

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marina B. Stanić

**ISPITIVANJE ELEMENATA  
RESPIRATORNOG LANCA GLJIVE  
*Phycomyces blakesleeanus* BURGEFF:  
VEZA SA METABOLIZMOM FOSFATNIH  
JEDINJENJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marina B. Stanić

**INVESTIGATION OF RESPIRATORY  
CHAIN ELEMENTS IN FUNGUS  
*Phycomyces blakesleeanus*:  
CONNECTION WITH METABOLISM OF  
PHOSPHATE COMPOUNDS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

**Mentori:**

dr Miroslav Živić, docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Joanna Zakrzewska, viši naučni saradnik, Institut za opštu i fizičku hemiju, Beograd

**Članovi komisije:**

dr Miroslav Živić, docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Joanna Zakrzewska, viši naučni saradnik, Institut za opštu i fizičku hemiju, Beograd

dr Tijana Cvetić-Antić, docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

*Eksperimentalni deo ovog rada izveden je na odseku Nauka o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu i u NMR laboratoriji Instituta za opštu i fizičku hemiju u Beogradu.*

*Zahvaljujem se mentorima, dr Miroslavu Živiću i dr Joani Zakševskoj na stručnim savetima, svesrdnoj pomoći u svim koracima nastajanja ove teze, od eksperimentalnog rada do predstavljanja rezultata, a pre svega na ukazanom poverenju i prilici.*

*Zahvaljujem se dr Tijani Cvetić-Antić na velikoj pomoći u eksperimentima sa izolovanim mitohondrijama.*

*Zhvaljujem se dr Branki Živanović zbog značajnog učešća u eksperimentalnom radu na samom početku nastajanja ove disertacije.*

*Želim da zahvalim i kolegama, dr Milanu Žižiću, dr Ljiljani Nikolić, Mirzeti Hadžibrahimović i Strahinji Križaku na pomoći i podršci tokom nastajanja ove teze.*

*Na kraju, najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici na podršci, strpljenju i razumevanju.*

## REZIME

U ovom radu je ispitivano postojanje i aktivnost alternativnih komponenata elektron transportnog lanca kod gljive *Phycomyces blakesleeanus*, sa akcentom na enzim alternativna oksidaza (AOX), kao i ponašanje respiratornog sistema u uslovima smanjene koncentracije kiseonika. Odgovor respiratornog sistema na ovaj stres je upoređen sa odgovorom druge komponente energetskeg metabolizma, polifosfata (PPn), sa namerom da se utvrdi da li su, i na koji način, ova dva metabolička sistema povezana.

Ispitivanjima izvedenim pomoću kiseonične elektrode tipa Klark je utvrđeno postojanje aktivnosti alternativnih elemenata respiratornog lanca kod *P. blakesleeanus*, a za zabeleženu aktivnost su odgovorni AOX, zatim enzim ili enzimski kompleks koji se indukuje u uslovima dugotrajne inhibicije Kompleksa III i nazvan je Kompleks III<sub>PAR</sub>, a vrlo je verovatno da postoji i spoljašnja alternativna NADH:dehidrogenaza (NDE). Utvrđeno je da se AOX sintetiše u citoplazmi nakon čega se enzim unosi u mitohondriju energetskeg zavisnim transportom.

U uslovima smanjene koncentracije kiseonika kapacitet AOX se ne menja, ali učešće enzima u respiraciji značajno raste zbog inhibicije citohrom *c* oksidaze (COX) u ovim eksperimentalnim uslovima. Ovakav odgovor respiratornog sistema *P. blakesleeanus* se može pripisati potrebi za brzom odbranom od nastanka reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) prilikom reoksigenacije koja dovodi do velikog porasta protoka elektrona kroz citohromski respiratorni put.

<sup>31</sup>P NMR spektroskopija je pokazala da u istim eksperimentalnim uslovima odnos intenziteta centralnog signala PPn i unutarćelijskog neorganskog fosfata (PPc/Pi), koji je dobar pokazatelj energetskeg stanja ćelije, opada, ali iznenađujuće, dolazi do rasta nivoa ATP-a. Analiza glavnih komponenti (PCA), je pokazala snažnu negativnu korelaciju između ova dva parametra, ali i negativnu korelaciju između odnosa PPc/Pi i učešća alternativne u ukupnoj respiraciji. Osim toga, dodatak azida, snažnog inhibitora COX, nije dodatno smanjio odnos PPc/Pi u uzorcima micelijuma koji su bili izloženi tretmanu smanjene koncentracije kiseonika. Ovi rezultati ukazuju na povezanost ove

dve komponente energetskeg metabolizma, odnosno na mogućnost da se hidrolizom PPn nadoknadi manjak ATP-a u ćelijama izazvan inhibicijom citohromskog lanca.

Dodatnu potvrdu ovog zaključka je pružio set eksperimenata u kojima je micelijum *P. blakesleeanus* bio izložen dugotrajnom dejstvu cijanida (5 h). Nakon 100 min, merenja na kiseoničnoj elektrodi su pokazala početak oporavka aktivnosti COX koji je do kraja inkubacionog perioda bio potpun. Ove promene u aktivnosti COX su praćene promenama PPc/Pi odnosa, ali do oporavka PPc/Pi odnosa nije došlo prilikom inkubacije micelijuma u antimicinu A i azidu, gde ne dolazi do oporavka COX funkcije. Svi ovi podaci ukazuju da je za održavanje nivoa PPn u ćelijama *P. blakesleeanus* neophodan funkcionalan citohromski respiratorni lanac koji ima sposobnost formiranja transmembranskog protonskog gradijenta i sinteze ATP-a.

**Ključne reči:** *Phycomyces blakesleeanus*, alternativna oksidaza, cijanid osetljiva respiracija, cijanid neosetljiva respiracija, polifosfati, ATP

**Naučna oblast:** Biologija

**Uza naučna oblast:** Biofizika

**UDK broj:** [577.337:582.281] (043.3)

## ABSTRACT

The existence and activity of the alternative components of electron transport chain in fungus *Phycomyces blakesleeanus*, especially alternative oxidase (AOX), as well as respiratory chain behavior in the conditions of oxygen deprivation, was investigated in this work. Response of respiratory system to these stress conditions was compared to response of another component of energy metabolism, polyphosphates (PPn), with the intention of determining whether, and in what way, are these two metabolic systems connected.

Activity of the alternative elements of respiratory chain in *P. blakesleeanus* was recorded by means of Clark type oxygen electrode, and the elements responsible for this activity were AOX and an enzyme or enzymatic complex induced by long-term inhibition of Complex III which was named Complex III<sub>PAR</sub>. Also, there is a strong possibility of external alternative NADH:dehydrogenase (NDE) existence. It was established that synthesis of AOX takes place in the cytosol, and the enzyme is then imported into the mitochondrion by energy dependent transport.

In the conditions of oxygen deprivation AOX capacity is not affected, but its engagement in total respiration increases significantly due to the cytochrome *c* oxidase (COX) inhibition. This type of respiratory chain response in *P. blakesleeanus* can be attributed to a need for fast defense from reactive oxygen species (ROS) formed during reoxygenation, which leads to the increase in electron flow through the cytochrome respiratory path.

<sup>31</sup>P NMR spectroscopy revealed that the intensity ratio of core PPn to intracellular inorganic phosphate signal (PPc/Pi), which is a good indicator of overall cellular energy metabolism, decreases in these experimental conditions, but surprisingly, ATP level raises. Principal component analysis (PCA), has shown strong negative correlation between these two parameters, and also between PPc/Pi ratio and participation of alternative in total respiration. Apart from that, addition of azide, a strong COX inhibitor, did not additionally decrease PPc/Pi ratio in mycelium samples exposed to oxygen deprivation. These results indicate that there is a connection between these two components of energy metabolism, i.e., there is a possibility that the decrease

in cellular ATP content caused by cytochrome chain inhibition can be compensated by PPn hydrolysis.

This conclusion was corroborated by the additional set of experiments where *P. blakesleanus* mycelium was exposed to cyanide for 5 h. After 100 min, oxygen electrode measurements have shown the beginning of COX activity recovery, which was complete by the end of the incubation period. These changes in COX activity were accompanied by changes in PPc/Pi ratio, but there was no PPc/Pi ratio recovery when mycelium was incubated in antimycin A or azide, where there was also no recovery of COX activity. These data indicate that, in *P. blakesleanus* cells, PPn level preservation requires existence of functional cytochrome respiratory chain capable of transmembrane proton gradient formation and ATP synthesis.

**Key words:** *Phycomyces blakesleanus*, alternative oxidase, cyanide sensitive respiration, cyanide insensitive respiration, polyphosphates, ATP

**Scientific field:** Biology

**Narrower scientific field:** Biophysics

**UDK classification:** [577.337:582.281] (043.3)



## SKRAĆENICE

**ADP** – adenzin difosfat

**AMP** – adenzin monofosfat

**AOX** – alternativna oksidaza

**ATP** – adenzin trifosfat

**cAMP** – ciklični adenzin monofosfat

**CCCP** - karbonil cijanid m-hlorofenil hidrazon

**COX** – citohrom c oksidaza

**CRR** – cijanid neosetljiva respiracija

**CSR** – cijanid osetljiva respiracija

**DdPPK**- polifosfat kinaza *D. discoideum*

**FAD** – flavin adenin dinukleotid

**FMN** – flavin mononukleotid

**GDP** – guanozin difosfat

**KIII<sub>PAR</sub>** – paralelni kompleks III

**NADH** – nikotinamid adenin dinukleotid

**NDE** – spoljašnja NADH:dehidrogenaza

**NMR** – nuklearna magnetna rezonanca

**NOS** – azot oksid sintaza

**PCA** – analiza glavnih komponenti (*principal component analysis*)

**PFK** – fosfofruktokinaza

**Pi** – unutarćelijski neorganski fosfati

**PPc** – centralne fosfatne grupe polifosfata

**PPK** – bakterijska polifosfat kinaza

**PPn** – neorganski polifosfati

**PPp** – preposlednje fosfatne grupe polifosfata

**Ppt** – krajnje fosfatne grupe polifosfata

**ROS** – reaktivne kiseonične vrste

**SHAM** – hidroksamid salicilne kiseline

**SM** – suva masa

**SP** – fosfatni šečeri (*phosphate sugars*)

**TAO** – tripanozomalana alternativna oksidaza

**UDPG** – uridildifosfat glukoza

**UQ** – ubihinon

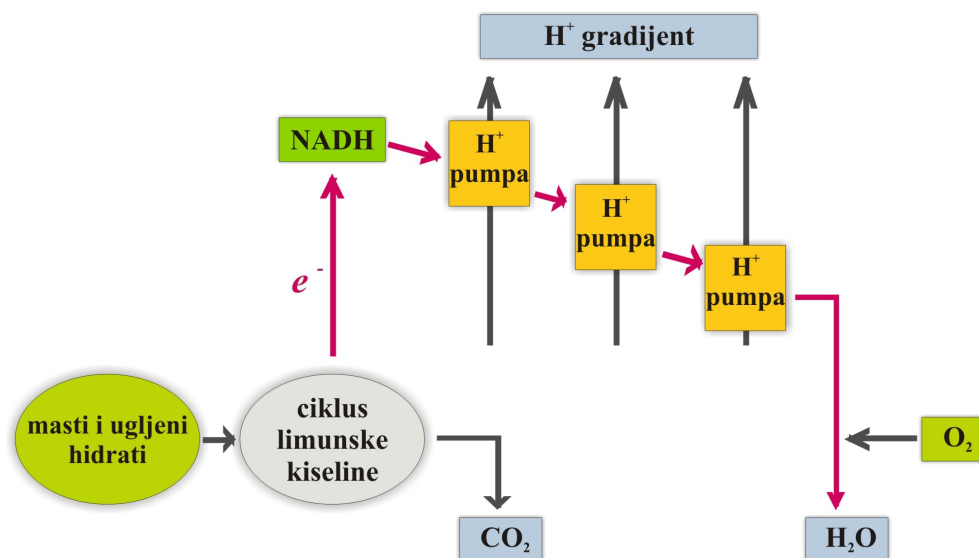
# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Elektron-transportni lanac .....	3
1.2. ATP sintaza .....	13
1.3. Alternativne komponente elektron-transportnog lanca .....	15
1.3.1. Alternativne NAD(P)H:ubihinon osidoreduktaze (dehidrogenaze) .....	16
1.3.2. Alternativne ubihinol oksidaze (AOX) .....	17
1.4. Polifosfati i njihova uloga u energetske metabolizmu .....	21
1.5. <i>Phycomyces blakesleeanus</i> kao predstavnik filamentoznih gljiva .....	26
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	29
3. MATERIJAL I METODE .....	30
3.1. Eksperimentalni objekat .....	30
3.1.1. Uzgoj micelijuma gljive <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .....	30
3.1.2. Izolacija mitohondrija .....	31
3.1.3. Enzimski eseji .....	31
3.2. Merenje potrošnje kiseonika .....	32
3.2.1. Određivanje učešća različitih komponenata respiratornog lanca u ukupnom disanju .....	33
3.2.2. Određivanje učešća CRR u ukupnom disanju nakon izlaganja uzoraka uslovima hipoksije i anoksije .....	33
3.3. <sup>31</sup> P NMR eksperimenti .....	34
3.4. Određivanje uticaja hipoksije i anoksije na rast i morfologiju gljive .....	34
3.5. Određivanje koncentracije cijanidnog jona u rastvoru .....	35
3.6. Statistička analiza podataka .....	35

3.7. Hemikalije .....	36
4. REZULTATI .....	37
4.1. Efekti inhibitora respiracije .....	37
4.2. Određivanje učešća alternativne respiracije u različitim fazama rasta micelijuma <i>P. blakesleeanus</i> .....	38
4.3. Indukcija cijanid neosetljive respiracije .....	41
4.4. Inhibicija respiracije rotenonom - Kompleks I.....	43
4.5. Efekti smanjene koncentracije kiseonika na ćelijsku respiraciju .....	44
4.6. Efekti smanjene koncentracije kiseonika na metabolizam fosfatnih jedinjenja..	46
4.7. Veza između ćelijske respiracije i metabolizma fosfatnih jedinjenja u uslovima smanjene koncentracije kiseonika .....	49
4.8. Uticaj hipoksije i anoksije na klijanje spora i rast gljive <i>P. blakesleeanus</i> .....	52
4.9. Uticaj različitih blokatora elektron transportnog lanca na učešće alternativne u ukupnoj respiraciji i metabolizam polifosfata .....	55
4.10. Uticaj cijanida na <sup>31</sup> P NMR spektar micelijuma gljive <i>P. blakesleeanus</i> .....	58
5. DISKUSIJA .....	62
5.1. Elementi respiratornog lanca kod gljive <i>P. blakesleeanus</i> .....	62
5.2. Regulacija energetskog metabolizma gljive <i>P. blakesleeanus</i> kiseonikom .....	67
5.3. Oporavak citohromske respiracije prilikom inkubacije micelijuma <i>P. blakesleeanus</i> u cijanidu.....	72
5.4. Uticaj cijanida na promene intenziteta različitih signala u <sup>31</sup> P NMR spektru.....	75
6. ZAKLJUČCI .....	78
7. LITERATURA .....	80
8. BIOGRAFIJA.....	104

## 1. UVOD

Biohemijske reakcije u ćeliji, neophodne za obavljanje životnih procesa, podrazumevaju razmenu energije. Kroz seriju reakcija koje se odvijaju u citoplazmi, energija dobijena delimičnom oksidacijom ugljenih hidrata se koristi za sintezu ATP-a, osnovne energetske jedinice ćelije. Veoma rano u evoluciji je razvijen daleko efikasniji metod dobijanja energije, baziran na reakcijama oksidacije supstrata koje se odvijaju na membranama. Kod prokariota je u pitanju plazmamembrana, dok su kod eukariota za ove procese zadužene membrane organela specijalizovanih za konverziju energije, kao što su mitohondrije, koje se mogu naći u ćelijama svih eukariota, i plastidi, koji se nalaze u ćelijama biljaka. Membrane ovih organela sadrže elemente neophodne za seriju transfera elektrona i obezbeđuju usmerenost elektronskog transporta, što dalje omogućava produkciju najvećeg dela ćelijskog ATP-a. Unutrašnja membrana mitohondrija, tilakoidna membrana hloroplasta i plazmamembrana prokariota u procesu obezbeđivanja energije za biohemijske reakcije funkcionišu na sličan način, procesom koji se označava kao hemiosmotsko sprezanje, i koji predstavlja vezu između hemijske reakcije formiranja veze u molekulu ATP-a i procesa membranskog transporta (*Alberts et al., 2002*). Elektroni dobijeni oksidacijom molekula supstrata se prenose serijom prenosioca elektrona koji su smešteni u membrani pri čemu se oslobađa energija za transport odnosno »pumpanje« protona kroz membranu. Na ovaj način se formira transmembranski elektrohemijski potencijala, koji predstavlja formu uskladištene energije (Slika 1), a sam proces se naziva ćelijsko disanje. Sinteza ATP-a se odvija zahvaljujući protoku protona niz hemijski gradijent i katalizovana je enzimom *ATP sintazom* koja omogućava sintezu ATP-a od ADP-a i neorganskog fosfata (Pi).

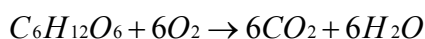


**Slika 1.** Konverzija energije na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani (*Molecular Biology of the Cell, Alberts et al., 2002*).

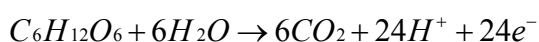
Mitohondrije se međusobno razlikuju po veličini i obliku, u zavisnosti od njihovog porekla i metaboličkog stanja, ali najčešće se mogu predstaviti kao elipsoidne organele dužine 1  $\mu\text{m}$  i širine 0,5  $\mu\text{m}$ , iako su to u suštini veoma pokretljive i dinamične strukture. Eukariotske ćelije sadrže veliki broj mitohondrija, čak do 2000. Ograničene su sa dve membrane, spoljašnjom i unutrašnjom, između kojih se nalazi međumembranski prostor, a unutrašnja membrana ograničava matriks. Spoljašnja membrana sadrži veliki broj transportnih proteina *porina* koji propuštaju molekule veličine i do 5000 Da, ali većina ovih molekula ne može da prođe unutrašnju membranu, pa je zbog toga hemijski sastav intermembranskog prostora veoma sličan citoplazmi, dok se sastav matriksa od nje veoma razlikuje. Matriks je veoma gust rastvor koji sadrži visoke koncentracije supstrata, nukleotidnih kofaktora, neorganskih jona i rastvorljivih enzima oksidativnog metabolizma među kojima su i oni koji oksiduju piruvat i masne kiseline do acetil-koenzima A, a zatim acetil CoA dalje u ciklusu limunske kiseline. Unutrašnja mitohondrijalna membrana se po svom sastavu razlikuje od plazmamembrane i membrana drugih organela, sadrži visoke koncentracije fosfolipida kardiolipina i daleko veći procenat proteina, čak do 80% (*Krauss, 2001*). Među ovim proteinima su u visokom procentu zastupljeni proteini elektron-transportnog odnosno respiratornog lanca i *ATP sintaza*. Unutrašnja membrana je bogata ulegnućima koje se zovu *kriste* i za koje se do nedavno verovalo da su povezane sa međumembranskim prostorom širokim otvorima. Skorašnja ispitivanja strukture

mitohondrija elektron- tomografijom su pokazala da su kriste povezane sa međumembranskim prostorom takozvanim *raskršćima krista* koje predstavljaju tubule prečnika 28 nm. Same kriste često međusobno srastaju i formiraju lamelarne strukture od kojih svaka može biti povezana sa međumembranskim prostorom odnosno unutrašnjom mitohondrijalnom membranom (*Frey and Mannella, 2000*). I pored razlika u morfologiji i rasporedu krista, rekonstrukcija mitohondrija *in situ* iz neurona, mrkog masnog tkiva i gljive *Neurospora crassa* (*Perkins et al., 2001*), je pokazala da sve imaju zajedničke strukturne odlike, a to su širina raskršća krista od 28 nm, razmak između spoljašnje i unutrašnje membrane od 20 nm i razmak na mestima kontakta od 14 nm. Očigledno je da postoji kontrola protoka supstanci između međumembranskog i međukristalnog prostora.

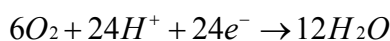
Mitohondrije su veoma značajne za evoluciju viših eukariota jer omogućavaju potpunu oksidaciju ugljenih hidrata koji se u anaerobnoj glikolizi završava dobijanjem piruvata i oslobađanjem veoma malog dela one energije koja se može osloboditi potpunom oksidacijom molekula glukoze. Aerobni organizmi u procesu oksidacije metabolita troše kiseonik i proizvode ugljen dioksid u procesu ćelijskog disanja. Potpuna oksidacija glukoze molekulskim kiseonikom:



može se podeliti u dve polureakcije. U prvoj dolazi do oksidacije ugljenikovih atoma glukoze što je posredovano enzimatskim reakcijama glikolize i ciklusa limunske kiseline.



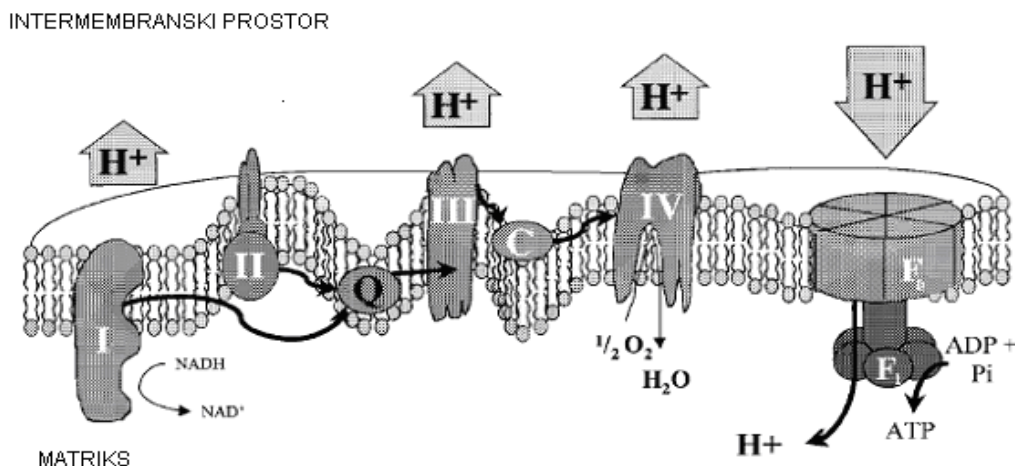
U drugoj polureakciji vrši se redukcija molekulskog kiseonika (*Voet et al., 2006*).



### 1.1. Elektron-transportni lanac

Imajući u vidu značaj ćelijskog disanja, očekivano je da je molekularni aparat koji omogućava da se ovaj proces odvija na kontrolisan način visoko konzervisan kod živih organizama. Sastoji se od 4 proteinska kompleksa: Kompleks I (*NADH-ubihinon oksidoreduktaza*), Kompleks II (*Sukcinat reduktaza*), Kompleks III (*Ubihinon-citohrom c oksidoreduktaza*) i Kompleks IV (*Citohrom c oksidaza*). Elektrone od Kompleksa I i II do Kompleksa III prenosi liposolubilni ubihinon (koenzim Q), a od Kompleksa III do

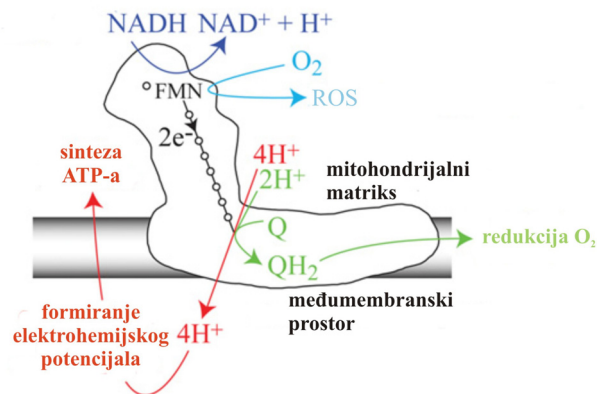
Kompleksa IV periferni membranski protein Citohrom *c*. Kompleksi I, III i IV povezuju prenos elektrona sa transportom protona preko unutrašnje mitohondrijalne membrane i sadrže redoks-centre čiji redoks-potencijal sukcesivno raste (Slika 2). Put elektrona se završava u Kompleksu IV koji ih koristi za redukciju kiseonika do vode, dok se dobijeni elektrohemijski protonski gradijent koristi za sintezu ATP-a u procesu oksidativne fosforilacije.



**Slika 2.** Šematski prikaz mitohondrijalnog elektronskog transportnog lanca sisara, uključujući ATP sintazu ( $F_0F_1$ ) (Joseph-Horne & Hollomon, 2000)

Kompleks I - NADH-ubihinon oksidoreduktaza se nalazi u mitohondrijama većine eukariotskih ćelija; oksiduje NADH da bi regenerisao  $NAD^+$  neophodan u ciklusu limunske kiseline i oksidaciji masnih kiselina, redukuje ubihinon (UQ) do ubihinola ( $UQH_2$ ) i prenosi protone kroz unutrašnju mitohondrijalnu membranu (Slika 3). Supstrati i kofaktori Kompleksa I imaju najniži redoks potencijal u mitohondrijalnom respiratornom lancu, pa nije iznenađujuće da on značajno doprinosi produkciji reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) u ćeliji (Hirst, 2010). Ovo je najveći proteinski kompleks unutrašnje mitohondrijalne membrane (~900 kD). Elektronskom mikroskopijom je utvrđeno da je oblika slova L sa dva glavna domena od kojih je jedan transmembranski a drugi zalazi u matriks (Saraste, 1999; Hirst, 2010).





**Slika 3. Kompleks I:** oksidacijom ugljenih hidrata, masti i proteina, nastaje NADH koji se oksiduje do  $\text{NAD}^+$ , dva elektrona se prenose preko FMN i lanca Fe-S centara da redukuju UQ do  $\text{UQH}_2$ . U redoks reakciji se regeneriše  $\text{NAD}^+$ , obezbeđuju se elektroni za redukciju  $\text{O}_2$  do  $\text{H}_2\text{O}$  i energija za transport protona preko membrane. Transport protona doprinosi transmembranskom potencijalu koji se koristi za sintezu ATP-a. Potpuno redukovani FMN može redukovati  $\text{O}_2$  do superoksida (Hirst, 2010)

Kompleks I je veoma kompleksna struktura koja može sadržati i do 43 proteinske subjedinice kod sisara, dok se bakterijski homolog ovog enzima sastoji od samo 14 subjedinica (Nicholls and Ferguson, 2002), koje verovatno predstavljaju zajedničko katalitičko jezgro. Kod gljiva Kompleks I sadrži 35 do 37 subjedinica (Weiss et al. 1991; Videira 1998; Abdrakhmanova et al. 2004), od kojih su barem tri specifične za gljive (Videira and Duarte 2001; Gabaldon et al. 2005). Kvasci koji imaju mogućnost aerobne oksidacije etanola, poput *Saccharomyces cerevisie* i *Schizosaccharomyces plombe*, ne poseduju Kompleks I (Joseph-Horne et al., 2001; Joseph-Horne & Hollomon, 2000).

