative oxidase production in *Neurospora crassa*, *Genetics*, **169**, 123–135.
192. MacPherson, S., Larochelle, M., and Turcotte, B. (2006) A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins, *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, **70**, 583–604.
193. Sellem, C.H., Bovier, E., Lorin, S., and Sainsard-Chanet, A. (2009) Mutations in two zinc-cluster proteins activate alternative respiratory and gluconeogenic pathways and restore senescence in long-lived respiratory mutants of *Podospira anserina*, *Genetics*, **182**, 69–78.
194. Suzuki, Y., Murray, S.L., Wong, K.H., Davis, M.A., and Hynes, M.J. (2012) Reprogramming of carbon metabolism by the transcriptional activators AcuK and AcuM in *Aspergillus nidulans*, *Molecular microbiology*, **84**, 942–964.
195. Medentsev, A.G., Arinbasarova, A.Y., and Akimenko, V.K. (1999) Regulation and physiological role of cyanide-resistant oxidases in fungi and plants, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1230–1243.
196. Medentsev, A.G., Arinbasarova, A. Iu., and Akimenko, V.K. (2001) Level of cyclic AMP during induction of alternative oxidase in *Yarrowia lipolytica* yeast cells, *Mikrobiologiya*, **70**, 29–33.
197. Jarmuszkiewicz, W., Czarna, M., and Sluse, F.E. (2005) Substrate kinetics of the *Acanthamoeba Castellanii* alternative oxidase and effects of GMP, *Biochimica et biophysica acta*, **1708**, 71–78.
198. Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Sweet, C.R., Lennon, A.M., Rauch, G.S. and Siedow, J.N. (1998) Regulation of the cyanideresistant alternative oxidase from plant mitochondria – identification of the cysteine residue involved in a-keto

- acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation, *The Journal of biological chemistry*, **273**, 30750–30756.
199. Day, D.A., and Wiskich, J.T. (1995) Regulation of alternative oxidase activity in higher plants, *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **27**, 379–385.
200. Vanlerberghe, G.C., Yip, J.Y., Parsons, H.L. (1999) In Organello and *in vivo* Evidence of the Importance of the Regulatory Sulfhydryl/Disulfide System and Pyruvate for Alternative Oxidase Activity in Tobacco, *Plant physiology*, **121**, 793–803.
201. Grant, N., Onda, Y., Kakizaki, Y., Ito, K., Watling, J., and Robinson, S. (2009) Two cys or not two cys? That is the question; alternative oxidase in the thermogenic plant sacred lotus, *Physiologia Plantarum*, **150**, 987–995.
202. Carré, J.E., Affourtit, C., and Moore, A.L. (2011) Interaction of purified alternative oxidase from thermogenic *Arum maculatum* with pyruvate, *FEBS letters*, **585**, 397–401.
203. Mallo, N., Lamas, J., Leiro, J.M. (2014) Alternative oxidase inhibitors as antiparasitic agents against scuticociliatosis, *Parasitology*, **14**, 1–11.
204. 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*, *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, **50**, 594–602.
205. Avila-Adame, C., and Köller, W. (2002) Disruption of the alternative oxidase gene in *Magnaporthe grisea* and its impact on host infection, *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **15**, 493–500.
206. 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 OXIDASE1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress, *Plant Physiology*, **147**, 595–610.
207. Zhang, Y., Xi, D., Wang, J., Zhu, D., and Guo, X. (2009) Functional analysis reveals effects of tobacco alternative oxidase gene (*NtAOX1a*) on regulation of defence responses against abiotic and biotic stresses, *Bioscience reports*, **29**, 375–383.
208. Feng, H., Hou, X., Li, X., Sun, K., Wang, R., Zhang, T., and Ding, Y. (2013) Cell death of rice roots under salt stress may be mediated by cyanide-resistant respiration, *Zeitschrift für Naturforschung. Section C: Biosciences*, **68**, 39–46.
209. Cvetkovska, M., Dahal, K., Alber, N.A., Jin, C., Cheung, M., and Vanlerberghe, G.C. (2014) Knockdown of mitochondrial alternative oxidase induces the ‘stress state’ of signaling molecule pools in *Nicotiana tabacum*, with implications for stomatal function, *The New phytologist*, **203**, 449–461.
210. Liu, J., Li, Z., Wang, Y., and Xing, D. (2014) Overexpression of ALTERNATIVE OXIDASE1a alleviates mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity in *Arabidopsis*, *Journal of experimental botany*, **65**, 4465–4478.
211. Rasmusson, A.G., Fernie, A.R., and van Dongen, J.T. (2009) Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiologia Plantarum*, **137**, 371–382.
212. Chai, T.T., Colmer, T.D., and Finnegan, P.M. (2010) Alternative oxidase, a determinant of plant gametophyte fitness and fecundity, *Plant signaling & behavior*, **5**, 604–606.

213. 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, *Molecular plant pathology*, **11**, 429–440.
214. 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, *Journal of plant physiology*, **170**, 111–114.
215. Maxwell, D.P., Wang, Y., and McIntosh, L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 8271–8276.
216. 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, *Physiologia plantarum*, **112**, 327–333.
217. Amirsadeghi, S., McDonald, A.E., and Vanlerberghe, G.C. (2007) A glucocorticoid-inducible gene expression system can cause growth defects in tobacco, *Planta*, **226**, 453–463.
218. 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 Physiology*, **129**, 1908–1920.
219. Cvetkovska, M., and Vanlerberghe, G.C. (2012) Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial concentrations of superoxide and nitric oxide, *The New phytologist*, **195**, 32–39.
220. 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*, *The international journal of biochemistry & cell biology*, **36**, 162–172.
221. 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 biotechnology*, **11**, 96.
222. 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 reports*, **7**, 341–345.
223. 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 Letters*, **583**, 148–152.
224. 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, *Physiologia Plantarum*, **137**, 427–434.
225. 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, *Biochimica et biophysica acta*, **1797**, 20–28.
226. 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 metabolism*, **9**, 449–460.
227. El-Khoury, R., Dufour, E., Rak, M., Ramanantsoa, N., Grandchamp, N., Csaba, Z., Duvillié, B., Bénit, 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 Genetics*, **9**, e1003182.
228. 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 physiology*, **113**, 657–661.