Enzim sadrži nekovalentno vezan flavin mononukleotid (FMN) i osam gvožđe-umpornih centara (6  $4\text{Fe-4S}$  i 2  $2\text{Fe-2S}$ ), koji se svi nalaze u domenu koji se pruža u mitohondrijalni matriks. Do ovog broja Fe-S centara se došlo analizom sekvenci Nuo proteina (proteini bakterijskog homologa Kompleksa I), dok se elektron-paramagnetnom spektroskopijom može sa sigurnošću razlikovati samo pet signala - N1a, N1b, N2, N3 i N4. N2 centar je sa najvišim redoks potencijalom pa se pretpostavlja da je ovo poslednji Fe-S centar na koji elektroni dolaze pre transfera na ubihinon (Nicholls and Ferguson, 2002). NADH vezujuće mesto je u subjedinici od 51 kDa, pored flavina, ali je lokacija vezujućeg mesta ubihinona i dalje nerazrešena. NADH učestvuje samo u dvoelektronskom transferu ali FMN i UQ mogu da prime i

prenesu jedan ili dva elektrona zbog stabilnih semihinonskih oblika. Citohromi Kompleksa III na koje UQH<sub>2</sub> prenosi elektrone su sposobni samo za jednoelektronske redukcije pa na ovaj način FMN i ubihinon omogućavaju prenošenje elektrona između dvoelektronskog donora NADH i jednoelektronskih akceptora, citohroma (*Voet & Voet, 1995*). Fe-S centri takođe mogu da prenose samo po jedan elektron.

Redukcija ubihinona i translokacija protona su kod Kompleksa I daleko slabije izučeni procesi od oksidacije NADH i transporta protona. Veruje se da bi ubihinon vezujuće mesto moglo biti u blizini N<sub>2</sub> centra, na graničnoj površini subjedinica od 49 kDa i PSST subjedinice, veoma blizu membrane (*Sazanov and Hinchliffe, 2006*), što je podržano velikim brojem eksperimenata kojima je utvrđeno da mutacije na ovom mestu utiču na NADH:DQ oksidoredukciju i dejstvo inhibitora (*Hirst, 2010*).

Mehanizam transporta protona je još manje poznat od mehanizma redukcije ubihinona, ali smatra se da je stehiometrija ove reakcije 4H<sup>+</sup>/2e<sup>-</sup>. Postoji više predloženih hipoteza o mestu i mehanizmu transporta protona kroz membranu, od kojih nekoliko povezuje ovaj proces sa redukcijom ubihinola i semihinona (*Hirst, 2010*), dok jedna predlaže da je N<sub>2</sub> centar mesto direktnog sprežanja prenosa protona i elektrona (*Zwicker et al., 2006*). Skorašnji strukturni podaci dobijeni iz dva prokariotska Kompleksa I pokazuju da su membranske subjedinice ND<sub>2</sub>, ND<sub>4</sub> i ND<sub>5</sub> slične subjedinicama iz Mrp familije Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportera, što sugeriše njihovo zajedničko poreklo i sličan mehanizam delovanja, odnosno, verovatno je da su konformacione promene uzrokovane transportom e<sup>-</sup> odgovorne za transmembranski transport H<sup>+</sup> (*Roberts and Hirst, 2012*).

Poznat je veliki broj inhibitora Kompleksa I, od kojih većina deluje na poslednji korak transfera elektrona. Izuzeci su rein i difenileneodonium koji inhibiraju sam ulazak elektrona u elektron transportni lanac (*Miyoshi, 2005*). Najčešće korišćeni inhibitori su rotenon i piericidin A.

Kompleks II – sukcinat reduktaza/dehidrogenaza oksiduje sukcinat do fumarata i prenosi elektrone na ubihinon, redukujući ga do ubihinola. Ovaj enzim predstavlja jedinu direktnu vezu između ciklusa limunske kiseline i elektron-transportnog lanca i jedini je enzim ciklusa limunske kiseline koji je usidren u membranu. Sukcinat dehidrogenaza se sastoji od četiri polipeptidna lanca od kojih dva formiraju hidrofilni, a dva hidrofobni domen (*Kim et al., 2012*). Hidrofilni domen je okrenut prema

mitochondrijalnom matriksu i sastoji se od flavoproteinske subjedinice (Fp) u kojoj je kovalentno vezani FAD deo katalitičkog mesta, i gvožđe-sumporne subjedinice (Ip) koja sadrži tri različita Fe-S centra (2Fe-2S, 4Fe-4S i 3Fe-4S). Primarne sekvence ove dve subjedinice pokazuju visok stepen homologije između vrsta, ukazujući na zajedničko poreklo (*Ackrell, 2000*). Hidrofobni domen se sastoji od dva polipeptida od kojih svaki formira tri transmembranska  $\alpha$ -heliksa. Kristalne strukture ovog domena dobijene iz *E. coli*, ptica i svinje su potvrdili prisustvo hem *b* lociranog između ove dve subjedinice i koordinisanog sa šest histidinskih ostataka i oni zajedno formiraju citohrom *b* (*Kim et al., 2012*).

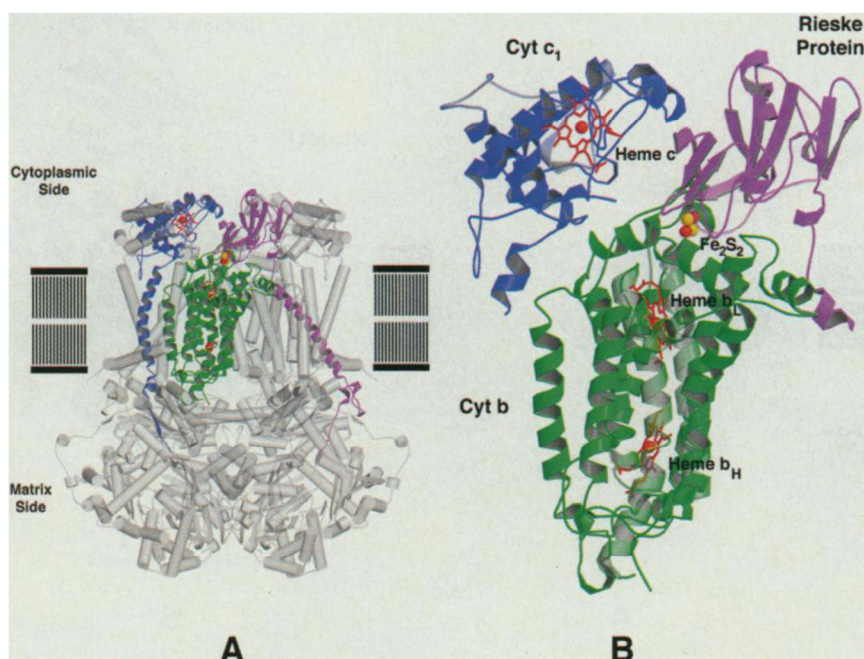
Elektroni dobijeni oksidacijom sukcinata se serijski prenose sa FMN na 2Fe-2S, zatim preko 4Fe-4S do 3Fe-4S, a možda i na hem *b*, međutim, tačna uloga hem *b* u elektron transportnom lancu još uvek nije utvrđena (*Ackrell, 2000*). Nije poznat ni tačan mehanizam redukcije ubihinona, ali je moguće da hem prenosi elektrone sa 3Fe-4S centra na ubihinon. Ubihinon vezujuće mesto mora primiti dva protona za redukciju ubihinona, čime se balansiraju protoni oslobođeni u matriksu po reoksidaciji FADH<sub>2</sub>, odakle se može zaključiti da redukcija ubihinona sukcinatom nije povezana sa prenosom naelektrisanja preko membrane (*Nicholls and Ferguson, 2002*).

Kod anaerobnih bakterija je pronađen enzim menahinol:fumarat oksidoreduktaza koja katalizuje obrnutu reakciju tokom anaerobne respiracije, a zbog sličnosti u strukturi i sekvenci ova dva enzima, veruje se da su evoluirali od jednog pretka (*Kim et al., 2012*).

Inhibitori Kompleksa II su malonat, oxaloacetat, karboksinska i tenoilska trifluoroacetona (*de Paulo Martins, 2011*).

Kompleks III – ubihinol: citohrom *c* oksidoreduktaza (citohrom *bc<sub>1</sub>*) – prenosi elektrone sa ubihinola na citohrom *c*, istovremeno omogućavajući prenos protona sa matriksne na međumembransku stranu membrane, čime doprinosi formiranju elektrohemijskog gradijenta. Mitohondrijalni Kompleks III je dimer koji se može sastojati od 10 subjedinica kod kvasaca (*Zara et al., 2009*) i *Plasmodium*-a (*Barton et al., 2009*), dok je kod sisara pronađeno 11 subjedinica (*Vázquez-Acevedo et al., 1993*). Ključne subjedinice su citohrom *b* sa osam transmembranskih heliksa i dve hem jedinice između heliksa B i D (*b<sub>L</sub>* – hem niskog potencijala i *b<sub>H</sub>* – hem visokog potencijala), u membranu je usidren gvožđe sumporni protein Rieske tipa (2Fe-2S), i

citohrom  $c_1$ , takođe usidren u membranu (Slika 4). Samo ove tri subjedinice imaju bakterijske homologe (Saraste, 1999). Protein Cob, koji sadrži hem  $b_L$  i  $b_H$ , je jedini koji je kodiran mitohondrijalnom DNK, dok su ostale subjedinice kodirane nuklearnom DNK i moraju biti uvezene u mitohondriju (Kim et al. 2012). Opšte je prihvaćena hipoteza da se put elektrona i protona kroz Kompleks III može opisati mehanizmom koji je nazvan »Q ciklus«, a čiju je osnovnu postavku dao Piter Mičel, ali detalji ovog procesa i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni.



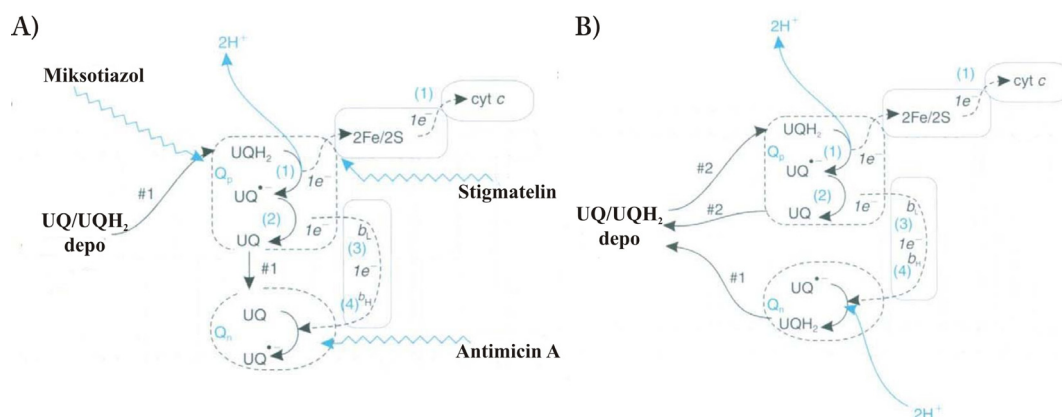
**Slika 4.** Kompleks III. A. Struktura goveđeg mitohondrijalnog Kompleksa III. Protein je dimer, svaki monomer ima 11 subjedinica. Molekulska masa monomera je oko 240 kD. B. Tri subjedinice koje formiraju funkcionalno jezgro enzima: citohrom  $b$  (zeleno), Rieske protein (ljubičasto) i citohrom  $c_1$  (plavo), (Saraste, 1999).

Kompleks III ima dva UQ vezujuća mesta koje formira di-hem polipeptid, od kojih jedno vezuje redukovani kofaktor i nalazi se na strani membrane koja je okrenuta međumembranskom protoru (Qo mesto), dok drugo vezuje oksidovani UQ i nalazi se bliže matriksnoj strani (Qi mesto).  $UQH_2$  se vezuje za Qo mesto i prenosi prvi elektron na Rieske protein odnosno 2Fe-2S centar, dva protona se oslobađaju u međumembranski prostor a na Qo mestu ostaje semihinon  $UQ^{\cdot-}$ , slobodnoradikalaska anjonska vrsta. Drugi elektron se prenosi na hem  $b_L$ , koji se takođe nalazi u blizini međumembranske strane membrane. Elektron koji je prenet na Rieske protein se dalje prenosi na citohrom  $c_1$  a odatle na solubilni citohrom  $c$ . Elektron sa hema  $b_L$  prelazi na hem  $b_H$  a UQ koji, kao i  $UQH_2$  može slobodno da difunduje kroz membranu, na Qi

mesto koje se nalazi u blizini matriksne strane lipidnog dvosloja i tu dolazi do prenosa elektrona sa hema  $b_H$  na UQ pri čemu se formira semihinon  $UQ^{\cdot-}$ . U drugom delu ciklusa, novi UQH<sub>2</sub> molekul se oksiduje na Qo mestu, prenoseći prvi elektron na Rieske protein a drugi na semihinon preko hemova  $b_L$  i  $b_H$ , čime se  $UQ^{\cdot-}$  redukuje do UQH<sub>2</sub>, za šta je neophodno preuzimanje dva protona sa matriksne strane (Slika 5). Ukupna reakcija koju katalizuje Kompleks III je oksidacija jednog UQH<sub>2</sub> do UQ (iako se oksiduju dva molekula UQH<sub>2</sub> jedan molekul UQ se redukuje), oslobađanje 4 H<sup>+</sup> na citoplazmatskoj strani membrane i preuzimanje 2 H<sup>+</sup> sa matriksne strane membrane (Nicholls and Ferguson, 2002). Informacije o mehanizmu redukcije UQH<sub>2</sub> su dobijene još pre dostupnosti 3D struktura, koje su podržale ranija biohemijska ispitivanja, ali je njihovo dobijanje bilo značajno za delimično razjašnjavanje mehanizma račvanja puteva elektrona, koraka koji i dalje dovodi do neslaganja među autorima. Različite strukture Kompleksa III daju različiti položaj globularnog dela Rieske proteina koji može biti ili u blizini Qo mesta ili blizu citohroma  $c_1$ . Prema sekvencijalnom mehanizmu, 2Fe-2S centar u oksidovanom stanju je blizu površine polipeptida i ovakva njegova pozicija je stabilizovana elektrostatičkim interakcijama sa aminokiselinskim ostacima blizu Qo mesta. Redukcija ovog centra slabi interakciju i globularni deo proteina rotira za oko 60° do nove pozicije u blizini citohroma  $c_1$ . Ovaj događaj udaljava 2Fe-2S centar od Qo mesta na oko 20 Å, što onemogućava dalji prenos elektrona među njima. Na taj način drugi elektron može biti prenet jedino na hem  $b_L$ . Nakon oksidacije 2Fe-2S centra, slabi njegov afinitet za citohrom  $c_1$  i on se vraća u prvobitni položaj (Nicholls and Ferguson, 2002; Saraste, 1999; Rich, 2003). Problem kod ovog široko prihvaćenog mehanizma je to što ne postoje eksperimentalni dokazi o postojanju semihinona na Qo mestu. Turmpauer je predložio usaglašeni mehanizam, prema kom bi elektroni istovremeno prelazili sa UQH<sub>2</sub> na Rieske protein i hem  $b_L$  (Turmpower, 2002). Ovaj mehanizam prenosa elektrona nalazi podršku i u činjenici da je neophodno povezivanje termodinamički nepovoljne redukcije 2Fe-2S centra nestabilnim ubihinol/semihinon redoks parom, sa termodinamički povoljnom redukcijom hema  $b_L$  (Hunte et al. 2003).

Antimicin A je najpotentniji inhibitor Qi mesta Kompleksa III (Miyoshi, 2005). Pošto onemogućava transfer elektrona sa Qo na Qi mesto, dolazi do nagomilavanja semihinonskih intermedijera što dalje dovodi do generacije ROS. Miksotiazol i

stigmatelin, takođe inhibitori Kompleksa III, se vezuju za domen ispred  $b_L$  hema ali ne interaguju sa Rieske proteinom pa svojom aktivnošći sprečavaju formiranje ROS (de Paulo Martins et al., 2011).

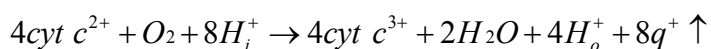


**Slika 5.** A) Transfer elektrona i protona nakon vezivanja prvog molekula UQH<sub>2</sub> na Q<sub>o</sub> mesto koje je u blizini intermembranske strane. Prikazana su i mesta delovanja inhibitora. B) Transfer elektrona i protona nakon vezivanja drugog UQH<sub>2</sub> molekula i redukcija UQ koji je nastao u prvoj reakciji do UQH<sub>2</sub>. (Nicholls and Ferguson, 2002)

Kompleks IV – citohrom c oksidaza (COX) omogućava odvijanje poslednjeg koraka mitohondrijalne respiracije, redukciju molekulskog kiseonika do vode uz istovremenu oksidaciju citohroma *c*. Kao i kod Kompleksa I i III, prenos elektrona je spregnut sa transportom protona sa matriksne na citoplazmatsku stranu unutrašnje mitohondrijalne membrane, što doprinosi formiranju transmembranskog potencijala koji dalje omogućava sintezu ATP-a od ADP-a i neorganskog fosfata od strane enzima ATP sintaza. COX je multimerni enzim koji pripada superfamiliji terminalnih hem-bakar oksidaza, svaki monomer se kod sisara sastoji od 13 subjedinica (Burke and Poyton, 1998), od 11 kod *Saccharomyces cerevisiae* (Gier et al., 1995), 7 kod *Dictyostelium discoideum* (Ludwig et al., 2001) i 4 kod *Paracoccus denitrificans* (Iwata et al., 1995). Kod sisara i kvasaca, tri subjedinice su kodirane mitohondrijalnim, a ostale jedarnim genomom. Ove tri subjedinice (Cox1, Cox2 i Cox3), čine katalitičko jezgro enzima i sadrže metalne prostetičke grupe (de Paulo Martins et al., 2011). Cox 1 je najveća i evolutivno najočuvanija subjedinica, to je hidrofobni protein sa 12 transmembranskih heliksa koji ima ulogu i u redukciji kiseonika i u pumpanju protona, a od kofaktora sadrži hem *a* i *a*<sub>3</sub>, kao i atom bakra Cu<sub>B</sub> (Cu<sup>+</sup>). Hem *a*<sub>3</sub> i Cu<sub>B</sub> predstavljaju binuklearni centar za redukciju O<sub>2</sub>. Subjedinica Cox2 ima dva transmembranska heliksa i sadrži Cu<sub>A</sub> (Cu<sup>2+</sup>-Cu<sup>+</sup>) centar u velikom globularnom

domenu na citoplazmatskoj strani, dok je Cox3 verovatno bitna za stabilnost katalitičkog centra i modulaciju pumpanja protona od strane Cox1 (Kim et al., 2012). Cu<sub>A</sub> učestvuje u jednoelektronskim oksidoredukcijama i njegova osnovna uloga je u primanju elektrona sa citohroma *c* i njihovo prenošenje na hem *a*. Na udaljenosti od svega nekoliko Å od hem *a* nalazi se hem *a*<sub>3</sub>. Ove dve hem jedinice su hemijski identične ali se razlikuju spektroskopski zato što jedno od koordinacionih mesta gvožđa u hemu *a*<sub>3</sub> nije zauzeto aminokiselinskim ostatkom i pretpostavlja se da je to mesto vezivanja molekula kiseonika pre redukcije. Pored hema *a*<sub>3</sub> je Cu<sub>B</sub> koji ima tri histidinska liganda dok četvrta koordinaciona pozicija može biti zauzeta produktima reakcije u nekim fazama redukcije kiseonika (Nicholls and Ferguson, 2002). Jedan od Cu<sub>B</sub> liganada (histidin, H240 u goveđem enzimu) je kovalentno vezan za tirozin Y244, i ovaj histidinsko-tirozinski kompleks može proizvesti radikal koji ima ulogu u redukciji O<sub>2</sub>. Dva hidrofilna kanala, K i D, nazvani tako po konzervisanim ostacima aspartata i lizina, povezuju aktivno mesto enzima sa mitohondrijalnim matriksom (Saraste, 1999)

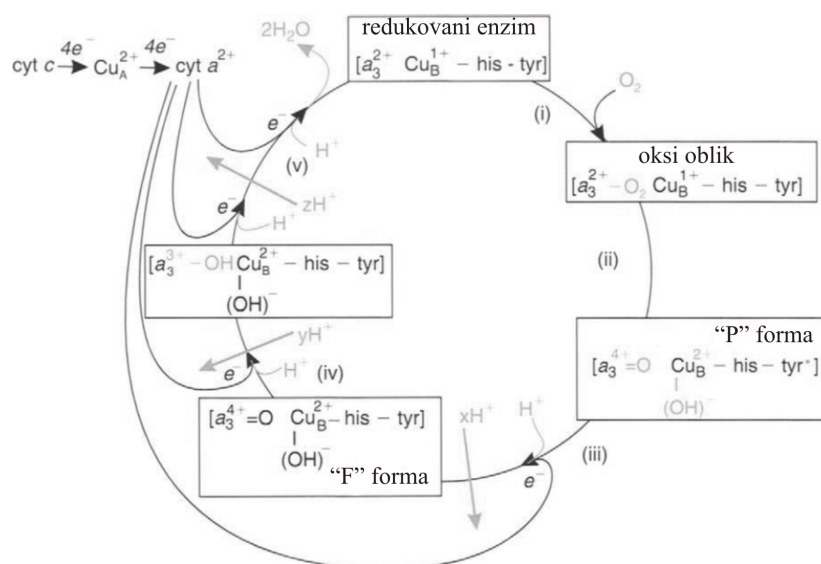
Redukcija kiseonika se obavlja u više faza a slobodna energija reakcije se prevodi u transmembranski potencijal:



gde  $8q^+ \uparrow$  označava prenos 8 pozitivnih naelektrisanja sa unutrašnje, negativno naelektrisane, na spoljašnju, pozitivno naelektrisanu stranu membrane. Četiri elektrona prelaze sa citohroma *c* koji se nalazi na spoljašnjoj, pozitivno naelektrisanjoj strani membrane, do mesta reakcije i kombinuju se sa četiri protona da bi formirali dva molekula H<sub>2</sub>O, a još četiri protona u tom procesu prelazi sa unutrašnje, negativno naelektrisane na spoljašnju, pozitivno naelektrisanu stranu membrane (Konstantinov, 2012).

Na Slici 6 je prikazan najšire prihvaćen mehanizam redukcije kiseonika do vode. Kiseonik se vezuje za hem *a*<sub>3</sub> u redukovanom enzimu (R) čime se dobija prelazni oksi oblik, nakon čega dolazi do raskida O-O veze, hidroksilna grupa se vezuje za Cu<sub>B</sub>, a hem prelazi u feril oblik [Fe<sup>4+</sup>=O]. Ovaj korak zahteva prelaz četiri elektrona na prvobitni O<sub>2</sub> molekul, jedan sa Cu<sub>B</sub>, dva sa hema *a*<sub>3</sub> a za jedan se pretpostavlja da potiče od tirozina vezanog za histidinski ligand bakra. Dobijeni tirozinski radikal nije naelektrisan jer donira proton kiseonikovom atomu koji se vezuje za Cu<sub>B</sub>. U sledećoj fazi, tirozin dobija elektron od hema *a* i preuzima proton sa matriksne strane membrane.

U fazi *iv* kiseonik vezan za hem  $a_3$  se redukuje i dobija se ferihidroksid ( $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ ), što zahteva jedan elektron od hema *a* i jedan proton preuzet sa matriksne strane. Završetak ciklusa zahteva još dva elektrona i dva protona za oslobađanje molekula vode i regeneraciju redukovanog katalitičkog mesta (*Nicholls and Ferguson, 2002*).



**Slika 6.** Pojednostavljeni katalitički ciklus citohrom c oksidaze. Valence metala i ligandi su predstavljeni sivom bojom. Za detaljnije objašnjenje videti tekst (*Nicholls and Ferguson, 2002*)

Nova istraživanja su unela neke izmene u ovu klasičnu šemu (*Belevich & Verkhovsky, 2008; Kaila et al, 2010; Konstantinov, 2012*) prema kojima se  $\text{O}_2$  vezuje za  $a_3$  i formira  $\text{Fe(III)}$ -superoksid kompleks  $[\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^-]$ ,  $\text{Cu}_B$  donira elektron dok proton potiče od obližnjeg molekula vode i nastaje  $\text{Fe(III)}$ -hidroperoksid  $[\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}]$ . Po dodatku drugog protona nastaje dihidroperoksi-intermedijer  $[\text{Fe}^{3+}\text{-O}\sim\text{OH}_2]$  i trenutno dolazi do heterolitičkog raskidanja O-O veze, odnosno, formira se prvi  $\text{H}_2\text{O}$  molekul. Drugi kiseonikov atom, koji je izuzetno jak oksidant, ostaje vezan za hem  $a_3$  i prelazi u jonski oblik  $\text{O}^{2-}$ , uzimajući jedan elektron od  $\text{Fe(III)}$  a drugi od neke obližnje aromatične aminokiseline, verovatno Y244 i formira feril-okso intermedijer  $[\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}]$ . Oba protona neophodna za formiranje prvog molekula vode su verovatno uzeta sa samog kraja K-kanala koji doseže do binuklearnog centra, a egzergona reakcija heterolitičkog raskidanja O-O veze obezbeđuje energiju potrebnu za prenos protona kroz kanal. Ostali protoni se najverovatnije prenose kroz kanal D, ali mehanizam pumpanja protona kroz membranu još uvek nije u potpunosti razjašnjen.



Za svaka dva elektrona koja prolaze kroz Kompleks IV, četiri protona se uzimaju sa matriksne strane, dok se dva oslobađaju na citosolnoj strani membrane. Kako Kompleks III za isti broj elektrona uzima dva protona sa matriksne strane a oslobađa četiri sa citoplazmatske, kombinovana aktivnost ova dva enzima otklanja njihov pojedinačni disbalans u transportu protona. Ukupna stehiometrija transporta protona sa ubihinola na kiseonik je  $6\text{H}^+/2\text{e}^-$ , a kada elektroni potiču sa NADH i prolaze Kompleks I koji prenosi četiri protona po paru elektrona, ukupna stehiometrija transporta protona je  $10\text{H}^+/2\text{e}^-$  (Nicholls and Ferguson, 2002).

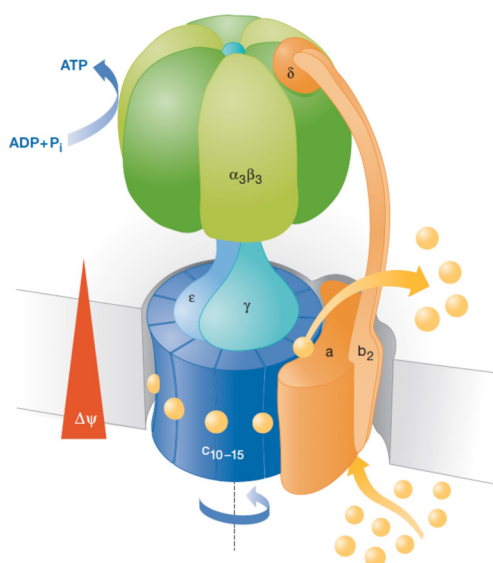
Inhibitori Kompleksa IV su cijanid, azid, azot-oksidi i ugljen-monoksidi koji se svi vezuju za hem  $a_3$ .

## 1.2. ATP sintaza

Mitohondrijalna ATP sintaza ( $F_1F_0$  ATPaza, Kompleks V) koja spada u ATP sintaze F tipa, je mali rotacioni motor, funkcionalno reverzibilni enzim koji može da sintetishe ATP koristeći elektrohemijski gradijent protona kroz membranu, ili da hidrolizuje ATP prenoseći protone uz gradijent. Ovaj enzim je visoko konzerviran od bakterija do ljudi i sastavljen je iz dva velika domena: solubilnog kompleksa  $F_1$  koji se sastoji iz subjedinica  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  i membranskog kompleksa  $F_0$  koji se sastoji iz subjedinica  $ab_2c_{10-15}$ . Membranski kompleks sadrži protonski kanal dok je  $F_1$  kompleks katalitički. U sintetskom režimu,  $F_0$  motor konvertuje elektrohemijski gradijent protona u torzioni momenat koji primorava  $F_1$  motor da sintetishe ATP, dok u hidrolitičkom modu  $F_1$  konvertuje hemijsku energiju hidrolize ATP-a u torzioni moment zahvaljujući kom se  $F_0$  ponaša kao protonska pumpa. Solubilna ATP-aza ( $F_1$ ) se može odvojiti od ostatka enzima i tada obavlja samo hidrolitičku funkciju.

$F_1$  motor se može predstaviti kao heksamer naizmeničnih  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinica koje su poređane oko centralne  $\gamma$  subjedinice koja je u vidu namotanog kalema (Slika 7). Ovaj kompleks je u unutrašnjosti asimetričan zbog različite interakcije centralne  $\gamma$  subjedinice sa katalitičkim  $\beta$  subjedinicama čime su omogućene njihove različite konformacije i afiniteti katalitičkih mesta za različite nukleotide. Veliki deo  $F_0$  kompleksa se sastoji od prstenaste konstrukcije izgrađene od  $c$  subjedinica, čija stehiometrija varira u zavisnosti od vrste. Prstenovi od 10 monomera su nađeni kod kvasaca (Stock et al., 1999) i *E. coli* (Jiang et al., 2001), kod bakterija *Ilyobacter*

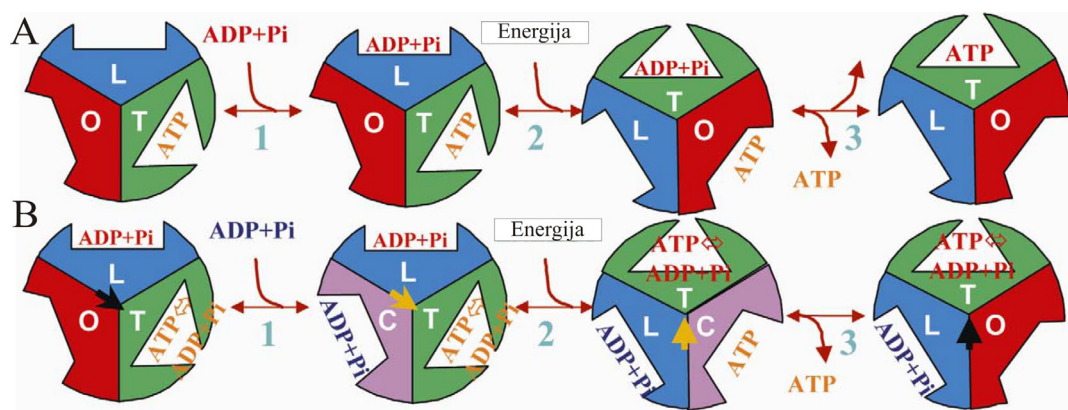
*tartaricus* (Stahlberg et al., 2001) i *Propionigenium modestum* (Meier et al., 2003) imaju 11, u kloroplastima 14 (Seelert et al., 2000), a kod cijanobakterije *Spirulina platensis* 15 monomera (Pogoryelov et al., 2005). Broj subjedinica u svakom prstenu takođe označava broj jona koji se transportuje kroz membranu tokom svakog katalitičkog ciklusa ATP-sintaze, pa kako F<sub>1</sub> motor ima tri katalitička mesta i može da sintetiše tri molekula ATP-a u svakom ciklusu, varijacije u broju c-subjedinica odnosno proton vezujućih mesta dovode i do razlika u stehiometriji H<sup>+</sup>/ATP (Dimroth et al., 2006). Prsten sastavljen od c subjedinica je u dodiru sa jednom a i dve b subjedinice, a translokacija protona se dešava na mestu dodira a i c subjedinice.



**Slika 7.** Struktura i funkcija bakterijske ATP sintaze u biološkim membranama. F<sub>1</sub> ( $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ) i F<sub>0</sub> ( $ab_2c_{10-15}$ ) su motori koji razmenjuju energiju rotacionim sprežanjem. Rotorske subjedinice su prikazane plavom bojom dok su statorske narandžaste i zelene. Tokom sinteze ATP-a protoni (narandžasto) prolaze kroz F<sub>0</sub> iz periplazme u citoplazmu indukujući rotaciju koja omogućava F<sub>1</sub> motoru sintezu ATP-a (Dimroth et al., 2006).

Strukturno,  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinice su slične i obe mogu vezivati nukleotide ali samo  $\beta$  imaju katalitičku ulogu (Saraste, 1999), i mogu imati barem četiri različite konformacije: T (*tight*-čvrsta), L (*loose*-opuštena), O (*open*-otvorena) i C (*closed*-zatvorena). Mehanizam sinteze ATP-a je prvi predložio Pol Bojer (Voet & Voet, 1995) i taj mehanizam je uzimao u obzir tri konformaciona stanja, T, L i O, pri čemu bi samo dve  $\beta$  subjedinice mogle biti zauzete istovremeno. Energija oslobođena translokacijom protona je korišćena za interkonverziju ovih stanja i oslobađanje sintetisanog molekula u citoplazmu ili matriks, fosfoanhidridna veza bi se sintetisala samo u T stanju a do oslobađanja molekula ATP bi dolazilo samo u O stanju (Slika 8a). Kasniji eksperimenti

na ovom polju su pokazali da katalitički ciklus zahteva da sva tri mesta budu zauzeta (Lobau *et al.* 1997; 1998; Weber and Senior 2001), što je dovelo do modifikacija modela. Bianchet i saradnici uvode četvrto konformaciono stanje C (Bianchet *et al.*, 2000). Prema njihovoj šemi (Slika 8b), vezivanje ADP-a i Pi za subjedinicu  $\beta$  u O stanju dovodi do lokalne konformacione promene i ona prelazi u C stanje. Kada su subjedinice u T, L i C konformacijama, energetski zahtevna konformaciona promena koja se dešava pri rotaciji  $\gamma$  subjedinice je minimalna, jer su ove tri konformacije međusobno jako slične, a različite od O konformacije. Pored toga, formiranje ili raskidanje fosfatne veze se ne dešava istovremeno sa velikim konformacionim promenama već dok enzim pauzira čekajući energetski zahtevnu konformacionu promenu (Leyva *et al.*, 2003)



**Slika 8.** A) Mehanizam dva nukleotida, svaki  $\alpha/\beta$  par je prikazan kao sektor od  $120^\circ$ . Rotacija  $\gamma$  subjedinice omogućava konformacionu promenu u koraku 2. B) Mehanizam dva i tri nukleotida. Kada se  $\beta$  subjedinica zatvori, dolazi do male promene u poziciji  $\gamma$  subjedinice što je prikazano strelicama u crnoj i oker boji. Kao i u prethodnom slučaju, rotacija  $\gamma$  subjedinice omogućava konformacionu promenu u koraku 2 (Leyva *et al.*, 2003).

### 1.3. Alternativne komponente elektron-transportnog lanca

Elektron-transportni sistemi mitohondrija sisara, naročito jetre i srca, su najbolje proučeni na biohemijskom nivou, uglavnom zato što je dobijanje velikog broja mitohondrija iz ovih uzoraka relativno jednostavno. Zbog ovoga su u klasičnim razmatranjima elektron-transportnog lanca često zanemarene razlike nađene u drugim grupama organizama.

Činjenica je da kompleksnost respiratornog sistema raste od životinja preko biljaka pa do gljiva i nekih protozoa, koje, pored klasičnih komponenata sadrže i alternativne, od kojih su najčešće alternativne NADH dehidrogenaze i alternativne oksidaze.

### 1.3.1. Alternativne NAD(P)H:ubihinon oksidoreduktaze (dehidrogenaze)

Do sada se zna za tri grupe NADH:ubihinon oksidoreduktaza, u prvu spadaju mitohondrijalni Kompleks I (NADH:ubihinon oksidoreduktaza koja transportuje protone) i bakterijska NDH-1, u drugu NADH:ubihinon oksidoreduktaza koja transportuje  $\text{Na}^+$  i nađena je samo u bakterijama, a u treću NDH-2, alternativne NAD(P)H:ubihinon oksidoreduktaze (*de Paulo Martins et al., 2011*). Ovi enzimi katalizuju istu reakciju kao Kompleks I ali ne doprinose transportu protona kroz membranu, pa se energija dobijena transportom elektrona gubi u obliku toplote (*Siedow and Umbach, 1995*), imaju samo jednu prostetičku grupu (FAD) i manji afinitet za NADH od Kompleksa I (*Joseph-Horne et al., 2001*). Osim toga, sastoje se od jednog polipeptida dok Kompleks I može sadržati preko 30 subjedinica, nisu osjetljive na rotenon ali su inhibirane flavonima. Mitohondrije biljaka mogu sadržati i do četiri ova enzima koji pokazuju različitu kinetiku i zahteve za  $\text{Ca}^{2+}$ . Krompir (*Solanum tuberosum*) ima dva ovakva enzima, jedan na matriksnoj (NDA) i jedan na citoplazmatskoj strani (NDB) unutrašnje mitohondrijalne membrane, a NDB sadrži i  $\text{Ca}^{2+}$  vezujući motiv (*Kerscher, 2000*). Unutrašnja odnosno matriksna NAD(P)H dehidrogenaza može da bude u kompeticiji sa Kompleksom I u procesu oksidacije NADH, a spoljašnja odnosno citoplazmatska može da oksiduje i NADH i NADPH nastao u citosolu.

#### NADH dehidrogenaze kod gljiva

U mitohondrijama gljiva, situacija je još komplikovanija. Tako respiratorni lanac *Saccharomyces cerevisie* ne poseduje Kompleks 1, a umesto njega su prisutne tri NADH dehidrogenaze, jedna unutrašnja (Ndi 1) okrenuta ka matriksu i dve spoljašnje (Nde 1 i Nde 2) okrenute ka međumembranskom prostoru. *Neurospora crassa* poseduje i unutrašnju i spoljašnju NADH dehidrogenazu pri čemu spoljašnja ima  $\text{Ca}^{2+}$  vezujući domen što ukazuje na regulaciju ovog enzima kalcijumom (*Joseph-Horne et al., 2001*). *Candida albicans*, oralni patogen, takođe poseduje obe alternativne dehidrogenaze.

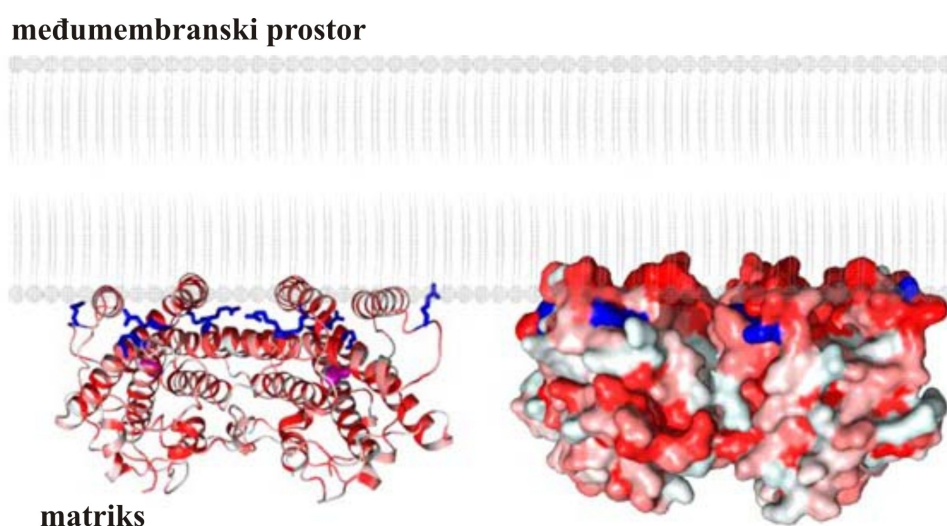
Samo je jedna unutrašnja, kao i kod kvasca *Yarrowia lipolytica*, ali se ne isključuje mogućnost postojanja nekoliko spoljašnjih dehidrogenaza kao kod *S. cerevisiae* (Helmerhorst et al., 2002). Bazidiomiceta *Ustilago maydis*, patogen kukuruza, ima samo jednu alternativnu NADH dehidrogenazu, spoljašnju NDE-2, koja podjednako učestvuje u respiratornoj aktivnosti kao i Kompleks I i nije modulirana kalcijumom (Juárez et al., 2004).

### 1.3.2. Alternativne ubihinol oksidaze (AOX)

Cijanid neosetljive alternativne oksidaze su terminalne ubihinon oksidaze koje direktno prenose elektrone sa ubihinola na kiseonik, redukujući ga do vode. Pojava cijanid neosetljive respiracije (CRR – *cyanide resistant respiration*) je otkrivena još početkom 20-og veka kao specifična pojava kod termogenih biljaka tokom cvetanja a tek kasnije je zaključeno da zapravo predstavlja deo mehanizma koji reguliše balans energije i ugljenika kao odgovor na promene u okolini (Vanlerberghe and McIntosh, 1997). Alternativne oksidaze omogućavaju zaobilazanje Kompleksa III i IV u elektron-transportnom lancu zbog čega se snižava transmembranski potencijal unutrašnje mitohondrijalne membrane, što naravno dovodi do smanjene produkcije ATP-a. Nisu osetljive na antimicin A i cijanid ali mogu biti inhibirane hidroksamidom salicilne kiseline (SHAM) ili n-propil galatom. Prisustvo alternativne oksidaze je potvrđeno kod svih viših biljaka (Albury et al. 2009), nekih algi (Tischner et al. 2004), kvasaca i drugih gljiva (Veiga et al. 2003), ameba (Jarmuszkiwicz et al. 2002), bakterija (Stenmark and Nordlund 2003) pa i nekih životinjskih vrsta (McDonald and Vanlerberghe 2006; McDonald et al. 2009)

Alternativne oksidaze spadaju u familiju karboksilatnih proteina sa dva nehemaska gvožđa u katalitičkom centru, koja uključuje metan monooksigenazu (MMO), R2 subjedinicu ribonukleotid reduktaze,  $\Delta 9$  desaturazu, rubreritrin, hemeritrin i feritine (Albury et al., 2009). Kod svih ovih enzima, aktivno mesto se nalazi u snopiću koji grade četiri alfa heliksa, a većina sadrži dva konzervisana E-X-X-H motiva, pri čemu glutamat (E) i histidin (H) koordinišu atome gvožđa (Siedow et al., 1995; Moore et al., 1995; Albury et al., 2009). Prvi model alternativne oksidaze koji su predložili Umbah i Sidou (Moore et al., 1995) zasnovan je na tada dostupnim cDNK sekvencama iz biljaka. Prema njihovom modelu, AOX je membranski homodimer sa dva nehemaska

gvožđa od približno 32 kDa, sa dva transmembranska  $\alpha$  heliksa i jednim  $\alpha$  helksom koji ih spaja i koji je lociran na međumembranskoj strani unutrašnje mitohondrijalne membrane (*Juszczuk and Rychter 2003*). Sa porastom broja dostupnih cDNK sekvenci model su izmenili Anderson i Nordlund (*1999*) i danas se smatra da enzim nije transmembranski već globularan i zalazi u jednu polovinu lipidnog dvosloja i to onu sa matriksne strane (Slika 9). Ovaj model podržavaju i eksperimenti usmerene mutageneze (*Ajayi et al., 2002; Albury et al., 2002*), ekspresije AOX-a *Sauromatum guttatum* u *Schizosaccharomyces pombe* kao i ekspresije tripanozomalne alternativne oksidaze (TAO) u hem-deficitarnim bakterijskim sistemima (*Nakamura et al., 2005*). Prve dokaze o prisustvu gvožđa u AOX pružili su Bertold i saradnici (*2002*) u EPR studiji koja je pokazala signal karakterističan za binuklearni Fe centar mešovite valence [Fe(II)/Fe(III)] što sugerise da između atoma gvožđa postoji hidroksidni most. Mutacijom pretpostavljenih liganada gvožđa dolazi do nestanka signala (*Berthold et al., 2002*). Smatra se da su vezujuća mesta za hinon i kiseonik u blizini četvoroheliksno snopića, ali utvrđivanje detalja o strukturi i mehanizmu četvoroelektronske redukcije ovih enzima je otežano velikim teškoćama u prečišćavanju proteina i zbog čega je prva kristalna struktura ovog proteina objavljena tek ove godine i to za TAO - tripanozomalnu alternativnu oksidazu (*Shiba et al., 2013*) (Slika 9).



**Slika 9.** Struktura tripanozomalne alternativne oksidaze (TAO). Predloženi model vezivanja dimera TAO za membranu po kom je hidrofobni region dimera okrenut membrani. Atomi gvožđa su prikazani u modelu levo ljubičastom bojom (*Shiba et al., 2013*)

Aktivnost alternativne oksidaze kod biljaka je regulisana i transkripcionim i post-translacionim mehanizmima. Širok spektar stresnih uslova kao što su hlađenje, suša, patogeni i oštećenja, indukuju pojavu ili povećanje aktivnosti ovog enzima. Njegova ekspresija je povećana i u prisustvu respiratornih inhibitora kao što su antimicin A i cijanid (*Vanlerberghe and McIntosh, 1996*), a Vagner i Krab (*1995*) su predložili da reaktivne kiseonične vrste i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mogu biti uključene u indukciju ekspresije AOX-a. Post-translaciona regulacija se ostvaruje preko konzerviranih cisteinskih ostataka na N-kraju polipeptidnog lanca koji zalazi u matriks. Redukcija intermolekularne disulfidne veze rezultuje aktivnijim, nekovalentno vezanim dimerom (*Umbach and Siedow, 1993*). Dodatna aktivacija redukovane AOX se postiže dodavanjem  $\alpha$ -keto kiselina, naročito piruvata. Mehanizam aktivacije  $\alpha$ -keto kiselinama uključuje već pomenute cisteinske ostatke (C122 i C172 kod *S. guttatum*), pri čemu prvi cistein učestvuje u vezivanju kiseline i njenoj aktivaciji, dok drugi ima ulogu u manje razjašnjenom mehanizmu same aktivacije  $\alpha$ -keto kiselina (*Vanlerberghe et al., 1998; Umbach et al., 2002*). Geni koji kontrolišu ekspresiju AOX se kod biljaka mogu podeliti u dve grupe (*Considine et al., 2002*): Aox1 je prisutan kod svih angiospermi, dok je Aox2 pronađen samo kod dikotila i pretpostavlja se da Aox1 indukuju stresni uslovi dok Aox2 ima ili konstitutivnu ekspresiju ili mu se ekspresija menja u zavisnosti od faze razvića.

#### Alternativna oksidaza kod gljiva

Za razliku od biljaka kod kojih je prisustvo AOX potvrđeno kod svih ispitanih vrsta, alternativna oksidaza nije nađena kod kvasaca koji imaju mogućnost aerobne oksidacije etanola (*Joseph-Horne et al., 2001; Joseph-Horne & Hollomon, 2000*). Ovo ukazuje da su se kod kvasaca razvile dve strategije za fino regulisanje energije dobijene glikolizom. Maksimalna produkcija energije se dobija citohromskim putem, a može biti redukovana ili skretanjem puta ugljenika na fermentaciju, ili na alternativnu oksidazu kod ne-fermentativnih kvasaca (*Veiga et al., 2003*). Pored toga, kod gljiva ekspresija AOX može biti konstitutivna i/ili indukovana. Nađeno je da je konstitutivna kod *Candida parapsilosis* (*Milani et al., 2001*), *Aspergillus niger* (*Kirimura et al., 1987*), *Gaeumannomyces graminis* (*Joseph-Horne et al., 1998*), a indukuje se pod stresnim uslovima kao što je na primer blokiranje osnovnog respiratornog lanca antimicinom A kod *Candida albicans* (*Helmerhorst et al., 2005*), *Neurospora crassa*, *Hansenula*

*anomala* (Sakajo et al., 1993) i *Magnaporthe grisea* (Yukioka et al., 1998). Kod nekih gljiva, ekspresija AOX se menja u zavisnosti od faze razvića ili starosti, na primer kod *Botrytis cinerea* raste nakon klijanja spora (Joseph-Horne et al., 2001), a kod *Pichia pastoris* tokom rasta ali ne i u kasnoj stacionarnoj fazi (Kern et al., 2007).

Kod gljiva, AOX je prisutna kao monomer (Veiga et al., 2003) i homologija u aminokiselinskoj sekvenci između biljaka i gljiva manja je od 38% (Joseph-Horne & Hollomon, 2000), ali je visoka u C-terminalnom delu (Albury et al., 2009). Postoje indirektni dokazi da Fe učestvuje u formiranju aktivnog mesta, a i inhibitori su isti kao kod biljne AOX, što upućuje na zaključak da je aktivno mesto u osnovi isto, dva para heliksa koji zajedno obrazuju četvoroheliksni snopić. U svakom paru prisutan je ključni E-X-X-H motiv, koji obezbeđuje funkcionalne grupe za koordinaciju gvožđa (Joseph-Horne et al., 2001). Kod gljiva, samo jedan gen kodira alternativnu oksidazu, a *C. albicans* je jedini izuzetak sa dva gena, od kojih jedan ima konstitutivnu ekspresiju dok se drugi indukuje u uslovima stresa (Huh and Kang, 2001).

Obzirom na monomerni oblik AOX, regulacija aktivnosti ovog enzima je sasvim drugačija nego kod biljaka. Primećen je jak stimulatorni efekat purinskih nukleotida i to ADP-a, AMP-a i GDP-a, ali ne i ATP-a, adenzina i cAMP-a (Joseph-Horne & Hollomon, 2000; Siedow & Umbach, 2000).

#### Uloge i raznovrsnost alternativnih oksidaza

Primećene su i razlike u pretpostavljenim funkcijama AOX-a kod biljaka i gljiva. Kod biljaka ima puno dokaza o ulozi AOX-a u smanjenju nastanka mitohondrijalnih reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) (Maxwell et al., 1999; Yip and Vanlerberghe, 2001), dok kod gljiva ova funkcija do sada nije dokazana (Veiga et al., 2003a). Naprotiv, kod *Podospora anserina* povećana ekspresija AOX-a je povezana sa povećanjem ROS (Lorin et al., 2001). Još jedna hipoteza o ulozi ovog enzima je da on, zbog nemogućnosti učestvovanja u formiranju transmembranskog potencijala, funkcioniše kao mehanizam „skretanja“ elektrona u uslovima zasićenja citohromskog lanca čime omogućava dalje odvijanje ciklusa limunske kiseline uz minimum sinteze ATP-a (Lambers, 1985; Simons and Lambers, 1999). Kod gljiva se ova funkcija ne može smatrati sveprisutnom jer postoje dokazi da kod više vrsta AOX ima podjednako bitnu ulogu u održavanju transmembranskog potencijala i sintezi ATP-a kao i COX (Mizutani et al., 1996; Veiga et al., 2003a; Joseph-Horne et al., 1998, 2001). Pored



toga, neke gljive poseduju i dodatne terminalne oksidaze. Kod *Kluyveromyces lactis* (Ferrero et al., 1981) i *Schwanniomyces castellii* (Claisse et al., 1991) je pronađena cijanid i SHAM neosetljiva, ali azid osetljiva respiracija. Čitav sekundarni respiratorni lanac, neosetljiv na antimicin A ali inhibiran amitalom, SHAM-om, miksotiazolom i cijanidom je pronađen kod *Candida parapsilosis* i *C. albicans* (Guerin and Camougrand, 1994; Ruy et al., 2006). Dve terminalne oksidaze neosetljive na SHAM i azid su pronađene kod *Debaryomyces hansenii* (Shelemekh et al., 2006), a kod *Gaeumanomyces graminis* terminalna oksidaza osetljiva na antimicin A ali ne i na cijanid (Joseph-Horne and Hollomon, 2000).

I pored velike raznovrsnosti, respiracija je kod gljiva istražena daleko manje nego kod biljaka, a jedno od najslabije istraženih područja je regulacija cijanid neosetljive respiracije (CRR) tokom razvića. Podaci koji postoje su uglavnom samo kvalitativni. Kod *B. cinerea*, respiracija kulture stare 24 h je osetljiva samo na cijanid (Tamura et al., 1999), dok u kulturama starim 48 h postaje osetljiva na inhibitore AOX-a ali ne i na inhibitore Kompleksa III (Joseph-Horne et al., 2001). Kod *P. membranifaciens* (Veiga et al., 2003b) i *Yarrowia lipolytica* (Medentsev & Akimenko, 1999) CRR je potvrđena na prelazu između eksponencijalne i stacionarne faze rasta, dok je kod *Debaryomyces occidentalis* (Zimmer et al., 1997), *C. parapsilosis* (Milani et al., 2001) i *C. albicans* (Shepherd et al., 1978) prisutna u svim testiranim fazama rasta. Do sada postoje samo dve detaljne i kvantitativne studije aktivnosti AOX tokom razvića. Kod *Ustilago maydis*, zapažen je nagli rast aktivnosti na početku eksponencijalne faze rasta koji dostiže maksimum na oko 24 h, a zatim polako opada (Juárez et al., 2006). Za *Aspergillus niger* je pokazano da CRR raste tokom razvića, a naročito u kasnoj logaritamskoj fazi (Kirimura et al., 1987).

#### **1.4. Polifosfati i njihova uloga u energetsom metabolizmu**

Sve žive ćelije, pa tako i gljive, usvajaju neorganske fosfate i ugrađuju ih u osnovne ćelijske konstituente kao što su nukleinske kiseline, fosfolipidi ili proteini, a veoma su bitni i u procesu regulacije aktivnosti enzima putem fosforilacije. Značajan deo fosfata u ćelijama nalazi se u obliku polifosfata. Neorganski polifosfati (PP<sub>n</sub>) su linearni polimeri izgrađeni od nekoliko desetina do više stotina ortofosfatnih ostataka koji su međusobno povezani visokoenergetskim fosfoanhidridnim vezama poput onih u

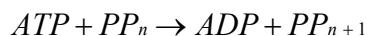
ATP-u. Smatra se da su PPn veoma stara jedinjenja, nastala još u abiotičkoj evoluciji, na šta ukazuje njihovo prisustvo u vulkanskim stenama (*Kornberg, 1995*), a postoje dokazi da su imali važnu ulogu u abiotičkoj sintezi nukleinskih kiselina i drugih makromolekula (*Kulaev, 1979; Kulaev and Vagabov, 1983*), kao i da su bili nosioci energetskog metabolizma pre pojave ATP-a (*Kulaev & Vagabov, 1983; Keefe & Miller, 1996*).

Metabolizam polifosfata je najbolje izučen kod prokariota, gde igraju značajnu ulogu kao rezerve fosfata i energije, kao i u povećanju otpornosti ćelija na nepovoljne uslove spoljašnje sredine i u regulaciji velikog broja biohemijskih procesa (*Kulaev and Kulakovskaya, 2000*). Kod prokariota se polifosfati javljaju u citoplazmi, ćelijskoj membrani, periplazmi i ćelijskom omotaču. U citoplazmi bakterija su prvi put uočeni kao »volutinske granule« pre više od 100 godina i verovalo se da se njihova pojava može koristiti kao dijagnostički kriterijum patogenih bakterija kao što je *Corynebacterium diphtheriae* (*Kornberg et al., 1999*) ali su kasnije nađeni u ćelijama svih grupa živih organizama, mada u prilično različitim količinama. Među eukariotima, polifosfati su najzastupljeniji kod gljiva. Postoji vrlo malo raspoloživih podataka o prisustvu PPn kod biljaka pa se smatra da ova jedinjenja ne igraju značajnu ulogu u biljnim ćelijama (*Vagabov & Kulaev, 1964; Valikhanov & Sagdullaev, 1979; Igamnazarov & Valikhanov, 1980; Valikhanov et al., 1980*), međutim, pronadjeni su u velikom broju animalnih ćelijskih kultura i tkiva gde se nalaze u niskim koncentracijama sa rasponom dužina od 100 do 1000 ortofosfatnih ostataka (*Kornberg., 1995*).

Osnovna razlika između prokariota i eukariota je daleko bolje razvijena kompartmentalizacija biohemijskih procesa kod eukariota, od kojih se većina odigrava u specijalizovanim organelama. Distribucija polifosfata u različitim ćelijskim odeljcima je najbolje proučena kod kvasca *S. cerevisiae*. Citosolna frakcija može sadržati od 10% (*Okorokov et al., 1980*) do 70% (*Kulaev et al., 1999*) PPn prisutnih u ćeliji, što zavisi od starosti kulture i uslova gajenja. Deo citoplazmatičnih polifosfata čini komponentu volutinskih granula, i u njima je sadržano oko 14% ukupnih PPn ćelije (*Jacobson et al., 1982*). Podaci o sadržaju PPn u vakuolama kvasca su kontradiktorni, zbog korišćenja različitih sojeva i uslova gajenja, ali postoji konsenzus da su vakuolarni PPn kratki. Kada se *S. cerevisiae* gaji na minimalnom medijumu sa argininom kao jedinim izvorom

azota, vakuole sadrže najveći deo ćelijskih PPn (*Durr et al., 1979; Urech et al., 1978*). Vakuole *S. carlsbergensis* akumuliraju sedam puta više PPn od citosola kada su im dostupni glukoza, fosfat i K<sup>+</sup>, a deset puta više kada im je dostupan Mn<sup>2+</sup> (*Lichko et al., 1982*). Novije studije, međutim, pokazuju da je sadržaj PPn u vakuoli *S. cerevisiae* daleko manji, svega oko 15% ukupnih ćelijskih PPn (*Rao et al., 2009*). Izolovane mitohondrije *S. cerevisiae* imaju kratke lance PPn (manje od 15 ortofosfatnih ostataka), čija koncentracija zavisi od nivoa fosfata u medijumu (*Pestov et al., 2004*) a mitohondrijalna frakcija *D. discoideum* dobijena diferencijalnim centrifugiranjem na saharoznom gradijentu takođe ima kratkolančane PPn (*Rao et al., 2009*). Značajne količine polifosfata se mogu naći u ćelijskim omotačima nižih eukariota, pa tako ćelijski omotač kvasca sadrži preko 20% ukupnih PPn (*Ivanov et al., 1996*), a formiraju i komplekse sa nukleinskim kiselinama u jedru (*Kulaev, 1979; Kulaev and Vagabov, 1983*).

Enzimi uključeni u biosintezu i degradaciju polifosfata se razlikuju kod prokariota i eukariota. Polifosfat kinaza, PPK1, je kod prokariota visoko konzervisan i najproučavaniji enzim polifosfatnog metabolizma koji katalizuje transfer terminalnog fosfata sa ATP-a na PPn u reakciji:



Ova reakcija je reverzibilna ali je ravnoteža pomerenjena prema sintezi PPn.

Većina bakterija poseduje i PPK2, enzim koji favorizuje sintezu nukleozid trifosfata iz nukleozid difosfata i PPn (*Rao et al., 2009*). PPK1 homologe kod eukariota su do sada pronađeni samo kod dve vrste: *D. discoideum* (DdPPK1) i *Candida humicola* čiji enzim ima najviše sličnosti sa PPK1 *E. coli* (*McGrath et al., 2005*). Dugo se verovalo da je u na vakuolarnoj membrani *S. cerevisiae* pronađen enzim koji bi bio homolog PPK ali se ispostavilo da je u pitanju Ap<sub>4</sub> fosforilaza (*Booth and Guidotti, 1995*) koja u kombinaciji sa polifosfatazom i adenilat ciklazom može da katalizuje sumarnu reakciju sinteze ATP-a.

Prokarioti poseduju niz enzima za hidrolizu PPn uključenih u energetski metabolizam koji kod eukariota nisu pronađeni. Među njima su poliP:glukoza-6-fosfotransferaza (*Hsieh et al., 1993*), PoliP:NAD-fosfotransferaza (*Murata et al., 1979*) i PoliP:adenozin monofosfat fosfotransferaza (*Bontig et al., 1991*). Jedan od važnijih enzima polifosfatnog metabolizma je egzopolifosfataza, enzim prisutan kod prokariota i

eukariota koji hidrolizuje krajnje ortofosfatne (Pi) ostatke PPn lanca. Kod mikroorganizama je ova grupa enzima veoma raznovrsna i čak i kod prokariota postoji više različitih formi, a kod eukariota ih karakteriše izrazita kompartmentalizacija (Lichko et al., 2003). Egzopolifosfataze citoplazme, mitohondrijalnog matriksa i ćelijskog omotača (Andreeva et al., 1993, 1998; Wurst & Kronberg, 1994) su proizvod aktivnosti istog gena, dok su druga citoplazmatična egzopolifosfataza (Lichko et al., 2002; Andreeva et al., 2001) i egzopolifosfataze vakuole (Andreeva et al., 1998a), jedra (Lichko et al., 1996) i mitohondrijalne membrane (Lichko et al., 1998) zasebni genski produkti. Svi ovi enzimi su strukturno i funkcionalno jasno definisani i razlikuju se od egzopolifosfataza nađenih kod prokariota. Endopolifosfataze do sada nisu pronađene kod prokariota (Kornberg, 1995), a kod eukariota one raskidaju dugačke PPn lance. Enzim izolovan iz kvasca zahteva jone metala kao kofaktore, pri čemu je  $Mn^{2+}$  aktivniji od  $Mg^{2+}$ . Endopolifosfataze su lokalizovane u vakuolama (Kumble and Kornberg, 1996).

Kod brojnih organizama, uključujući i gljive, jedna od osnovnih funkcija polifosfata je skladištenje energije (Kornberg 1995). Hidrolizom PPn oslobađa se velika količina energije akumulirane u fosfoanhidridnim vezama. Međutim, niz enzima koji su uključeni u energetske metabolizam, a koriste PPn kao supstrat kod prokariota (glukozo-6-kinaza, AMP-fosfotransferaza i NAD-fosfotransferaza), nisu nađeni kod kvasaca (Kulaev & Kulakovskaya, 2000). Uloga PPn kao rezervoara energije je kod gljiva veoma značajna. Tako u toku eksponencijalne faze raste kvasca u medijumu sa dovoljno glukoze i fosfata dolazi do aktivne sinteze PPn, ali i do drastičnog skraćivanja dužine lanca, što ukazuje da je energija dobijena hidrolizom PPn neophodna za održavanje velike brzine rasta (Vagabov et al. 1998). Pored toga, u nedostatku glukoze u medijumu, iako je koncentracija fosfata još dovoljna, dolazi do intenzivne hidrolize PPn, što ukazuje na njihovu ulogu kao rezerve energije (Vagabov et al. 1998).  $^{31}P$  NMR spektroskopija je kod gljive *Phycomyces blakesleeanus* pokazala pad količine polifosfata uz porast količine fosfata između 28 i 32 h razvića (Živić et al., 2007). Ova pojava je praćena porastom nivoa ATP-a, pa se može pretpostaviti da se u toj fazi razvića polifosfati koriste kao izvor energije. Ispitivanje vakuole kvasaca  $^{31}P$  NMR spektroskopijom je pokazalo da PPn mogu biti direktno povezani sa sintezom ATP-a (Beauvoit et al., 1989).

Uloga PPn kao rezerve fosfata kod gljiva nije ništa manja nego kod prokariota. Prilikom prebacivanja kulture kvasca u medijum bez fosfata dolazi do pada koncentracije PPn u vakuoli, citoplazmi i ćelijskoj membrani za red veličine. Najznačajniju ulogu rezerve fosfata imaju PPn u vakuoli na šta ukazuju podaci da posle 7 sati Pi gladovanja nivo PPn u vakuoli pada za čak 85% (Kulaev *et al.*, 1999), dok mutant kvasca koji nema vakuolu ne može da živi na medijumu bez fosfata (Shirahama *et al.*, 1996).

Značajnu ulogu PPn igraju u detoksikaciji od teških metala (Gonzalez & Jensen, 1998; Keasling & Hupf, 1996; Keyhani *et al.*, 1996), sintezi ćelijskog zida (Tinsley & Gotschlich, 1995), kontroli ekspresije gena (Kim *et al.*, 1998; Kusano & Ishihama, 1997; Rao *et al.*, 1998; Shiba *et al.*, 1997), kontroli homeostaze katjona (Cramer & Davis, 1984; Durr *et al.*, 1979) i aktivnosti enzima (Skorko *et al.*, 1989) u toku razvića.

Proces detoksikacije od teških metala se odvija zahvaljujući vezivanju ovih katjona za PPn. Tako se proces detoksikacije kod bakterije *Lactobacillus plantarum* koja ne sadrži superoksid dismutazu, enzim odgovoran za uklanjanje superoksida, odigrava mehanizmom vezivanja  $Mn^{2+}$  za polifosfate (Archibald *et al.* 1982). Regulacija ćelijske aktivnosti  $Ca^{2+}$  kod kvasaca zavisi takođe od njegovog vezivanja za ove polianjonske molekule (Dunn *et al.* 1994). Osim toga, mehanizmi detoksikacije od vanadata kod *Hansenulla polymorpha* i *S. cerevisiae* se obavljaju kroz vezivanje redukovane forme ovog metala za polifosfate (Mannazzu *et al.* 1997, Zoroddu *et al.* 1996). Vezivanje drugih metala na ovaj način takođe smanjuje njihov toksični uticaj na određene organizme (Lee *et al.* 1994). Uloga PPn u kontroli homeostaze katjona je vezana za vakuolu, koja je mesto akumulacije polifosfata (Okorokov *et al.*, 1980; Wiemken & Durr, 1974). Na značaj ove funkcije PPn ukazuje podatak da pri visokoj aktivnosti katjona i kratkotrajnom odsustvu Pi u medijumu dolazi do veoma male hidrolize vakuolarnih PPn, dok se koncentracija Pi u citoplazmi održava na račun smanjenja Pi u vakuoli (Lichko *et al.*, 1982; Okorokov *et al.*, 1980).

Uloga vakuolarnih polifosfata u preživljavanju osmotskog stresa ili alkalizacije citoplazme je primećena kod algi i gljiva. Kod alge *Dunalliella salina* alkalizacija citoplazme dovodi do hidrolize PPn što rezultuje uspostavljanjem pH homeostaze. Predloženo je da akumulacija anjona u vakuoli aktivira specifične polifosfataze koje hidrolizuju dugolančane PPn do trifosfata, a amini se neutralizuju protonima

oslobođenim pri hidrolizi (Pick et al., 1990; Pick & Weiss, 1991). Hipoosmotski šok kod *N. crassa* dovodi do brze hidrolize PPn pri čemu se povećava koncentracija citoplazmatskih fosfata (Yang et al., 1993). Rezultati o uticaju anoksije na promene sadržaja PPn kod *S. cerevisiae* i *N. crassa* nisu uniformni. Kod *S. cerevisiae* je pokazano da anoksija izaziva smanjenje intenziteta signala centralnih fosfatnih grupa (PPc) i povećanje intenziteta Pi signala u <sup>31</sup>P NMR spektru, ali je intenzitet ovih promena zavisio od faze razvića (Beauvoit et al., 1991; Campbell-Burk et al., 1987; den Hollander et al., 1981). Kod *N. crassa*, anoksija nije dovela do promena u intenzitetu ovih signala (Pilatus & Techel., 1991).

### 1.5. *Phycomyces blakesleeanus* kao predstavnik filamentoznih gljiva

Gljive (*Fungi*) su daleko manje istražene od druge dve grupe višecelijskih eukariota, biljaka i životinja, i to na svim nivoima, od taksonomskog do molekularnog. Smatra se da do sada opisanih oko 100 000 vrsta gljiva predstavlja svega oko 3% od očekivanog broja (Blackwell, 2011). Sve do polovine dvadesetog veka bilo je opšte prihvaćeno mišljenje da gljive pripadaju carstvu biljaka (Lemery, 1675) i da vode poreklo od predačke alge koja je izgubila sposobnost fotosinteze (Atkinson, 1915). Tek krajem šezdesetih godina prošlog veka Vitaker (1969) klasifikuje živi svet u pet carstava i prema ovoj klasifikaciji gljive po prvi put postaju carstvo za sebe. Zahvaljujući intenzivnim molekularno filogenetskim istraživanjima, danas je opšteprihvaćeno mišljenje da su zapravo životinje i gljive sestrinske grupe (Baldauf & Palmer, 1993; Bricheux & Brugerolle, 1997; Roger et al., 1999; Baldauf, 1999) koje vode poreklo od zajedničke predačke grupe *Choanoflagellata* (Cavalier-Smith, 1987, Cavalier-Smith, 1998), a da biljke predstavljaju posebnu evolutivnu liniju.

U carstvu gljiva se izdvaja pet razdela: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* i *Basidiomycota*. *Ascomycota* i *Basidiomycota* su dve evolutivno najmlađe sestrinske grupe monofiletskog porekla pa se često svrstavaju u zajednički razdeo *Dikaryomycota* (Berbee & Taylor 1992). *Zygomycota* zajedno sa razdelom *Chytridiomycota* stoji u osnovi carstva gljiva, a od drugih razdela carstva su se odvojile pre oko 600-1400 miliona godina (Heckman et al. 2001).

Položaj *Zygomycota* u osnovi carstva gljiva ukazuje na veći stepen srodnosti sa carstvom životinja u odnosu na *Dikaryomycota*, pa je pokazano na osnovu analiza dela

sekvence citohroma *c* (Dayhoff, 1976) i nukleotidne sekvence 5S ribozomalne RNK (Andersen et al., 1982) da je vrsta *Phycomyces blakesleeanus*, koja spada u razdeo *Zygomycota*, podjednako filogenetski udaljena od viših gljiva koliko i od životinja (Mannella et al., 1987), dok su joj najrodnije *Chytridiomycota* (Walker & Doolittle, 1982).

Fiziološka istraživanja gljiva su malobrojna, do sada su uglavnom obavljena na *Ascomycota* i ukazuju na postojanje sličnosti u fiziološkim procesima između biljaka i ove grupe gljiva, pa se postavlja interesantno pitanje da li bi detaljnije proučavanje fizioloških procesa kod *Zygomycota* ukazalo na bliže veze sa životinjama ili biljkama na ovom nivou. Postoji tek nekoliko vrsta gljiva čija je fiziologija intenzivno ispitivana. To su pre svega kvasci, naročito *S. cerevisiae*, koji predstavlja jedan od najbolje istraženih eukariotskih organizama. Dobro su istražene i *N. crassa* (Perkins & Davis, 2000), *Aspergillus spp.* (Taylor et al. 1993) i *Schizosaccharomyces plombe*, koje takođe pripadaju razdelu *Ascomycota*. Od *Basidiomycota* u fiziološkim istraživanjima najčešće su korišćeni *Uromyces spp.* i *Ustilago maydis* (Bölker 2001). *Zygomycota* su najslabije istražena grupa gljiva i sa fiziološkog stanovišta, a samo vrsta *P. blakesleeanus* je u većoj meri istraživana (Bergman et al. 1969; Ceredá Olmedo & Lipson 1987), ali i u ovom slučaju istraživanja su pre svega bila usmerena na rast sporangiofora, njihovu fototropnu (Ceredá-Olmedo, 2001) i geotropnu reakciju (Schimek 1999), sintezu i strukturu ćelijskog zida (Gamow et al. 1987) i polno razmnožavanje (Sutter 1987). Stadijum micelijuma, nakon klijanja a pre razvića sporangiofora, je u dosadašnjim istraživanjima zaobilažen, pa mnogi procesi kod *Zygomycota*, kao što su membranski transport, uloga polifosfata u odgovoru na stres, regulacija elemenata respiratornog lanca, ostali slabo poznati.

U istraživanju fizioloških procesa kod *Zygomycota*, *P. blakesleeanus* je dobar izbor zbog jasno definisanih uslova gajenja, kratkog životnog ciklusa, makroskopske veličine sporangiofora i postojanja velikog broja mutanata za različite fiziološke procese (Ceredá-Olmedo & Lipson 1987). Od velike je važnosti i to da je od skora razrešen i dostupan celokupan genom ove vrste (<http://genome.jgi-psf.org/Phybl2/Phybl2.home.html>).

Ispitivanje specifičnih komponenti respiratornog lanca kod gljiva nije lak zadatak zbog njihove velike raznolikosti i kompleksnosti, zbog koje je respiratorni

lanac možda bolje nazvati »respiratornom mrežom« (Milani et al., 2001). Kako su *Zygomycota* u samoj osnovi carstva gljiva (Heckman et al. 2001), ispitivanje alternativnih respiratornih elemenata u ovoj grupi je od naročite važnosti, a do sada su neki napori u tom smeru učinjeni samo kod dve vrste, *Mucor rouxii* (Salcedo-Hernandez et al., 1994; Cano-Canchola et al., 1988) i *Allomyces macrogynus* (Heldt-Hansen et al., 1983; 1983a).

Za *P. blakesleeanus*, je poznato da sadrži sve elemente citohromskog respiratornog lanca (Ceredá-Olmedo & Lipson 1987), pa je zbog već pomenutih karakteristika odabrana u ovoj studiji za ispitivanje mogućnosti postojanja alternativnog respiratornog puta tokom vegetativnog razvića, kao i njegove regulacije. *P. blakesleeanus* se smatra isključivo aerobnim organizmom (Ceredá-Olmedo & Lipson 1987), međutim, kako je u prirodi saprofit koji se može naći uglavnom na zemlji, moguće je da tokom razvića bude izložena uslovima smanjene koncentracije kiseonika zbog plavljenja terena. Za očekivati je da ovakve promene imaju efekat na energetske metabolizam i mogu dovesti do promena u citohromskoj i alternativnoj respiraciji. Poznato je da je kod biljaka afinitet alternativne oksidaze za kiseonik niži nego kod citohrom *c* oksidaze (Ribas-Carbo et al., 1994) i da aktivnost ovog proteina opada sa smanjenjem koncentracije kiseonika (Skutnik & Rychter, 2008; Szal et al., 2003), ali kod gljiva dostupni rezultati su ponovo vrlo kontradiktorni. Tako kod *M. rouxii* anoksija indukuje pojavu alternativne respiracije (Salcedo-Hernandez et al., 1994; Cano-Canchola et al., 1988), dok kod nekih kvasaca sprečava njenu pojavu (Viega et al., 2003a). Podaci o uticaju anoksije na metabolizam fosfatnih jedinjenja su nekonzistentni, a <sup>31</sup>P NMR spektroskopija se pokazala kao izuzetno pogodna za nedestruktivne *in vivo* studije promena u ATP-u i ostalim fosfatnim molekulima uključenim u energetske metabolizam. U ranijim studijama je pokazano da postoji razlika u efektu cijanida, COX blokatora, i anoksije na <sup>31</sup>P NMR spektar *P. blakesleeanus* (Zakrzewska et al., 2005), kao i da, barem u početnim stadijumima anoksije, ne dolazi do očekivanog smanjenja β ATP-a (Stanić et al., 2009). Kako se za gljive pretpostavlja da PPn, pored ATP-a, imaju značajnu ulogu u energetskom metabolizmu (Vagabov et al., 1998), a mogu i direktno učestvovati u sintezi ATP-a (Beauvoit et al., 1989), u ovoj studiji će biti ispitivane promene u <sup>31</sup>P NMR spektru gljive *P. blakesleeanus* izloženoj uslovima smanjene koncentracije kiseonika.



## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje različitih aspekata energetskog metabolizma gljive *Phycomyces blakesleeanus*, pre svega elektron transportnog (respiratornog) lanca i metabolizma fosfatnih jedinjenja kao što su polifosfati – PPn, i adenzin tri fosfat – ATP, kao i utvrđivanje postojanja veze između ovih, u ćeliji prostorno razdvojenih metaboličkih procesa.

Iz zadatog cilja proizašli su i konkretni zadaci rada:

1. Utvrđivanje prisustva i aktivnosti alternativnih elemenata respiratornog lanca, sa akcentom na alternativnu oksidazu, u unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani gljive *P. blakesleeanus* pomoću kiseonične elektrode tipa Klark na micelijumu i izolovanim mitohondrijama.
2. Utvrđivanje aktivnosti i učešća alternativne i citohromske respiracije u ukupnoj respiraciji u različitim fazama rasteanja gljive, kao i utvrđivanje regulacije alternativne respiracije primenom blokatora transkripcije, translacije i energetski zavisnog transporta proteina.
3. Ispitivanje promena u učešću alternativne i citohromske respiracije u uslovima smanjene koncentracije kiseonika primenom kiseonične elektrode tipa Klark, i promene sadržaja fosfatnih jedinjenja, posebno PPn i ATP, u istim eksperimentalnim uslovima metodom  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopije.
4. Utvrđivanje kako smanjena koncentracija kiseonika utiče na rastenje i razviće gljive *P. blakesleeanus* upoređivanjem klijavosti spora i dužine hifa u kontrolnim i eksperimentalnim uslovima.
5. Utvrđivanje efekata dugotrajne izloženosti (do 5 h) micelijuma *P. blakesleeanus* blokatorima respiratornog lanca na aktivnost i učešće alternativnih i citohromskih elemenata u ukupnoj respiraciji, i poređenje sa promenama koje isti tretman izaziva u sadržaju fosfatnih jedinjenja.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Eksperimentalni objekat

Kao eksperimentalni objekat u ovom radu korišćen je divlji soj *NRRL1555* (-) gljive *Phycomyces blakesleeanus* (Burgeff).

##### 3.1.1. Uzgoj micelijuma gljive *Phycomyces blakesleeanus*

Vegetativne spore gljive *P. blakesleeanus* u koncentraciji  $10^7$  spora/ml su čuvane u zamrzivaču na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Za obnavljanje zalihe, spore su sađene na čvrsti krompirov medijum. Pre sađenja, spore su razblažene do koncentracije  $10^2$  spora/ml i inkubirane u vodenom kupatilu 15 min na temperaturi od  $49^{\circ}\text{C}$  da bi se aktivirao proces klijanja. Krompirov medijum je pripreman tako što je 200 g krompira kuvano sat vremena u 1 l destilovane vode i zatim procedeno kroz dvoslojnu gazu, a zapremina filtrata dopunjena do 1 l. Filtrat je ponovo zagrevan do ključanja i u njega je dodato: 15 g agara, 20 g glukoze, 1 mg vitamina B1 i 1,5 g ekstrakta kvasca. Dobijeni medijum je autoklaviran 35 min na temperaturi od  $105^{\circ}\text{C}$  i razlivan u sterilne petri posude prečnika 9 cm do nivoa od oko 0,5 cm. Nakon hlađenja, 100  $\mu\text{l}$  aktiviranih spora je dodato u svaku petri posudu. Gljive su gajene u komori za uzgoj na temperaturi od  $22^{\circ}\text{C}$  pri relativnoj vlažnosti vazduha od 95%, izložene kontinuiranom belom fluorescentnom osvetljenju jačine  $10 \text{ W/m}^2$ . Nakon 4 dana gljive su dostigle poslednji stadijum razvića sporangiofora i zrele sporangiofore su potapane u destilovanu vodu gde njihove opne pucaju i spore se oslobađaju. Oslobađanje spora je rađeno u onoliko ml destilovane vode koliko je petri posuda inokulirano, i tada je dobijena koncentracija bila  $10^7$  spora/ml.

Za eksperimente u ovom radu micelijum je uzgajan u tečnom medijumu. Pre sađenja, vegetativne spore gljive *P. blakesleeanus* su aktivirane u vodenom kupatilu 15 min na  $49^{\circ}\text{C}$ . Jedan ml aktiviranih spora je dodat u petri posude prečnika 9 cm u koje je već razliveno 11 ml standardnog tečnog minimalnog medijuma (*Sutter, 1975*) sastava: 36.7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.376 mM  $\text{CaCl}_2$ , 3  $\mu\text{M}$  tiamin x HCl, 1  $\mu\text{M}$  limunska kiselina x  $\text{H}_2\text{O}$ , 3.7  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ , 3.5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.8  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0.2  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.2  $\mu\text{M}$   $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , ali sa dvostrukom koncentracijom glukoze i L-asparagina (220 mM glukoze, 26.6 mM L-asparagina).

Dvostruke koncentracije glukoze i asparagina se primenjuju da bi se osigurala dovoljna količina ugljenika i azota za veći prinos biomase. Konačna koncentracija spora u medijumu je  $10^6$  spora/ml, pH medijuma za rast micelijuma je 4,5, što je optimalno za rast (*Martinez-Cadena et al., 1995*). Pod ovim uslovima, vegetativni micelijum je gajen do starosti od maksimum 40 h, kada micelijum počinje da razvija sporangiofore. Klijanje spora i razvoj micelijuma su praćeni pod binokularnom lupom (MBS-9, USSR).

### 3.1.2. Izolacija mitohondrija

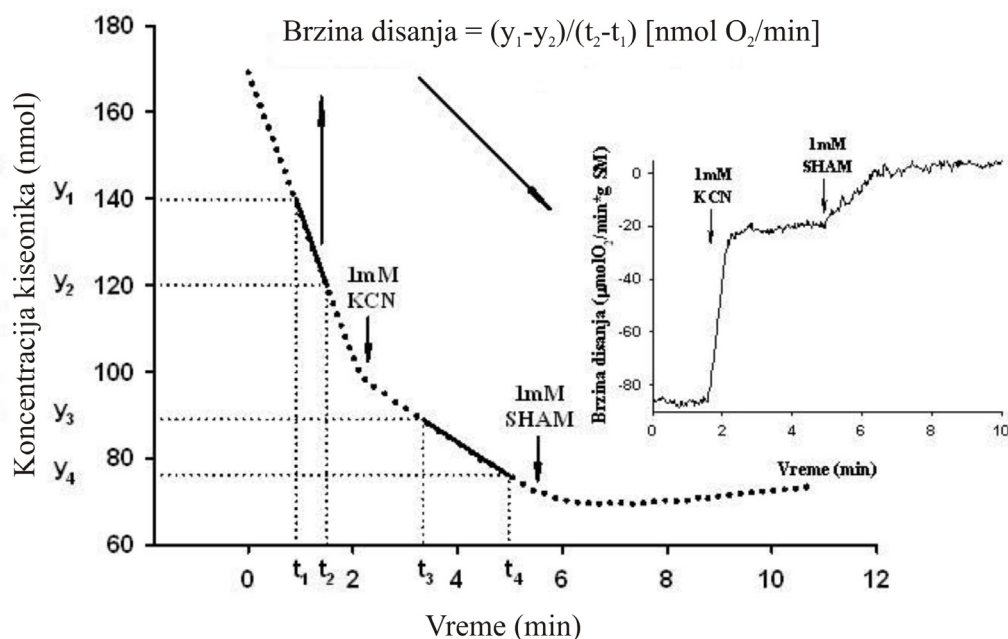
Mitohondrije su izolovane iz 28 h starog micelijuma po ranije opisanoj proceduri (*Salcedo-Hernandez et al., 1994*). Micelijum je procedjen na vakuumu i deset grama micelijuma (sveža masa) je resuspendovano u 100 ml medijuma A čiji je sastav bio: 10 mM TRIS/HCl, pH 7,5, 2 mM EDTA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,7 M saharoza i 1,1 M glicerol, a zatim homogenizovano 3 puta po 5 sekundi Politron homogenizerom (Polytron PT10/35, Kinematica GmbH) u posudi od pleksiglasa. Homogenat je centrifugiran 5 min na  $3300 \times g$ , a zatim je supernatant ponovo centrifugiran 10 min na  $20000 \times g$ . Talog je pažljivo resuspendovan u medijumu B (čiji je sastav identičan medijumu A samo bez glicerola), i suspenzija je centrifugirana 5 min na  $3300 \times g$ . Mitohondrije iz supernatanta su taložene centrifugiranjem 10 min na  $13300 \times g$  i resuspendovane u minimalnoj zapremini medijuma B.

### 3.1.3. Enzimski eseji

Čistoća mitohondrijalne frakcije je procenjena merenjem aktivnosti marker enzima. Kao marker za kontaminaciju peroksizomima korišćena je hidropsipiruvat reduktaza, čija je aktivnost određivana prema metodi Titusa i sar. (*1983*). Aktivnost NAD(P)H-citohrom c reduktaze, markera endoplazmatičnog retikuluma je određivana prema metodi Terija i Vilijamsa (*Terry and Williams, 2002*), a citohrom c oksidaze, markera mitohondrija, prema metodi Tolberta (*Tolbert, 1974*). Koncentracija proteina je određivana metodom Bredforda (*Bradford, 1976*) a kao standardni protein je korišćen goveđi serum albumin (BSA). Metoda je modifikovana za čitač mikrotitar pločica tako da je odnos uzorak:boja bio 5:200. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 620 nm. Svi enzimski eseji su izvedeni u prisustvu 0,015% Triton X-100.

### 3.2. Merenje potrošnje kiseonika

Potrošnja kiseonika je merena pomoću dve kiseonične elektrode tipa Klark (Hansatech Instruments, Norfolk, England) i (Qubit Systems Inc. Kingston, Ontario, Canada). Tokom merenja temperatura je održavana na 25°C pomoću protočnog vodenog kupatila. Da bi se početna brzina disanja držala u optimalnom opsegu od 15-25 nmol/min vršeno je razblaživanje micelijuma eksperimentalnim medijumom u zavisnosti od starosti. Svi uzorci micelijuma su pre merenja aerisani 1-20 min, u zavisnosti od potreba eksperimenta. Inicijalna koncentracija kiseonika u reakcionoj smeši je bila oko 260 nmol/ml. Softveri (Oxygraph 32) i (Logger Pro) beleže smanjenje koncentracije kiseonika (nmol) u vremenu. Određivanjem nagiba krive potrošnje kiseonika, pomoću jednačine date na Slici 10, originalni podaci o potrošnji kiseonika se transformišu u brzinu disanja.



**Slika 10.** Originalni zapis potrošnje kiseonika 24 h starog micelijuma gljive *P. blakesleeanus*. Punom linijom su označeni delovi zapisa sa kojih je prema datoj jednačini određivan nagib, odnosno brzina disanja. Umetnuti grafik sa desne strane prikazuje promenu brzina disanja u vremenu dobijenu transformacijom krive potrošnje kiseonika pomoću date jednačine.

Respiracija mitohondrija je merena prema proceduri Salcedo-Hernandez i sar. (1994) u komori zapremine 1 ml. Alikvoti mitohondrija resuspendovani u medijumu B su pomešani sa rastvorom koji sadrži 120 mM KCl, 5 mM MOPS/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub> i 2 mM EDTA.

### **3.2.1. Određivanje učešća različitih komponenata respiratornog lanca u ukupnom disanju**

Inhibitori disanja su u odgovarajućim koncentracijama dodavani direktno u komoru elektrode u kojoj je uzorak izložen stalnom mešanju, i potrošnja O<sub>2</sub> je praćena tokom sledećih 10-15 min. Procena učešća cijanid osetljive respiracije (CSR – *cyanide sensitive respiration*) i disanja neosetljivog na cijanid (CRR – *cyanide resistant respiration*) je vršena primenom KCN (1-10 mM) i SHAM-a (2-10 mM). Aktivno učešće CRR u ukupnom disanju se definiše kao procenat respiracije blokiran SHAM-om, dok se kapacitet učešća CRR definiše kao procenat ukupnog disanja koji ostaje nakon dodatka KCN. Učešće CRR je ispitivano na micelijumu starosti do 40 h i aktiviranim sporama starosti 1 h. Antimicin A, inhibitor Kompleksa III, je korišćen u koncentraciji od 20 µM za povećanje učešća CRR. Inhibitor translacije, cikloheksimid; inhibitor transkripcije, aktinomycin D i CCCP (karbonil cijanid m-hlorofenil hidrazon), dekaplajući agens i blokator energetski zavisnog ulaska polipeptida u mitohondrije, su primenjivani u koncentracijama od 0,24, 16 i 20 µM. Rotenon (1 nM do 30 µM) je korišćen za pokazivanje prisustva Kompleksa I u respiratornom lancu. Nakon merenja, uzorci su filtrirani na vakuumu i osušeni na 90°C radi određivanja suve mase (SM).

### **3.2.2. Određivanje učešća CRR u ukupnom disanju nakon izlaganja uzoraka uslovima hipoksije i anoksije**

Uzorci micelijuma su inkubirani 1,5, 3 i 5 h u hipoksičnim i anoksičnim uslovima. Hipoksični uslovi su uspostavljeni tako što su uzorci stavljeni u epruvete zatvorene gumenim zatvaračem kroz koji je bio umetnut špric dijametra 0,8 mm i u čiju je osnovu stavljena kuglica vate (*Shelemekh et al., 2006*). Za anoksične uslove, medijum u epruvetama od 10 ml je barbotiran azotom 5 min, nakon čega su epruvete zatvorene gumenim zatvaračima. Za eksperimente reoksigenacije, uzorci su nakon tretmana od 5 h barbotirani atmosferskim vazduhom 10 i 20 min.

### 3.3. <sup>31</sup>P NMR eksperimenti

Za <sup>31</sup>P NMR eksperimente micelijum gljive je filtriran na vakuum pumpi i ispiran eksperimentalnim medijumom (0,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 110 mM glukoza, 13,3 mM asparagin, bez mikroelemenata, pH = 4,5) koji je zatim korišćen i u merenjima. Oko 0,6 g svežeg micelijuma je resuspendovano u aerisani eksperimentalni medijum do zapremine od 2 ml i preneto u NMR kivetu prečnika 10 mm. <sup>31</sup>P NMR merenja su vršena na *Bruker MSL 400/Apollo* spektrometru, sa rezonantnom frekvencijom za <sup>31</sup>P od 161.978 MHz. Spektri su snimani u vremenskom domenu od 2K, dužina pulsa je bila 14 μs (45°), vreme ponavljanja pulsa 300 ms, a spektralna širina 8000 Hz. Vreme akumulacije spektra je bilo 6 minuta. Pre *Fourier* transformacije vršeno je eksponencijalno množenje signala faktorom od 25 Hz. Za određivanje hemijskog pomaka signala, kao spoljašnji standard je korišćena metilen difosfonična kiselina sa relativnim hemijskim pomakom od 17,05 ppm u odnosu na 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Za <sup>31</sup>P NMR eksperimente, uzorci u erlenmajerima su izlagani hipoksičnim i anoksičnim uslovima na isti način kao za merenje potrošnje kiseonika, samo što je barbotiranje azotom trajalo 20 min zbog veće zapremine uzorka (50 ml). Uzorci su nakon tretmana od 5 h izlagani barbotiranju atmosferskim vazduhom u trajanju od 20 min.

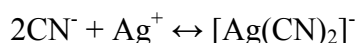
### 3.4. Određivanje uticaja hipoksije i anoksije na rast i morfologiju gljive

Za merenje dužine hifa, suspenzija micelijuma gljive *P. blakesleeanus* je inkubirana u hipoksičnim i anoksičnim uslovima na isti način kao za <sup>31</sup>P NMR eksperimente. Za prvi eksperiment (eksperiment A), kultura stara 24 h je izlagana tretmanu a zatim su uzorci uzimani nakon 1,5, 3 i 5 h inkubacije. Za drugi eksperiment (eksperiment B), kultura stara 12 h je izlagana tretmanu a uzorci su uzimani nakon 4, 8 i 12 h inkubacije. U svakoj vremenskoj tački, oko 100 μl uzorka je posmatrano pod mikroskopom (Leica Microsystems, Germany) sa konačnim uveličanjem od ×200 za uzorke mlađe od 24 h, ili ×100 za uzorke starije od 24 h. Uzorci su fotografisani Nikon COOLPIX 4500 (Nikon, Tokyo, Japan) foto aparatom montiranim na mikroskop. Obrada slika i određivanje dužine hifa je vršeno programom Image J (NIH, USA). Za određivanje vijabilnosti spora, aktivirane spore su izložene tretmanu odmah po

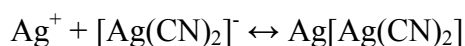
inokulaciji a broj prokljalih i neprokljalih spora je nakon 8 h izbrojan pod mikroskopom pomoću hemocitometra (Superior Marienfeld, Germany).

### 3.5. Određivanje koncentracije cijanidnog jona u rastvoru

Argentometrijsko određivanje cijanidnog jona po Libig-u (*Liebig, 1851*) se zasniva na građenju stabilnog cijanidnog kompleksnog jona:



Ovaj kompleks je rastvorljiv u vodi ali kada u rastvoru više nema slobodnih  $\text{CN}^-$  jona, formira se kompleks nerastvorljiv u vodi:



Pojava zamućenja usled izdvajanja taloga se koristi za određivanje završne tačke titracije.

Za titraciju cijanida u uzorcima zapremine 15 ml ( $V_{\text{ukupno}}$ ) koristi se 1M ( $c_{\text{AgNO}_3}$ ) rastvor  $\text{AgNO}_3$ . Zapremina upotrebljenog rastvora ( $V_{\text{AgNO}_3}$ ) omogućava izračunavanje koncentracije cijanida ( $c_{\text{CN}^-}$ ) prema formuli:

$$n_{\text{CN}^-} = (2 \times V_{\text{AgNO}_3} \times c_{\text{AgNO}_3}) / 1000$$

$$c_{\text{CN}^-} = n_{\text{CN}^-} / V_{\text{ukupno}}$$

U micelijum gljive *P. blakesleeanus* star 24 h je dodat 5 mM KCN i uzorak je ostavljen da stoji 5 h. Nakon ovog vremena, određena je preostala koncentracija cijanidnog jona u rastvoru.

### 3.6. Statistička analiza podataka

Promene koje hipoksični i anoksični tretmani izazivaju kod  $^{31}\text{P}$  NMR spektra gljive *P. blakesleeanus* i relativnoj aktivnosti AOX su prikazane grafički pomoću analize glavnih komponenti (PCA – *principal component analysis*). Prikazani podaci obuhvataju devet pojedinačnih  $^{31}\text{P}$  NMR signala, odnose PPc/Pi i  $\beta$  ATP/Pi, kao i učešće AOX u ukupnoj respiraciji dobijene u kontrolnim uslovima, hipoksiji i anoksiji. Podaci su kvantitativni i imaju različite jedinice, pa je korišćena normalizovana PCA koja je izvedena pomoću softvera ADE-4 (*Thioulouse et al., 1997*).

Statistička analiza eksperimentalnih podataka je izvedena pomoću programa SigmaStat verzija 2 (*Aspire Softwer International, Ashburn, VA, USA*). Za poređenje grupa podataka korišćeni su t-test ili Mann Whitney test, sa nivoom značajnosti od 5% ( $P < 0,05$ ). Za grafičko i tabelarno prikazivanje rezultata korišćeni su programi *MS Office, Corel Draw Graphics Suite* i *SigmaPlot*. Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Broj uzoraka, n, je prikazan za svaki eksperiment u poglavlju 4, sekcija Rezultati.

### **3.7. Hemikalije**

KCN, SHAM,  $\text{NaN}_3$ , CCCP, NADH, antimicin A, aktinomicin D, cikloheksimid i rotenon su nabavljeni od proizvođača Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). KCN,  $\text{NaN}_3$ , NADH i cikloheksimid su rastvarani u dejonizovanoj vodi, antimicin A i SHAM u 96% etanolu, a aktinomicin D, rotenon i CCCP u DMSO.

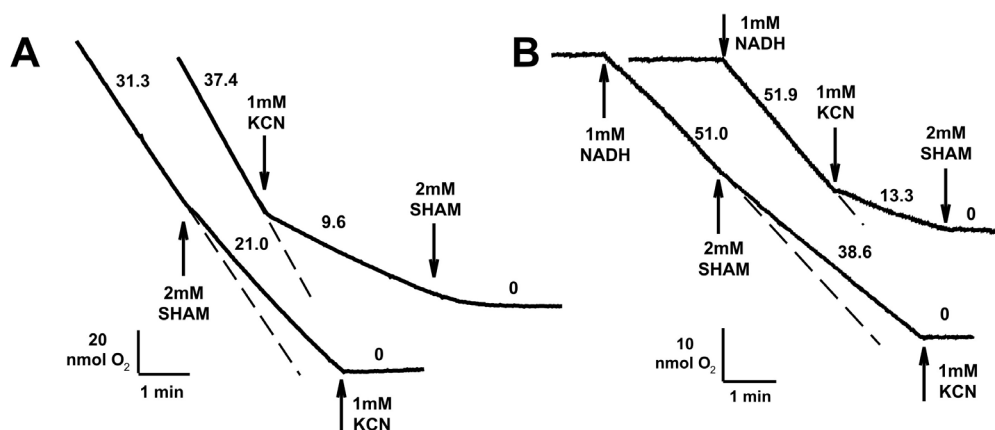


## 4. REZULTATI

### 4.1. Efekti inhibitora respiracije

Efekti cijanida, inhibitora citohrom *c* oksidaze, i SHAM-a, inhibitora alternativne oksidaze, su ispitivani na 28 h starom micelijumu gljive *P. blakesleeanus*, i na mitohondrijama izolovanim iz gljive iste starosti. Dodavanje 1 mM KCN u komoru kiseonične elektrode sa uzorkom je inhibiralo  $73\pm 2\%$  ( $n = 3$ ) ukupne respiracije micelijuma, a ostatak je inhibiran SHAM-om (Slika 11 A). Kada se inhibitori dodaju obrnutim redosledom, 2 mM SHAM inhibira  $27\pm 3\%$  respiracije ( $n = 5$ ), dok dodavanje 1 mM KCN-a inhibira ostatak (Slika 11 A). Prisustvo oba inhibitora u ovoj fazi razvića u potpunosti inhibira disanje micelijuma, bez obzira na redosled njihovog dodavanja.

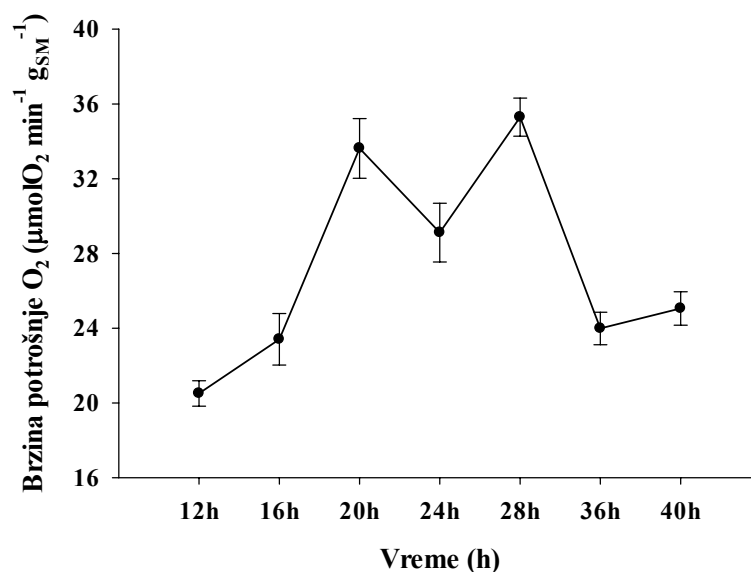
Radi potvrde da su primećeni efekti inhibitora ograničeni na mitohondrije, odnosno cijanid osetljivu i cijanid neosetljivu respiraciju, isti eksperiment je ponovljen na mitohondrijama izolovanim iz gljiva starosti 28 h. Kao supstrat za respiraciju je korišćen 1 mM NADH. U ovom eksperimentu, cijanid je inhibirao 74% respiracije, a SHAM, kada je korišćen kao prvi blokator, 24% (Slika 11 B). U oba slučaja je dodavanje drugog inhibitora u potpunosti zaustavilo potrošnju kiseonika. Prvi zaključak koji se može izvesti je da u gljivi *P. blakesleeanus* postoji i klasična, cijanid osetljiva (CSR), i alternativna, cijanid neosetljiva respiracija (CRR). Procenti inhibicije u micelijumu i mitohondrijama su veoma slični što pokazuje da se micelijum može koristiti za ispitivanje ova dva tipa respiracije, a kako prisustvo oba inhibitora potpuno zaustavlja respiraciju, može se zaključiti da su samo ova dva tipa respiracije konstitutivno aktivna barem u ovoj fazi razvića micelijuma *P. blakesleeanus*.



**Slika 11.** Zapisi potrošnje kiseonika: A) micelijuma *P. blakesleeanus* starog 28 h, pre i nakon dodavanja inhibitora respiracije. B) mitohondrija izolovanih iz 28 h starih gljiva. Brojevi sa desne strane zapisa predstavljaju brzinu disanja u  $\mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$  za micelijum i  $\text{nmolO}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mg proteina})^{-1}$  za mitohondrije. Strelice označavaju moment dodavanja inhibitora, a isprekidana linija očekivani tok potrošnje  $\text{O}_2$  bez inhibitora. Koncentracija proteina u mitohondrijalnoj frakciji je  $0,21 \text{ mg ml}^{-1}$  proteina.

#### 4.2. Određivanje učešća alternativne respiracije u različitim fazama rasta micelijuma *P. blakesleeanus*

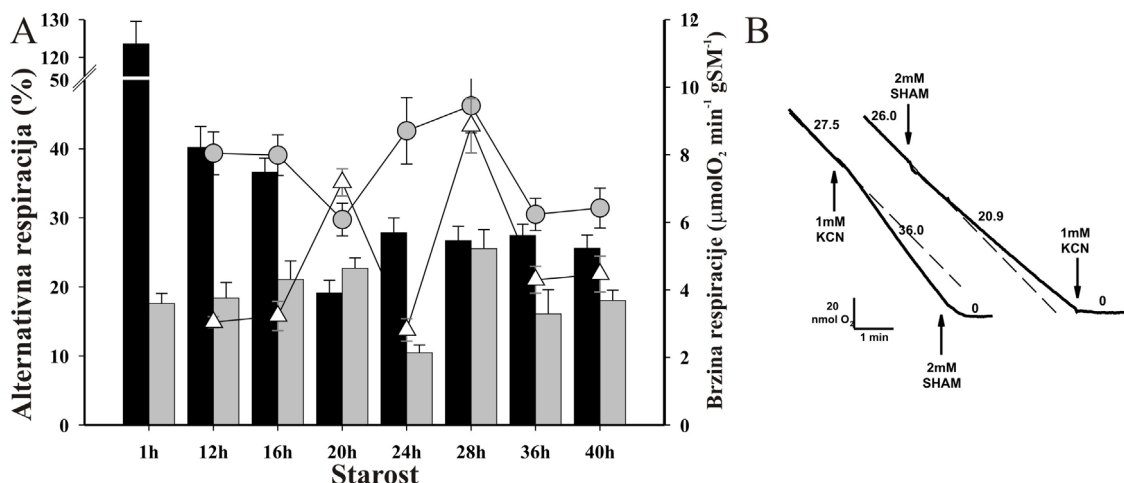
U toku razvića micelijuma gljive dolazi do promena u brzini disanja (Slika 12). Maksimalne brzine se dostižu na 20 i 28 h ( $33,62 \pm 1,59 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$ ,  $n = 5$ , odnosno  $35,29 \pm 1,02 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$ ,  $n=4$ ), a minimum je na 12 h ( $20,51 \pm 0,68 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$ ,  $n=4$ ). Na 16, 36 i 40 h brzina potrošnje kiseonika je slična i iznosi oko  $24 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$ .



**Slika 12.** Zavisnost brzine disanja od uzrasta gljive izražena u  $\mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$

Da bi odredili da li učešće cijanid neosetljive respiracije varira tokom razvića, praćen je efekat blokatora na micelijum u različitim fazama razvića gljive *P. blakesleeanus*. Aktivnost CRR je određivana dodavanjem 2 mM SHAM-a a rezultati su prikazani na Slici 13 A (sivi stubići). Iz prikazanih rezultata se vidi da je alternativna respiracija prisutna tokom svih ispitivanih faza razvića. Aktivnost alternativne respiracije je skoro konstantna (~20%) sve do 24-og sata ( $18 \pm 1\%$ ,  $n = 3$  na 1 h;  $21 \pm 3\%$ ,  $n = 6$  na 16 h i  $23 \pm 2\%$ ,  $n = 4$  na 20 h), kada dostiže statistički značajan minimum od  $10 \pm 1\%$  ( $n = 8$ ,  $P < 0,05$ ). Na 28 h, aktivnost CRR dostiže maksimum od  $26 \pm 3\%$  ( $n = 6$ ,  $P < 0.001$ ), da bi zatim na 36 h pala na  $16,1 \pm 3\%$  ( $n = 5$ ) i  $18 \pm 2\%$  ( $n = 3$ ) na 40 h.

Alternativna respiracija se može takodje odredjivati merenjem preostale respiracije nakon dodatka cijanida (Slika 13 A, crni stubići). Međutim, vidno je da je na ovaj način određena alternativna respiracija u većini slučajeva veća u odnosu na prethodni način određivanja. Zato se na ovaj način dobijena aktivnost alternativne respiracije označava kao njen *kapacitet*. Kapacitet CRR opada tokom razvića, maksimalan je u aktiviranim sporama, odnosno 1 h nakon aktivacije gde dolazi do neočekivanog porasta respiracije koja dostiže vrednost od  $124 \pm 6\%$  ( $n = 3$ ,  $P < 0,01$ ). Ovu povećanu respiraciju potpuno inhibira 2 mM SHAM (Slika 13 B), a kada se SHAM doda prvi, smanjenje respiracije je samo 18% kao što je ranije istaknuto.



**Slika 13. A)** Promene u alternativnoj respiraciji tokom rasta *P. blakesleeanus*. Sivi stubići i beli trouglovi predstavljaju smanjenje respiracije nakon dodatka 2 mM SHAM (aktivnost CRR) u relativnim (%) i apsolutnim vrednostima ( $\mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ). Crni stubići i sivi krugovi predstavljaju preostalu respiraciju nakon dodavanja 1 mM KCN (kapacitet CRR) u relativnim (%) i apsolutnim vrednostima ( $\mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ). **B)** Zapisi potrošnje kiseonika spora *P. blakesleeanus* 1 h nakon aktivacije. Brojevi sa desne strane zapisa predstavljaju brzinu disanja u  $\mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ . Strelice označavaju moment dodavanja inhibitora, a isprekidana linija očekivani tok potrošnje  $\text{O}_2$  bez inhibitora.

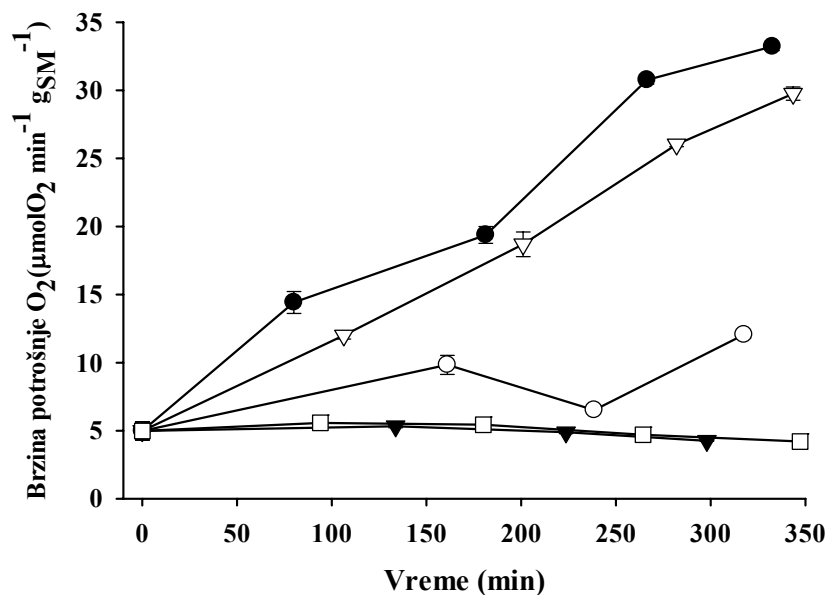
Kada se prate promene preostale respiracije nakon dodavanja 1 mM KCN u apsolutnim vrednostima (Slika 13 A, linija sa sivim krugovima), primetno je da one prate relativne vrednosti sa karakterističnim minimumom na 20 h ( $6,1 \pm 0,5 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.05$ ), osim kod 36 i 40 h starog micelijuma gde dolazi do statistički značajnog pada u CRR kapacitetu ( $6,2 \pm 0,5$  i  $0,5 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$  odnosno  $6,4 \pm 0,6 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ). Ostale dobijene vrednosti su:  $8,0 \pm 0,6 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 8$  za 12 h;  $8,0 \pm 0,6 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 3$  za 16 h;  $9 \pm 1,6 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 3$  za 24 h i  $9,5 \pm 0,8 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 4$  za 28 h. Nakon dodatka 2 mM SHAM, kao prvog blokatora, među apsolutnim vrednostima respiracije zapaža se maksimum na 20 h koji nije viđen pri poređenju relativnih vrednosti ( $7,2 \pm 0,4 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 3$ ,  $P < 0.05$ ), dok maksimum zapažen na 28 h ostaje i pri razmatranju apsolutnih vrednosti respiracije ( $8,9 \pm 0,8 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 5$ ,  $P = 0,002$ ). Ostale dobijene vrednosti su:  $3,0 \pm 0,2 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 3$  za 12 h;  $3,2 \pm 0,4 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 4$  za 16 h;  $2,8 \pm 0,3 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 7$  za 24 h,  $4,3 \pm 0,4 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 4$  za 36 h i  $4,1 \pm 0,5 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gSM}^{-1}$ ,  $n = 3$  za 40 h. Primećena neslaganja među tokovima promena u apsolutnim i relativnim

vrednostima disanja mogu biti posledica promena u ukupnom disanju tokom rastenja gljive.

### 4.3. Indukcija cijanid neosetljive respiracije

Poznato je da inhibicija citohromskog respiratornog puta kod gljiva antimicinom A ili cijanidom povećava kapacitet CRR (*Sherald and Sisler, 1970; Sakajo et al., 1993; Kirimura et al., 1996*). Uticaj metaboličkih inhibitora na alternativnu respiraciju micelijuma gljive *P. blakesleanus* starog 24 h tokom ~6 h je prikazan na Slici 14. U odsustvu inhibitora alternativna respiracija je merena u 4 vremenske tačke i zapažen je rast sa  $5.0 \pm 0.7 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$  ( $n = 6$ ) u kontrolnoj tački, na  $12,1 \pm 0,2 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$  ( $n = 6$ ) nakon 320 min. U prethodnom eksperimentu je već uočeno da se učešće alternativne respiracije menja tokom rastenja micelijuma, i ovaj porast je u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima. U prisustvu  $20 \mu\text{M}$  antimicina A, već nakon 80 minuta dolazi do povećanja aktivnosti CRR na  $14,4 \pm 0,8 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$  ( $n = 6$ ), što je povećanje od 190%, a nakon 330 min na  $33,2 \pm 0,3 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$  ( $n = 6$ ), što je povećanje od 564% (Slika 14).

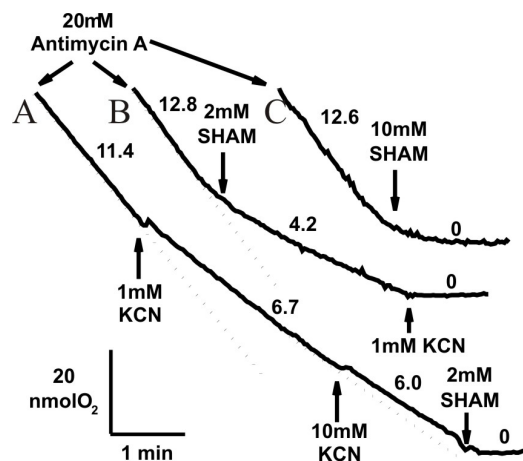
Regulatorni mehanizam indukcije CRR je ispitivan praćenjem uticaja metaboličkih inhibitora na povećanje ili smanjenje CRR 24 h starog micelijuma koji je inkubiran u  $20 \mu\text{M}$  antimicinu A (Slika 14). Inhibitori su dodavani u istom momentu kada i antimicin A. Cikloheksimid, inhibitor translacije kod eukariota, je dodat u koncentraciji  $0,24 \text{ mM}$  i u potpunosti je sprečio uticaj antimicina A na povećanje aktivnosti CRR. CCCP, dekuplujući agens koji deluje i kao inhibitor energetski zavisnog unosa polipeptida u mitohondriju, primenjen u koncentraciji od  $20 \mu\text{M}$ , je imao isti efekat kao cikloheksimid. Sa druge strane, aktinomicin D, inhibitor transkripcije gena kod eukariota, dodat u koncentraciji od  $1,6 \mu\text{M}$  nije imao skoro nikakav uticaj na povećanje aktivnosti CRR izazvanog antimicinom A (Slika 14). Nakon 340 min inkubacije, alternativno disanje je poraslo sa  $5.0 \pm 0.7 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$  ( $n = 3$ ) na  $29,8 \pm 0,5 \mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$  ( $n = 3$ ), što je povećanje od 496%. Ponovljen eksperiment sa povećanom koncentracijom aktinomicina D ( $16 \mu\text{M}$ ) je dao iste rezultate.



**Slika 14.** Efekti metaboličkih inhibitora na cijanid neosetljivu respiraciju 24 h starog micelijuma *P. blakesleeanus*. ○ – kontrola, ● – antimicin A (20 μM), ▽ - antimicin A i aktinomycin D (16 μM), ▼ - antimicin A i cikloheksimid (0,24 mM), □ - antimicin A i CCCP (20 μM)

U micelijumu inkubiranom u 20 μM antimicinu A je zapažena i jedna neočekivana pojava. Tri sata od početka inkubacije, 2 mM SHAM je samo delimično suzbio alternativnu respiraciju, dok je preostalu respiraciju inhibirao 1 mM KCN (Slika 15, zapis B). Respiraciju je u potpunosti inhibirao 10 mM SHAM (Slika 15, zapis C), a povećanje koncentracije KCN sa 1 na 10 mM nije imalo značajne efekte (Slika 15, zapis A).

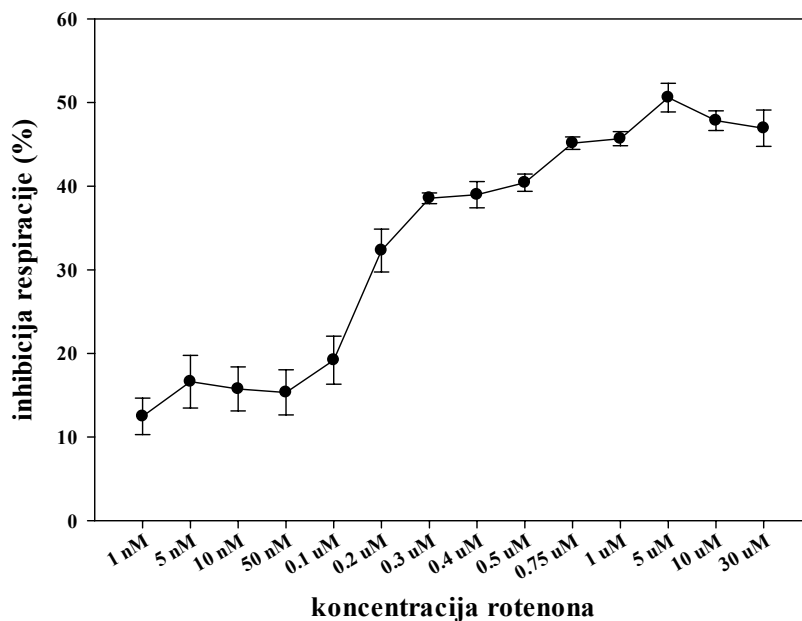
Ovi rezultati ukazuju da *P. blakesleeanus* ispoljava i treći tip disanja koji je osetljiv na cijanid i visoke koncentracije SHAM-a, ali nije osetljiv na antimicin A i niže koncentracije SHAM-a, koje su inače dovoljne za inhibiciju CRR. Ovaj tip respiracije nije konstitutivan, pošto KCN i antimicin A imaju iste efekte na respiraciju *P. blakesleeanus* u standardnim eksperimentalnim uslovima. Pored toga, efekat se ne pojavljuje uvek, primećen je u 3 od 7 nezavisnih eksperimenata.



**Slika 15.** Efekti respiratornih inhibitora na 24 h star micelijum *P. blakesleeanus* koji je inkubiran u antimicinu A 3 h. Brojevi sa desne strane zapisa predstavljaju brzinu disanja u  $\mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$ . Strelice označavaju momenat dodavanja inhibitora, a isprekidana linija očekivani tok potrošnje  $\text{O}_2$  bez inhibitora.

#### 4.4. Inhibicija respiracije rotenonom - Kompleks I

Ranija istraživanja su pokazala da *P. blakesleeanus* poseduje sve komponente citohromskog respiratornog lanca (Cerdá-Olmedo & Lipson, 1987), pa tako i Kompleks I, ali do sada nema podataka o postojanju komponenti alternativnih ovom Kompleksu. U ovom eksperimentu ispitivano je dejstvo različitih koncentracija rotenona na respiraciju *P. blakesleeanus* sa ciljem utvrđivanja optimalne koncentracije za inhibiciju Kompleksa I (Slika 16). Primenjene koncentracije su bile u opsegu od 1 nM do 30  $\mu\text{M}$ . Sigmoidna kriva dobijena na ovaj način pokazuje da se maksimalna inhibicija Kompleksa I postiže pri koncentraciji rotenona od 750 nM ( $45,15 \pm 0,76\%$ ,  $n = 4$ ) i dalje povećanje koncentracije nije značajno, osim u slučaju koncentracije od 5  $\mu\text{M}$  ( $50,59 \pm 1,70\%$ ,  $n = 4$ ,  $P = 0,02$ ), ali ova značajnost se gubi sa daljim povećanjem koncentracija pa je tako procenat inhibicije za koncentracije od 10  $\mu\text{M}$   $47,84 \pm 1,18\%$  ( $n = 4$ ) i 30  $\mu\text{M}$   $46,93 \pm 2,187\%$  ( $n = 4$ ), zbog čega se može pretpostaviti da bi se ovo odstupanje izgubilo sa većim brojem uzoraka. Iako nakon primene rotenona ostaje više od 50% respiracije, u ovom stadijumu se ne može tvrditi da *P. blakesleeanus* poseduje alternative Kompleksu I pošto elektroni ulaze u citohromski respiratorni lanac i preko Kompleksa II, pa je u narednom eksperimentima neophodno primeniti i blokatore ovog kompleksa uz optimalnu koncentraciju rotenona od 1  $\mu\text{M}$  koja je ovom prilikom utvrđena ( $45,68 \pm 0,84\%$  inhibicije,  $n = 4$ ).



**Slika 16:** Zavisnost inhibicije respiracije kod *P. blakesleeanus* od koncentracije rotenona, blokatora Kompleksa I.

#### 4.5. Efekti smanjene koncentracije kiseonika na ćelijsku respiraciju

Uloga kiseonika u regulaciji alternativne respiracije je ispitivana merenjem efekata cijanida na potrošnju kiseonika micelijuma u aerisanim (kontrola), hipoksičnim i anoksičnim uslovima. Micelijum je inkubiran u navedenim uslovima 1,5 h, 3 h i 5 h. Učešće alternativne respiracije u procentima i njena promena u hipoksičnim i anoksičnim uslovima je prikazana u Tabeli 1. Učešće alternativne respiracije raste već nakon 1,5 h tretmana, ali je ovaj porast značajan samo u anoksiji. Taj efekat postaje očigledniji nakon 3 i 5 h kada su sve promene statistički značajne (Tabela 1). Kao i u prethodnim eksperimentima, blagi porast alternativne respiracije sa vremenom je primećen i u kontrolnim uslovima, ali nije statistički značajan. Između hipoksičnog i anoksičnog tretmana u okviru iste vremenske grupe nije bilo značajnih razlika.



**Tabela 1.** Učešće alternativne respiracije (u procentima) u ukupnoj respiraciji u kontrolnim uslovima i povećanje učešća u hipoksičnim i anoksičnim uslovima. *n* – broj pojedinačnih eksperimenata; *P* – statistička značajnost.

		Alternativna respiracija (%)	Povećanje (%)	P
	<i>kontrola</i>	24.37±1.18		
1.5 h	<i>hipoksija</i>	27.46±1.06	12.67	-
	<i>anoksija</i>	28.22±1.38	15.8	0.05
3 h	<i>hipoksija</i>	32±1.68	31.33	0.002
	<i>anoksija</i>	31.98±1.7	31.22	0.002
5 h	<i>hipoksija</i>	36.63±1.25	50.31	<0.001
	<i>anoksija</i>	37.88±1.11	55.46	<0.001

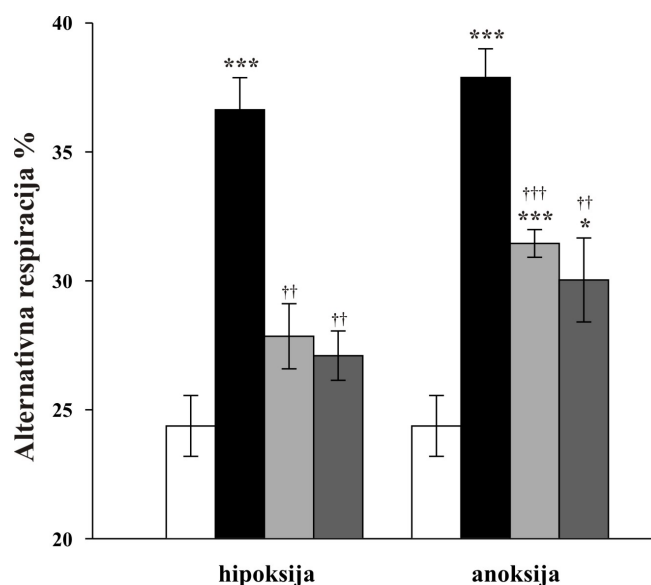
Pri razmatranju apsolutnih aktivnosti ukupnog i alternativnog disanja, očigledno je smanjenje ukupne respiracije u odnosu na kontrolnu vrednost od 33,22±3,44  $\mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$  (Tabela 2). U anoksiji, ovo smanjenje je značajno u trećem i petom satu tretmana, a u hipoksiji tek u petom satu. Međutim, smanjenje aktivnosti same alternativne respiracije, iako postoji, nije značajno čak ni nakon 5 h (Tabela 2). Odatle se može zaključiti da je smanjenje ukupne respiracije izazvano najvećim delom smanjenjem aktivnosti citohromske respiracije.

**Tabela 2.** Ukupna i alternativna respiracija u  $\mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$ , u kontrolnim uslovima i njihovo smanjenje (u procentima) u hipoksiji i anoksiji nakon 1,5; 3 i 5 h. *n* – broj pojedinačnih eksperimenata; *P* – statistička značajnost.

		Ukupna respiracija	Smanjenje (%)	P	Alternativna respiracija	Smanjenje (%)	n
	<i>kontrola</i>	33.22±3.44			12.66±1.34		9
1.5 h	<i>hipoksija</i>	32.7±2.41	1.57	-	11.6±0.79	8.3642	9
	<i>anoksija</i>	30±1.72	9.72	-	11.23±0.8	11.2469	8
3 h	<i>hipoksija</i>	26.98±2.61	18.79	-	11.83±1.24	6.5477	8
	<i>anoksija</i>	22.85±1.76	31.24	0.001	11.43±1.26	9.7039	8
5 h	<i>hipoksija</i>	23.68±2.2	28.72	0.039	10.92±1.2	13.7583	9
	<i>anoksija</i>	19.76±0.73	40.52	0.001	9.9±0.78	21.8028	7

Reverzibilnost efekata izazvanih hipoksijom i anoksijom je ispitivana reoksigencijom micelijuma koji su tretirani 5 h, i primećeno je da ovaj tretman znatno smanjuje učešće alternativne u ukupnoj respiraciji (Slika 17). Kada se uzorci izloženi

hipoksiji reoksigenišu 10 min, relativna aktivnost alternativne respiracije se smanjuje za 23,98% (sa  $36,63 \pm 1,25\%$  na  $27,84 \pm 1,26\%$ ,  $n = 3$ ,  $P = 0,003$ ), a isti tretman uzoraka izloženih anoksiji smanjuje alternativnu respiraciju za 16,99% (sa  $37,88 \pm 1,11\%$  na  $31,45 \pm 0,54\%$ ,  $n = 11$ ,  $P < 0,001$ ). Produžena reoksigenacija micelijuma (20 min) nije imala efekat na učešće alternativne u ukupnoj respiraciji (učešće od  $27,1 \pm 1,66\%$ ,  $n = 3$  za hipoksiju i  $30,03 \pm 3,26\%$ ,  $n = 4$  za anoksiju). Kod uzoraka izloženih hipoksičnom tretmanu, vrednosti dobijene nakon reoksigenacije su bile bliske kontrolnim vrednostima, dok je kod uzoraka izloženih anoksičnom tretmanu učešće alternativne respiracije u ukupnoj ostalo značajno veće i nakon reoksigenacije i to 29,04% nakon 10 ( $P < 0,001$ ) i 23,24% ( $P = 0,02$ ) nakon 20 min reoksigenacije (Slika 17).



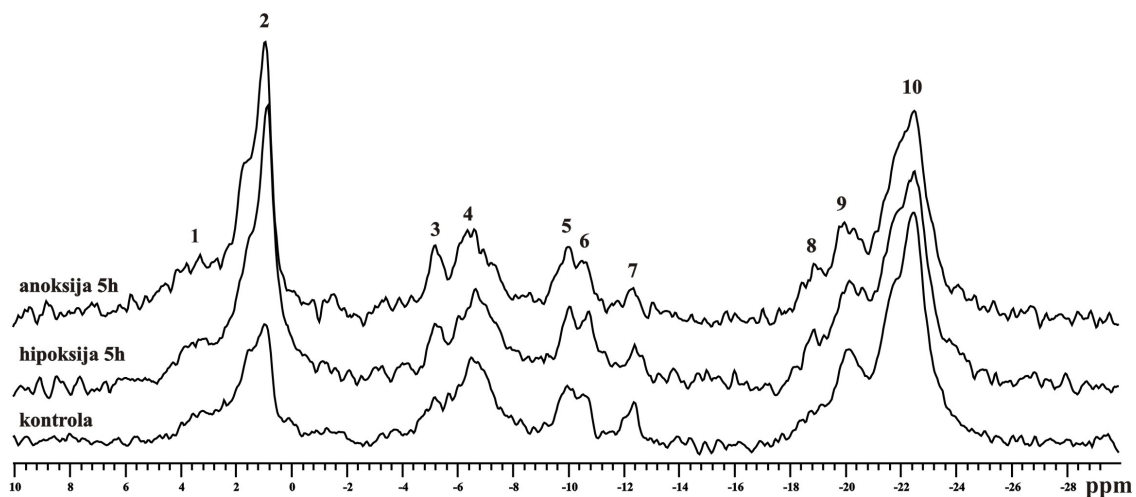
**Slika 17.** Reverzibilnost efekata hipoksije i anoksije na učešće alternativne respiracije u ukupnoj. Beli stubići – kontrola, crni stubići – tretman, svetlo sivi stubići – 10 min reoksigenacije, tamno sivi stubići – 20 min reoksigenacije. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu su označene sa \*, a u odnosu na tretman sa †.

#### 4.6. Efekti smanjene koncentracije kiseonika na metabolizam fosfatnih jedinjenja

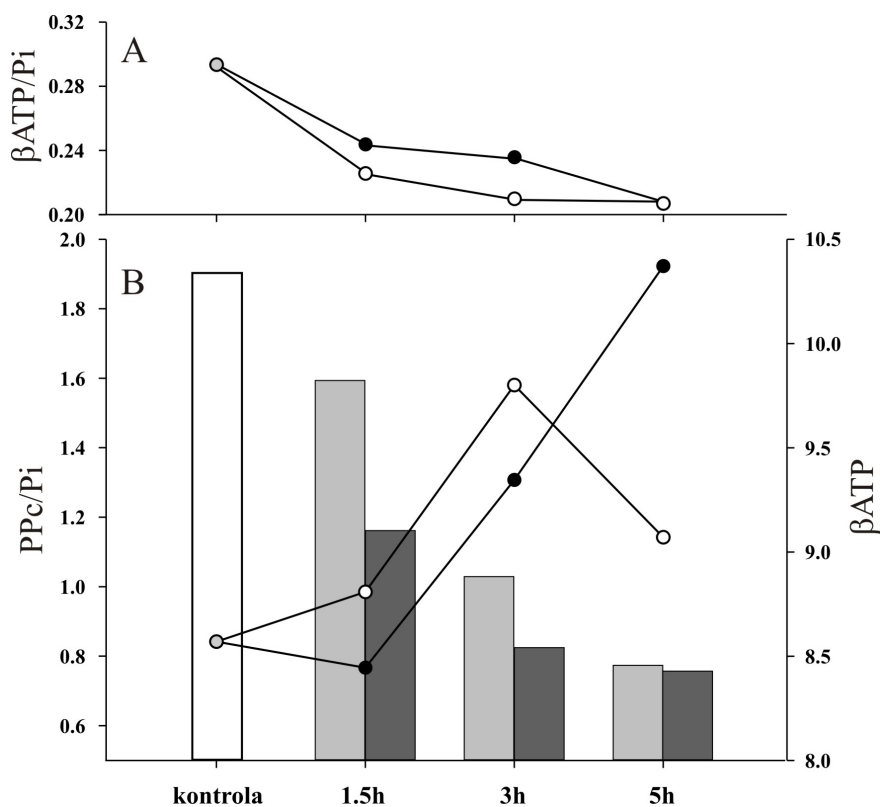
Efekat izlaganja micelijuma *P. blakesleeanus* hipoksičnim i anoksičnim uslovima na metabolizam fosfatnih jedinjenja je ispitan metodom  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopije. Kao i u eksperimentima sa merenjem potrošnje kiseonika, micelijum je izlagan hipoksičnim i anoksičnim uslovima tokom 5 h, a uzorkovanje je vršeno na 1,5 h, 3 h i 5 h. Dobijeni spektri su prikazani na Slici 18, a pojedinačni signali se mogu dodeliti sledećim jedinjenjima: (1) SP – fosfatni šećeri, (2) Pi – unutarćelijski

neorganski fosfati, (3)  $\gamma$  ATP -  $\gamma$  fosfat nukleotid trifosfata i  $\beta$  fosfat nukleotid difosfata, (4) PPt – krajnje fosfatne grupe PPn i pirofosfat, PPI, (5)  $\alpha$  ATP –  $\alpha$  fosfati nukleotid di- i trifosfata, (6) NAD(P)H/UDPG – nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat) i prvi signal uridildifosfat glukoze, (7) UDPG – drugi signal, (8)  $\beta$  ATP –  $\beta$  fosfat nukleotid trifosfata, (9) Ppp – pretposlednje fosfatne grupe PPn, (10) Ppc – centralne fosfatne grupe PPn. Razdvajanje signala neorganskih fosfata na citoplazmatične (Pic) i vakuolarne (Piv) je uočeno samo u nekoliko spektara i verovatno je posledica razlike u pH citoplazme i vakuole (Roberts, 1986). Zato će se u daljim razmatranjima ovi signali posmatrati kao jedinstveni signal unutarćelijskog neorganskog fosfata. Određivanje hemijskih pomaka je izvršeno poređenjem sa već poznatim  $^{31}\text{P}$  NMR spektrima (Živić et al., 2007).

Najupečatljivije promene u spektru su pad intenziteta signala centralnih grupa polifosfata (Ppc) i porast intenziteta signala unutarćelijskih neorganskih fosfata (Pi) (Slika 18). Ove promene dovode do smanjenja odnosa Ppc/Pi, koji predstavlja dobar indikator ćelijskog energetskeg statusa (Slika 19 B). U kontrolnim uslovima, Ppc/Pi odnos je bio 1,90, a u hipoksiji je opadao na 1,59 (16%); 1,03 (46%) i 0,77 (59%) nakon 1,5; 3 i 5 h tretmana, dok je u anoksiji opadao na 1,16 (39%); 0,82 (57%) i 0,76 (60%) u istim vremenskim tačkama. Energetski status ćelije se češće opisuje sadržajem ATP-a, koji je u  $^{31}\text{P}$  NMR spektru predstavljen  $\beta$  ATP signalom, pošto se  $\alpha$  i  $\gamma$  ATP signali preklapaju sa signalima ADP-a (Stubbs et al., 1996). Neočekivani efekat hipoksičnog i anoksičnog tretmana na micelijum gljive je povećanje signala  $\beta$  ATP, sa jedinim izuzetkom nakon 5 h anoksije, gde dolazi do njegovog pada (Slika 19 B). Da bi bio analiziran na isti način kao Ppc signal,  $\beta$  ATP signal je normalizovan na Pi signal (Slika 19 A). Promene  $\beta$  ATP/Pi odnosa su daleko manje nego promene Ppc/Pi odnosa. U kontrolnim uslovima  $\beta$  ATP/Pi odnos ima vrednost 0,29, a u hipoksiji opada na 0,24 (17%), 0,23 (21%) i 0,21 (28%) nakon 1,5; 3 i 5 h tretmana, a u anoksiji na 0,23 (21%), 0,21 (28%) i 0,21 (28%) u istim vremenskim tačkama. Ako se posmatra dinamika promene ova dva odnosa, primetno je još da je u oba slučaja pad odnosa signala brži u uslovima anoksije, kao i da se nakon 5 h ova dva tretmana po svom učinku izjednačavaju.

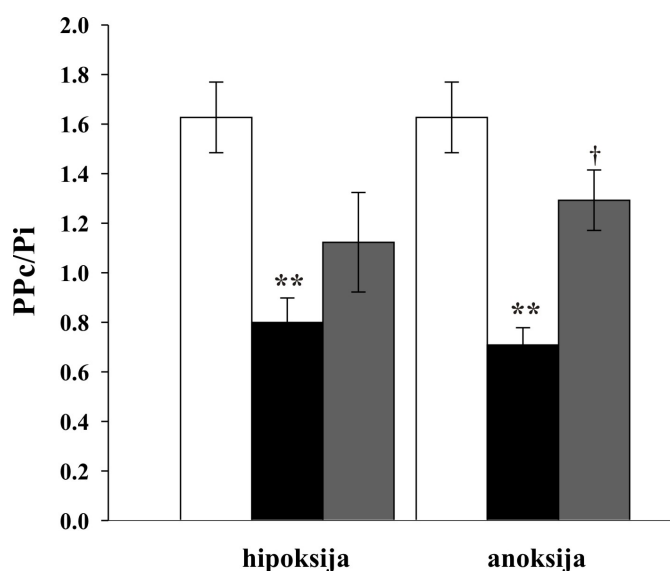


**Slika 18.** <sup>31</sup>P NMR spektar 24 h starog micelijuma *P. blakesleeanus* u kontrolnim uslovima i nakon 5 h izloženosti hipoksičnim i anoksičnim uslovima.



**Slika 19.** Promene u intenzitetima i odnosima intenziteta signala nakon 1,5h, 3h i 5h tretmana. A)  $\beta$  ATP/Pi odnos u kontroli - sivi krug, hipoksiji – crni krugovi i anoksiji – beli krugovi. B) PPc/Pi odnos u kontroli – beli stubić, hipoksiji – sivi stubići i anoksiji – beli stubići; intenzitet signala  $\beta$  ATP u kontroli – sivi krug, hipoksiji – crni krugovi i anoksiji – beli krugovi.

Kao i u eksperimentima sa merenjem potrošnje kiseonika, micelijumi izloženi hipoksičnim i anoksičnim uslovima 5 h su nakon toga reoksigenisani atmosferskim vazduhom u trajanju od 20 min (Slika 20). Nakon smanjenja sa  $1,63 \pm 0,14$  ( $n = 3$ ) u kontroli na  $0,80 \pm 0,1$  ( $n = 3$ ,  $P = 0,009$ ) u hipoksiji, PPc/Pi odnos je porastao na  $1,12 \pm 0,20$  ( $n = 3$ ) nakon reoksigenacije. U anoksičnim uslovima, PPc/Pi odnos je pao na  $0,71 \pm 0,07$  ( $n = 3$ ,  $P = 0,004$ ), da bi nakon reoksigenacije porastao na  $1,29 \pm 0,12$  ( $n = 3$ ,  $P = 0,014$ ). Odnos  $\beta$  ATP/Pi je dosegao i čak premašio vrednosti iz kontrolnog uzorka, dostigavši vrednosti od 0,34 nakon hipoksije/reoksigenacije i 0,37 nakon anoksije/reoksigenacije.



**Slika 20.** Reverzibilnost efekta hipoksije i anoksije na PPc/Pi odnos . Beli stubići – kontrola, crni stubići – tretman, tamno sivi stubići – 20 min reoksigenacija. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu su označene sa \*, a u odnosu na tretman sa †.

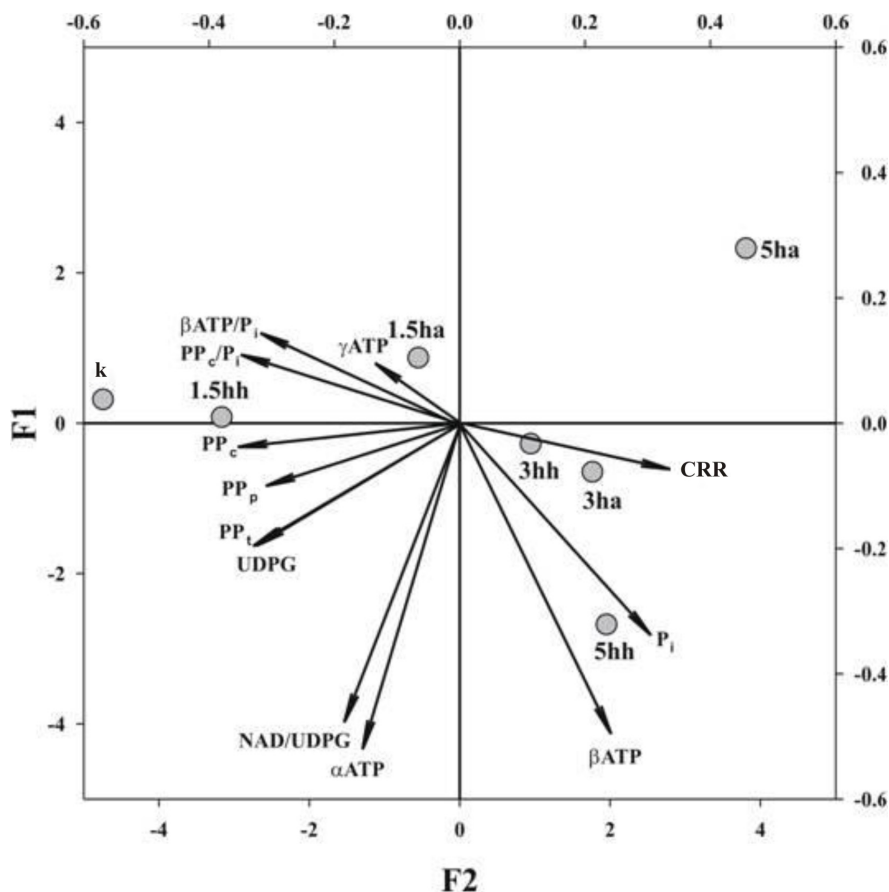
#### 4.7. Veza između ćelijske respiracije i metabolizma fosfatnih jedinjenja u uslovima smanjene koncentracije kiseonika

Za sumiranje efekata koje hipoksija i anoksija pokazuju na intenzitet  $^{31}\text{P}$  NMR signala i učešće AOX u ukupnoj respiraciji micelijuma *P.blakesleeanus* nakon 1,5 h, 3 h i 5 h tretmana, izvršena je korelacija podataka analizom glavnih komponenti (PCA). Rezultati su prikazani kao dvojni grafik da bi se mogli porediti tretmani i njihovi efekti. U analizi su korišćene dve ose od kojih jedna objašnjava 60% (F1) a druga 18% (F2) ukupne varijanse (Slika 21).

Osu F1 određuju intenziteti signala polifosfata (PPc, PPt i PPp), UDPG i Pi, kao i učešće alternativne respiracije u ukupnoj. Kao što se i moglo očekivati, postoji značajna korelacija između intenziteta različitih PPn signala sa vrednostima koeficijenta korelacije  $r > 0,85$  i  $P < 0.016$ . Intenzitet PPc signala je snažno pozitivno korelisan sa odnosom PPc/Pi ( $r = 0,956$ ,  $P < 0,001$ ) i snažno negativno korelisan sa intenzitetom Pi signala ( $r = -0,813$ ,  $P = 0,026$ ) kao i relativnom aktivnošću CRR ( $r = -0,902$ ,  $P = 0,006$ ). Promene intenziteta  $\beta$  ATP signala u hipoksiji i anoksiji su značajno pozitivno korelisane sa promenama intenziteta Pi signala ( $r = 0,914$ ,  $P = 0,004$ ), a negativno sa promenama odnosa PPc/Pi ( $r = -0,767$ ,  $P = 0,044$ ), ali nema statistički značajne korelacije sa promenama intenziteta PPc signala ( $r = -0,633$ ,  $P = 0,104$ ). Uprkos tome, očigledna je obrnuta zavisnost njihovih promena, sa jednim izuzetkom na 5 h anoksije (Slika 19 B), gde dolazi do naglog pada intenziteta  $\beta$  ATP signala. Intenzitet Pi signala, osim sa  $\beta$  ATP i PPc, pokazuje i značajnu korelaciju sa učešćem CRR u ukupnoj respiraciji ( $r = 0,854$ ,  $P = 0,014$ ).

F2 osu uglavnom određuju intenziteti ATP signala ( $\alpha$ -,  $\beta$ - i u manjoj meri  $\gamma$  ATP) i intenzitet NAD/UDPG signala.

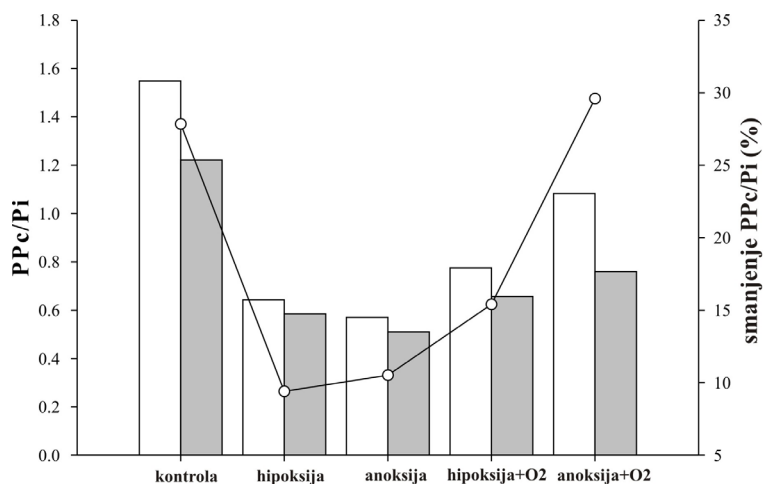
Analiza individualnih tretmana pokazuje da su oni poređani duž pravca određenog PPc i CRR signalima, počevši od kontrole na PPc strani, a završavajući sa anoksijom u trajanju od 3 h na CRR strani. To znači da intenzitet PPn signala polako opada počevši od kontrole, dok relativna aktivnost CRR i intenzitet Pi signala rastu. Očigledno je i da su ove promene brže u anoksiji. U 5-om h tretmana dolazi do odstupanja od ovakvog ponašanja i razilaženja hipoksičnog i anoksičnog tretmana po F2 osi, što je verovatno uzrokovano padom intenziteta  $\beta$  ATP signala nakon 5 h anoksije.



**Slika 21.** PCA dvojni grafik koji prikazuje zavisnost promena intenziteta  $^{31}\text{P}$  NMR signala i učešća AOX u ukupnoj respiraciji u kontrolnim uslovima (k), i nakon 1,5 h, 3 h i 5 h anoksije (1,5 ha, 3 ha i 5 ha) i hipoksije (1,5 hh, 3 hh i 5 hh).

Povezanost procesa izazvanih smanjenom koncentracijom kiseonika, a koji se ispoljavaju promenama u učešću alternativne u ukupnoj respiraciji, i promenama u metabolizmu fosfatnih jedinjenja, naročito PPn i ATP, je dalje ispitivana snimanjem  $^{31}\text{P}$  NMR spektara nakon dodavanja 10 mM natrijum azida ( $\text{NaN}_3$ ), snažnog inhibitora COX, micelijumu *P. blakesleeanus* u kontrolnim uslovima, nakon 5 h tretmana i nakon reoksigenacije. Iako cijanid i azid imaju slično dejstvo na respiraciju, utvrđeno je da cijanid ima dodatne efekte na PPc/Pi odnos, nezavisno od efekata na respiratorni lanac i o kojima će kasnije biti više reči, pa je zaključeno da je azid adekvatniji za ovakav eksperiment. Kao što je i očekivano,  $\text{NaN}_3$  je smanjio PPc/Pi odnos u svim uzorcima (Slika 22), ali najveći efekat je imao u kontroli i uzorcima koji su reoksigenisani nakon anoksije tj., smanjenje PPc/Pi odnosa za 27,85%, odnosno 29,6%. U uzorcima izloženim hipoksičnom i anoksičnom tretmanu, uticaj  $\text{NaN}_3$  je bio daleko slabiji, PPc/Pi odnos se smanjio svega 9,4% odnosno 10,52%, dok je uticaj  $\text{NaN}_3$  na uzorke

reoksisgenisane nakon hipoksije bio negde između ove dve grupe, smanjenje PPc/Pi odnosa je bilo 15,4% (Slika 22).



**Slika 22.** Efekat 10 mM NaN<sub>3</sub> na micelijum gljive *P. blakesleeanus* u kontroli, uzorcima izloženim hipoksiji i anoksiji, i reoksisgenisanim uzorcima. Beli stubići – PPc/Pi odnos pre dodavanja NaN<sub>3</sub>, sivi stubići - PPc/Pi odnos nakon dodavanja NaN<sub>3</sub>. Beli krugovi – procenat smanjenja odnosa PPc/Pi nakon dodavanja NaN<sub>3</sub>.

#### 4.8. Uticaj hipoksije i anoksije na klijanje spora i rast gljive *P. blakesleeanus*

Da bi utvrdili uticaj smanjene koncentracije kiseonika na klijanje spora gljive *P. blakesleeanus*, spore su odmah nakon inokulacije izložene tretmanu, a 8 h nakon toga proklijale i neproklijale spore su prebrojane pod mikroskopom pomoću hemocitometra. Utvrđeno je da hipoksija smanjuje procenat klijavosti na samo 6,8% a anoksija na 6,1% u odnosu na klijavost u standardnim uslovima koja iznosi 31,9%.

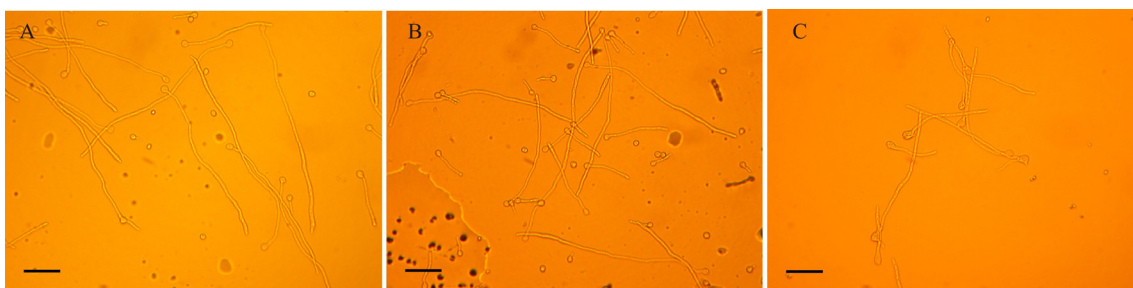
Pored toga, testiran je i uticaj hipoksije i anoksije na dužinu hifa i to u dva različita eksperimenta u kojima je micelijum izlagan tretmanu u različitim trenucima razvića. U prvom eksperimentu, micelijum star 24 h je izložen hipoksičnim i anoksičnim uslovima, a dužina hifa je merena nakon 1,5 h, 3 h i 5 h, što je vremenski okvir koji odgovara prethodno urađenim eksperimentima određivanja uticaja smanjene koncentracije kiseonika na ćelijsku respiraciju i metabolizam fosfatnih jedinjenja (Slika 23 i Tabela 3, eksperiment A). Iako je srednja vrednost dužine hifa izloženih hipoksičnim i anoksičnim uslovima uglavnom manja nego kod odgovarajućih kontrola, za ove razlike nije bilo statističke značajnosti.



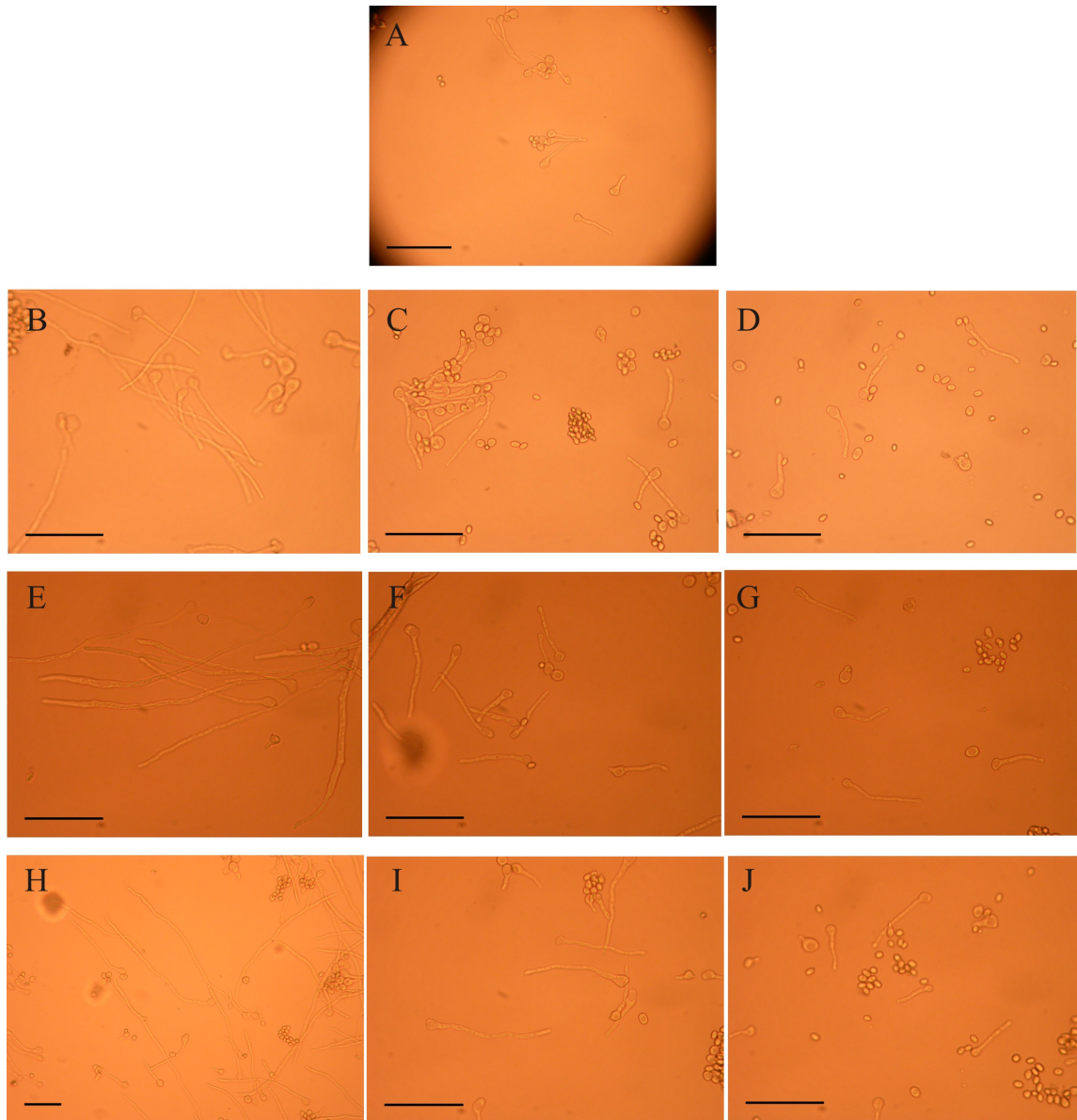
U drugom eksperimentu, micelijum star 12 h je izložen hipoksičnim i anoksičnim uslovima, a dužina hifa je merena na svaka 4 h sve do 24 h starosti. Rezultati su prikazani na Slici 24 i u Tabeli 3 (eksperiment B). Iz tabele se vidi da smanjena koncentracija kiseonika ne zaustavlja rast hifa u potpunosti jer i u hipoksičnim i u anoksičnim uslovima dostižu veću dužinu od dužine izmerene u kontrolnom micelijumu starom 12 h ( $P < 0,001$  za sve uzorke). Međutim, kada se tretirani uzorci uporede sa kontrolama koje im odgovaraju po starosti, više je nego očigledno da tretmani izazivaju značajno kašnjenje u rastu hifa ( $P < 0,001$  za sve uzorke).

**Tabela 3.** Dužina hifa u standardnim uslovima (kontrola) i nakon A) 1,5 h, 3 h i 5 h i B) 4h, 8 h i 12 h izlaganja hipoksičnim i anoksičnim uslovima. n – broj izmerenih hifa, kontrola 0 – kontrola u momentu izlaganja micelijuma tretmanu, kontrola 1, 2 i 3 – kontrole u prvoj, drugoj i trećoj tački uzorkovanja.

	Dužina (A) ( $\mu\text{m}$ )	n	Dužina (B) ( $\mu\text{m}$ )	n
<i>kontrola 0</i>	232.6 $\pm$ 18.8	104	36.7 $\pm$ 1.9	88
<i>kontrola 1</i>	289.9 $\pm$ 19.5	117	155.4 $\pm$ 7.9	59
<i>hipoksija</i>	290.1 $\pm$ 17.5	115	89.4 $\pm$ 4.7	44
<i>anoksija</i>	252.2 $\pm$ 12.1	140	59.2 $\pm$ 4.2	62
<i>kontrola 2</i>	255.9 $\pm$ 14.0	204	195.0 $\pm$ 13.0	65
<i>hipoksija</i>	238.6 $\pm$ 15.3	145	68.3 $\pm$ 3	113
<i>anoksija</i>	222.3 $\pm$ 8.5	200	74.8 $\pm$ 4.8	55
<i>kontrola 3</i>	255.3 $\pm$ 14.5	200	221.6 $\pm$ 14.2	122
<i>hipoksija</i>	222.7 $\pm$ 12.3	186	81.4 $\pm$ 4.7	122
<i>anoksija</i>	209.1 $\pm$ 9.1	178	61.2 $\pm$ 6.7	61



**Slika 23.** Fotografije hifa gljive *P. blakesleeanus* koje su u 24-tom satu razvića izlagane tretmanu hipoksije i anoksije tokom 5 h. A) kontrola stara 29 h, B) hipoksija 5 h, C) anoksija 5 h. Dužina linije u donjem levom uglu svake slike je 100  $\mu\text{m}$ . Uveličanje na mikroskopu je bilo x 100.



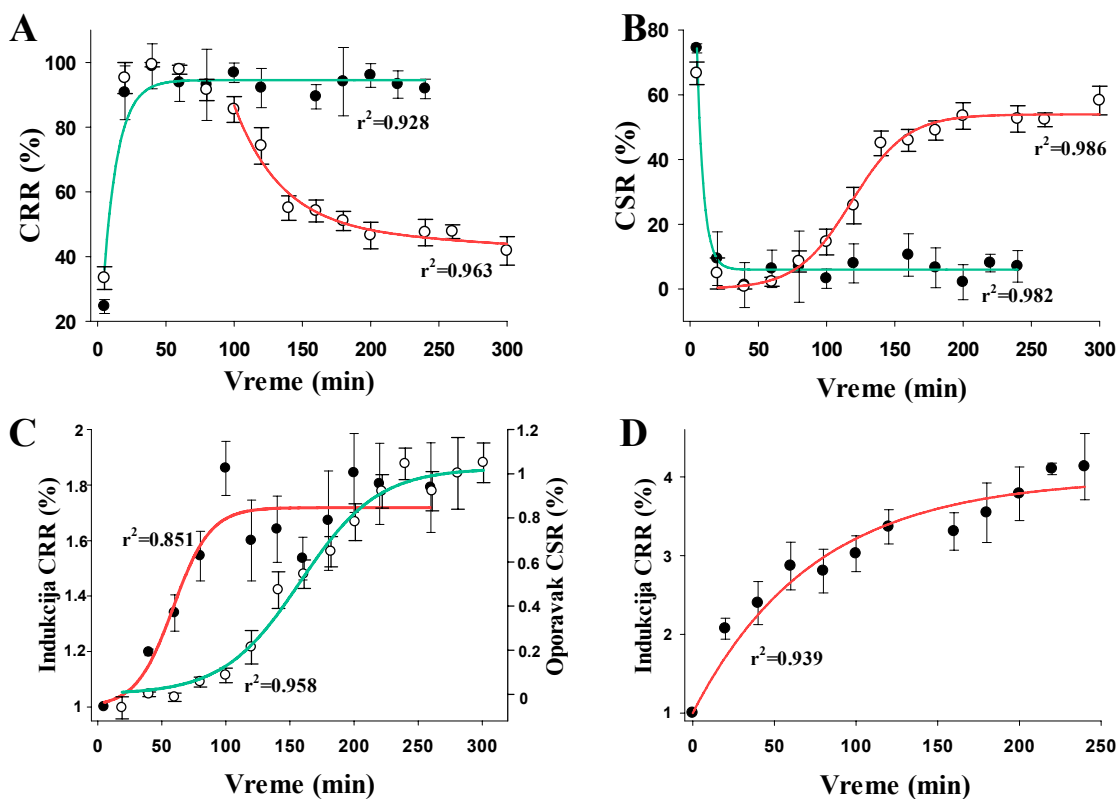
**Slika 24.** Fotografije hifa gljive *P. blakesleeanus* koje su u 12 h razvića izlagane tretmanu hipoksije i anoksije. Kontrola (A – 12 h, B – 16 h, E – 20 h i H – 24 h starosti), hipoksija (C – 4 h, F – 8 h i I – 12 h tretmana) i anoksija (D – 4 h, G – 8 h i J – 12 h tretmana). Dužina linije u donjem levom uglu svake slike je 100 µm. Uveličanje na mikroskopu je bilo x 200, osim za sliku H gde je bilo x 100 zbog veličine hifa.

#### 4.9. Uticaj različitih blokatora elektron transportnog lanca na učešće alternativne u ukupnoj respiraciji i metabolizam polifosfata

Antimicin A i cijanid deluju na različite enzime u elektron transportnom lancu, odnosno antimicin A inhibira Kompleks III a cijanid Kompleks IV, a njihov krajnji efekat prilikom akutne aplikacije je isti, blokada citohromske respiracije. U ranijim eksperimentima je već utvrđeno da inkubacija u antimicinu A povećava aktivnost cijanid neosetljive respiracije (Slika 14), pa je u sledećim eksperimentima upoređen rezultat dugotrajnog izlaganja (~5 h) micelijuma *P. blakesleeanus* cijanidu (5 mM) i antimicinu A (20  $\mu$ M).

Na Slici 25 A (beli kružići) je prikazan efekat inkubacije u 5 mM KCN na učešće cijanid neosetljive respiracije u ukupnoj respiraciji. Na početku inkubacije, odnosno u prvih 100 min, alternativna respiracija predstavlja jedini vid respiracije sa vrednostima učešća od preko 90% (20 min:  $95,18 \pm 4,82\%$ ; 40 min:  $99,32 \pm 0,68\%$ ; 60 min:  $97,75 \pm 1,41\%$ ; 80 min:  $91,51 \pm 3,27\%$ ; 100 min:  $85,47 \pm 3,99\%$ ,  $n = 5$  za sve tačke) pošto je klasična, citohromska respiracija inhibirana cijanidom. Međutim, od 100-tog minuta dolazi do naglog opadanja učešća CRR u ukupnoj respiraciji, a ovaj pad postaje sporiji oko 150-tog minuta i završava se na 200-tom kada CRR dostiže stabilne vrednosti učešća nešto manje od 50% (200 min:  $46,54 \pm 4,09\%$ ; 240 min:  $47,43 \pm 4,07\%$ ; 260 min:  $47,72 \pm 2,12\%$ ; 300 min:  $41,76 \pm 4,42\%$ ,  $n = 5$  za sve tačke). Među vrednostima učešća CRR na 100-tom i 140-om minutu ( $55,02 \pm 3,81$ ,  $n = 5$ ) razlika je i statistički značajna sa  $P = 0,004$ . Nakon 100-tog minuta respiracija postaje ponovo osetljiva na cijanid, odnosno učešće CSR u ukupnoj respiraciji počinje da raste (Slika 25 B, beli kružići). Ovaj oporavak je prikazan i na Slici 25 C (beli kružići), gde su aktivnosti CSR (u  $\mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$ ) u različitim vremenskim tačkama tokom eksperimenta normalizovane na aktivnost CSR u kontroli. Na 240 min aktivnost CSR dostiže aktivnost koji je imala u standardnim uslovima ( $\text{CSR}_{240}/\text{CSR}_k = 1,045 \pm 0,008$ ,  $n = 5$ ). Do oporavka CSR ne dolazi kada se micelijum *P. blakesleeanus* inkubira u antimicinu A (Slika 25 A i B, crni kružići), već respiracija ostaje cijanid neosetljiva sve vreme i raste u odnosu na početak inkubacije zbog indukcije CRR u antimicinu A (Slika 25 D,  $n = 3$  za sve tačke). Do značajnog porasta kapaciteta CRR (izraženo kao  $\text{CRR}_n/\text{CRR}_k$ ) dolazi i pri inkubaciji u KCN (Slika 25 C, crni kružići), ali ovaj porast prestaje oko 100-tog min, što je i momenat početka oporavka CSR. Prilikom inkubacije micelijuma

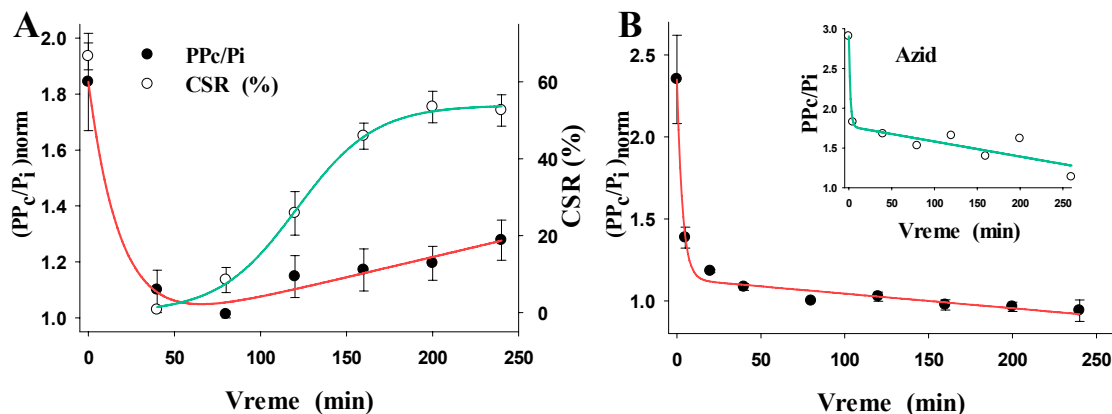
gljive *P. blakesleeanus* u  $\text{NaN}_3$  (5 mM), dobijeni su rezultati veoma slični onima dobijenim prilikom inkubacije u antimicinu A.



**Slika 25.** A) Učešće CRR (%) u ukupnoj respiraciji tokom 5 h inkubacije micelijuma gljive *P. blakesleeanus* u 5 mM KCN (beli kružići, crvena linija) i 20  $\mu\text{M}$  antimicinu A (crni kružići, zelena linija). B) Učešće CSR (%) u ukupnoj respiraciji tokom 5 h inkubacije u 5 mM KCN (beli kružići, crvena linija) i 20  $\mu\text{M}$  antimicinu A (crni kružići, zelena linija). C) Indukcija CRR tokom 5 h inkubacije u 5 mM KCN izražena kao  $\text{CRR}_n/\text{CRR}_k$  (crni kružići, crvena linija) i oporavak CSR tokom 5 h inkubacije u 5 mM KCN izražena kao  $\text{CSR}_n/\text{CSR}_k$  (beli kružići, zelena linija). CRR i CSR su u  $\mu\text{molO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{SM}}^{-1}$ . D) Indukcija CRR tokom 4 h inkubacije u antimicinu A izražena kao  $\text{CRR}_n/\text{CRR}_k$ . Linije u boji predstavljaju krive koje najbolje odgovaraju dobijenim vrednostima.

Kako je cijanid veoma isparljiv u kiseloj sredini, a medijum za gajenje *P. blakesleeanus* ima pH = 4.5, postoji mogućnost da je primećeni efekat oporavka citohromske respiracije zapravo posledica isparavanja cijanida. Koncentracija KCN u medijumu sa micelijumom je proverena argentomertijskom metodom po Libig-u nakon 5 h inkubacije i utvrđeno je da je koncentracija KCN u tom trenutku iznosila 1,29 mM, što je više nego dovoljno za potpunu inhibiciju citohromskog lanca.

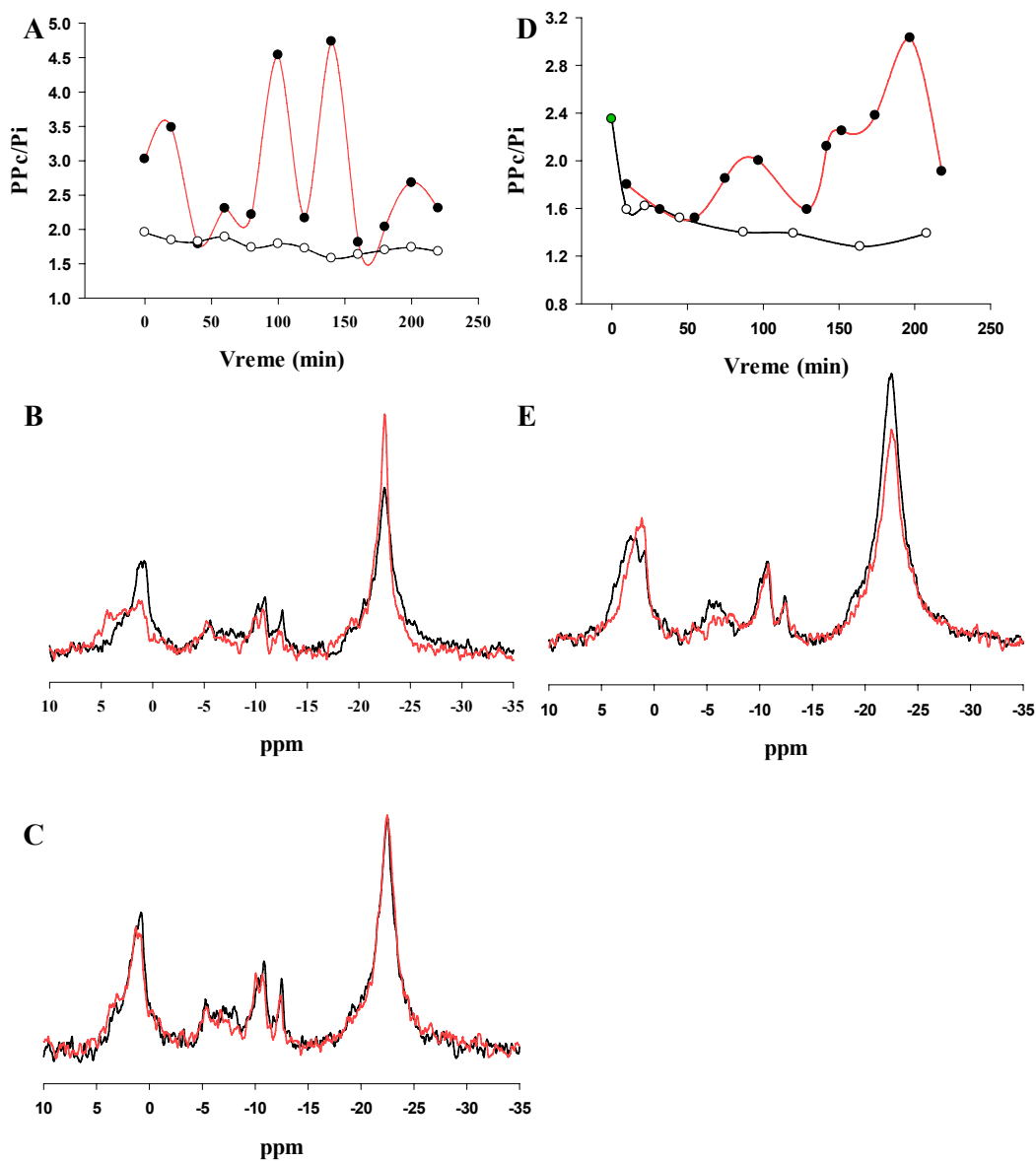
Na Slici 26 A (crni kružići) je prikazan odnos PPc/Pi tokom 5 h inkubacije micelijuma gljive *P. blakesleeanus* u 5 mM KCN. Odnos PPc/Pi je u svakoj tački normalizovan na minimalni PPc/Pi. Na početku tretmana došlo je do naglog pada PPc/Pi odnosa sa  $1,84 \pm 0,17$  na  $1,09 \pm 0,07$  u 40 min i  $1,01 \pm 0,01$  u 80 min gde se dostiže statistički značajan minimum ( $P = 0,045$ ). Nakon toga, odnos PPc/Pi polako raste (120 min:  $1,15 \pm 0,07$ ; 160 min:  $1,17 \pm 0,08$ ; 200 min:  $1,19 \pm 0,06$ ; 240 min:  $1,28 \pm 0,07$ ;  $n = 5$  za sve tačke) ali ne dostiže vrednost iz kontrole. Ako se uporede rezultati koji opisuju tok promena PPc/Pi sa onima koji opisuju promene u učešću CSR u ukupnoj respiraciji (Slika 26 A, beli kružići), zapaža se da oporavak PPc/Pi počinje nakon oporavka CSR, zatim raste sa vremenom, ali daleko manje i sporije nego CSR. Pri inkubaciji micelijuma *P. blakesleeanus* u antimicinu A (Slika 26 B) do ovakvog oporavka PPc/Pi odnosa ne dolazi. PPc/Pi odnos je normalizovan na odnos u 80 min, za koji je u eksperimentima sa KCN utvrđeno da je minimalan. Sa početnog odnosa od  $2,35 \pm 0,27$ , već u 5 min PPc/Pi opada na  $1,58 \pm 0,06$  i dalje na  $1,181 \pm 0,009$  (20 min) i  $1,09 \pm 0,02$  (40 min,  $n = 5$  za sve tačke). Dalje se ovaj odnos zadržava na vrednostima malo nižim od jedinice. Isto se dešava i pri merenju PPc/Pi odnosa kod micelijuma inkubiranog u azidu (Slika 26 B insert).



**Slika 26.** (A) Odnos PPc/Pi tokom 5 h inkubacije micelijuma *P. blakesleeanus* u 5 mM KCN (crni kružići, crvena linija); učešće CSR u ukupnoj respiraciji (beli kružići, zelena linija), (B) inkubacija u 20  $\mu$ M antimicinu A (crni kružići, crvena linija) i 5 mM azidu (insert). Linije u boji predstavljaju krive koje najbolje odgovaraju dobijenim vrednostima.

#### 4.10. Uticaj cijanida na $^{31}\text{P}$ NMR spektar micelijuma gljive *P. blakesleeanus*

U ranijim istraživanjima je utvrđeno da za razliku od azida, čije dodavanje uvek izaziva pad intenziteta PPc signala i porast intenziteta Pi signala (smanjenje PPc/Pi odnosa), cijanid ima suprotan efekat (*Zakrzewska et al., 2005*) na intenzitet ovih  $^{31}\text{P}$  NMR signala. Međutim, ovakav efekat cijanida se u kasnijim eksperimentima nije uvek ispoljavao. Da bi se utvrdilo da li postoji vremenska pravilnost u razlikama u efektu cijanida, kontrolni spektri i spektri sa dodatkom 10 mM cijanida su snimani naizmenično tokom 4 h, a u nekim slučajevima i više. Rezultati su potvrdili da se mogu razlikovati dva tipa efekta cijanida na odnos PPc/Pi, gde u jednom on izaziva malo, a u drugom veliko povećanje ovog parametra u odnosu na kontrolu i pokazali da se oni u vremenu pravilno smenjuju dajući efektu cijanida na odnos PPc/Pi oscilatorni karakter (Slika 27 A). Da bi se utvrdilo da li je ovakav efekat cijanida posredno uslovljen blokadom respiratornog lanca kao kontrola je korišćen micelijum inkubiran u antimicinu A kojem je na svakih 20 minuta dodavan akutno 10 mM KCN (Slika 27 D). Oscilatorni efekat cijanida nije inhibiran antimicinom A, što ukazuje da je on posledica njegovog direktnog delovanja na metabolizam polifosfata/fosfata a ne posredna posledica delovanja cijanida na respiratorni lanac. Isti rezultat je dobijen i prilikom inkubacije micelijuma u  $\text{NaN}_3$  (podaci nisu prikazani).



**Slika 27.** Efekat 10 mM KCN na  $^{31}\text{P}$  NMR spektar. A) Promene odnosa PPc/Pi u odnosu na kontrolu tokom 4 h (beli kružići – kontrola, crni kružići – 10 mM KCN). B) Reprerentativni spektar odgovora tipa I– jako povećanje PPc/Pi odnosa. C) Reprerentativni spektar odgovora tipa II– slabo povećanje PPc/Pi odnosa. D) Promene PPc/Pi odnosa nakon dodavanja KCN u odnosu na micelijum inkubiran u 20  $\mu\text{M}$  antimicinu A (zeleni kružić – kontrola, beli kružići – 20  $\mu\text{M}$  antimicin A, crni kružići – 10 mM KCN). E) Akutno dejstvo 20  $\mu\text{M}$  antimicina A na  $^{31}\text{P}$  NMR spektar.

Na slici 27 B i C se vidi da osim na signale PPc i Pi cijanid pokazuje dva tipa efekta i na niz drugih signala od kojih je naizrazitiji onaj na fosfatne šećere koje u slučaju povećanja odnosa PPc/Pi takođe karakteriše veliki porast. Promene intenziteta svih signala u odnosu na kontrolu su predstavljene u Tabeli 4 kao  $(I_{\text{tretman}} - I_{\text{kontrola}})/I_{\text{kontrola}} \times 100$ . U tabeli su prikazane i promene signala  $^{31}\text{P}$  NMR spektra micelijuma gljive *P. blakesleeanus* u odgovoru na akutno dodavanje 20  $\mu\text{M}$  antimicina A.

**Tabela 4.** Promene intenziteta  $^{31}\text{P}$  NMR signala micelijuma gljive *P. blakesleeanus* u odgovoru na akutno dodavanje cijanida i antimicina A. Promene intenziteta signala su prikazane kao  $(I_t - I_k)/I_k \times 100$ . Predznak predstavlja smer promene. SP 1 – signal fosfatnih šećera od 4 do 6 ppm; SP 2 – signal od 3 do 4 ppm; n – broj nezavisnih eksperimenata; P – statistička značajnost (\* - u odnosu na tip I odgovor; † - u odnosu na tip II odgovor). U koloni P simboli predstavljaju značajnost promene signala u odnosu na isti signal u prethodnoj koloni.

	KCN (10 mM)		Antimicin A	P
	tip I	tip II		
SP 1	157,08±29,47	16,51±6,85	-28,47±12,70	*,*†
SP 2	28,06±4,55	3,11±4,55	-22,98±8,35	*,*†
Pi	-28,39±2,44	-8,95±1,93	44,54±13,13	*,*†
$\gamma$ ATP	10,26±3,13	-5,90±3,19	-18,28±4,95	*,*
PPt	-27,16±2,75	-13,37±3,35	-1,49±9,14	*,*
$\alpha$ ATP	-17,23±2,42	-10,70±1,92	1,45±7,13	*,*†
NADH/UDPG	-20,66±1,51	-9,16±1,60	-0,38±2,92	*,*†
UDPG	-20,14±2,21	-14,44±2,12	-4,02±8,32	*,*†
$\beta$ ATP	12,34±2,98	-12,93±2,28	-4,64±5,97	*,*
PPc	31,24±6,72	-0,25±1,27	-10,63±2,19	*,*†
n	44	30	6	

Iz Tabele 4. se vidi da do najvećih promena zapravo dolazi kod tipa I odgovora i to u delu spektra gde se javljaju signali fosfatnih šećera. U delu spektra od 4 do 6 ppm signal se pojavljuje tek nakon tretmana, što se može videti i sa Slike 27B, dok se intenzitet signala u opsegu od 3 do 4 ppm značajno povećava. Kod tipa II odgovora na cijanid intenzitet signala fosfatnih šećera se gotovo i ne menja, dok u odgovoru na antimicin A dolazi do njegovog pada. Tip I odgovora na cijanid je specifičan i po porastu signala  $\gamma$  ATP i  $\beta$  ATP koji u slučaju tipa II odgovora na cijanid i akutno dejstvo antimicina A opadaju. Na kraju, tip I odgovora na cijanid karakteriše statistički



značajno veći pad intenziteta  $^{31}\text{P}$  NMR signala PPt,  $\alpha$  ATP, NADH/UDPG i UDPG kako u odnosu na tip II odgovora na cijanid tako i u odnosu na akutno dejstvo antimicina A. Kod tipa I odgovora na cijanid istovremeno dolazi do značajnog porasta PPc signala i pada PPt signala što znači da cijanid dovodi do produžavanja lanaca polifosfata na račun smanjivanja njihovog broja.

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Elementi respiratornog lanca kod gljive *P. blakesleeanus*

Rezultati dobijeni u eksperimentima u kojima je ispitivan efekat inhibitora cijanid osetljive i cijanid neosetljive respiracije, KCN i SHAM, na micelijumu i izolovanim mitohondrijama *P. blakesleeanus*, ukazuju da ova gljiva ispoljava oba ispitivana tipa respiracije. Kako se prema do sada dostupnoj literaturi CRR ne javlja samo u gljivama sposobnim za aerobnu fermentaciju (Veiga et al., 2000), dobijene informacije nisu iznenađujuće. Eksperimenti na mitohondrijama su izvedeni sa ciljem da se potvrdi da su promene brzine potrošnje kiseonika micelijuma izazvane efektima KCN-a i SHAM-a na CSR i CRR. Kako su inhibitori ispoljili isti efekat na micelijum i mitohondrije, može se potvrditi da je primećeni efekat SHAM-a posledica inhibicije CRR i da je micelijum dobar model sistem za dalje izučavanje CRR. Postojanje cijanid neosetljive respiracije je potvrđeno kod svih biljaka i većine gljiva (Siedow & Umbach, 2000; Minagawa & Yoshimoto, 1987), a enzim koji omogućava ovaj tip disanja je alternativna oksidaza – AOX (Veiga et al., 2003a; Siedow & Umbach, 2000; Joseph-Horne et al., 2001; Juárez et al., 2004). Kako je ponašanje CRR kod *P. blakesleeanus* identično onom do sada opisanom u literaturi (Vanlerberghe & McIntosh, 1997; Joseph-Horne et al., 2001; Veiga et al., 2003), može se zaključiti da je AOX odgovorna za cijanid neosetljivu respiraciju gljive *P. blakesleeanus*.

Kod *P. blakesleeanus*, alternativna oksidaza još uvek nije izolovana, ali genom gljive sadrži gensku sekvencu za AOX lociranu na grupaciji gena\_1:1158580-1159482 (Grigoriev et al., 2012; <http://genome.jgi-psf.org/Phybl2/Phybl2.home.html>). Sekvenca se sastoji od 903 nukleotida i ima tri egzona i dva introna, a predviđen je jedan transmembranski domen. U poređenju sa drugim sekvencama, pokazuje najveću identičnost sa neimenovanim proteinima *Rhizopus orizae* (72%) i *Mucor circinelloides* (71%), a visok stepen identičnosti pokazuje i u poređenju sa alternativnim oksidazama nekih biljnih vrsta kao što su *Cucumis sativus* (krastavac) (57%) i *Mangifera indica* (mango) (56%) (<http://genome.jgi-psf.org/Phybl2/Phybl2.home.html>).

Pokazano je da je micelijum *P. blakesleeanus* osetljiv na SHAM u svim fazama razvića (Slika 13 A), što znači da je AOX stalno aktivan tokom razvića, iako to nije

slučaj kod svih ispitanih gljiva. Na primer, u gametangijama zigomicetne gljive *Allomyces macrogynus*, AOX nije konstitutivno aktivan, već se njegova aktivnost postepeno povećava dodatkom cijanida u niskim koncentracijama (0,01 – 0,1 mM), inače nedovoljnim za inhibiciju citohromskog lanca (Heldt-Hansen et al., 1983a). Međutim, povećanje učešća CRR u ukupnoj respiraciji (Slika 13 A) ukazuje da je izvesna količina AOX u standardnim uslovima neaktivna. Stimulacija alternativne respiracije blokadom citohromskog lanca cijanidom ili antimicinom A, je primećena i kod gljiva *Yarrowia lipolytica* (Medentsev & Akimenko, 1999), *Pichia membranifaciens* i *Debaryomyces hansenii* (Veiga et al., 2003b). Kod *Y. lipolytica* je ovo povećanje bilo praćeno značajnim smanjenjem koncentracije ATP-a i povećanjem koncentracija ADP-a i AMP-a, za koje je poznato da stimulišu alternativnu respiraciju kod gljiva (Sakajo et al., 1997; Milani et al., 2001; Medentsev & Akimenko 1999; Umbach & Siedow 2000; Lambers 1982; Vanderleyden et al., 1980). Medentsev i sar. (1999) su efekat blokade citohromskog lanca objasnili kao aktivaciju AOX izazvanu povećanjem koncentracije AMP-a. Pored toga, <sup>31</sup>P NMR spektri gljive *P. blakesleeanus* su pokazali da koncentracija ATP-a opada oko 40% neposredno nakon dodavanja KCN (Živić, 2005). Kako je aktivacija CRR blokadom CSR veoma brza, Veiga i sar. (2003b) su ponudili objašnjenje po kom bi povećanje potrošnje kiseonika kroz alternativni put bilo prouzrokovano smanjenjem mitohondrijalnog transmembranskog potencijala do kog dolazi pri prelazu na alternativni respiratorni put koji ne omogućava transport protona. Alternativna respiracija izmerena nakon blokade citohromskog puta predstavlja kapacitet alternativne oksidaze (maksimalna moguća aktivnost enzima) i zavisi od prisutne količine proteina (Vanlerberghe, 2013).

Kod većine gljiva kapacitet CRR raste tokom razvića (Kirimura et al., 1987; Juárez et al., 2006), ali kod *P. blakesleeanus* on opada, sa najizrazitijim smanjenjem u prvih nekoliko sati nakon aktivacije spora (Slika 13 A). Ovo se može objasniti time što kod *P. blakesleeanus* količina citohroma značajno raste u prvih 8 sati klijanja (Keyhani et al., 1972), nakon čega gljiva prelazi većinski na citohromsku respiraciju. Na 20 h razvića je primećen minimum u alternativnoj respiraciji, bilo da se razmatraju relativne ili apsolutne vrednosti, ali i maksimum u ukupnoj respiraciji (Slika 13 A i Slika 12). Kako je *P. blakesleeanus* aerobna gljiva, moguće je da je smanjenje u alternativnoj odnosno povećanje u citohromskoj respiraciji izazvano postepenom povoljnom

promenom u uslovima gajenja. Naime, mlade hife *P. blakesleeanus* rastu vezane za dno petri kutije, a oko 20-og sata razvića prelaze na površinu medijuma gde je koncentracija kiseonika daleko veća.

Neočekivani rezultati koji se odnose na kapacitet CRR su dobijeni za aktivirane spore, gde je dodatak cijanida izazvao veliko povećanje respiracije (Slika 13 A i B). Kako je celokupna uvećana respiracija inhibirana dodatkom SHAM-a, ovo veliko povećanje se može pripisati alternativnoj respiraciji. Suprotno, kada se KCN doda nakon SHAM-a, on ispoljava uobičajeni inhibitorski efekat. Ovi rezultati navode na zaključak da je alternativna oksidaza u sporama zastupljenija od elemenata citohromskog lanca, ali je velikim delom neaktivna, a ovakvo objašnjenje je u saglasnosti sa rezultatima Kejhaniya i sar. (1972) prema kojima tek aktivirane spore, iako poseduju kompletan citohromski sistem, imaju veoma malo citohroma čija količina značajno raste u prvih 8 h klijanja. Samim tim, aktivacija alternativne respiracije cijanidom rezultuje u povećanju respiracije u odnosu na početnu. Kapacitet CRR kod spora gljiva je ispitivan još samo na jednoj vrsti, *M. rouxii*, gde je primećeno da sam KCN ne inhibira respiraciju, SHAM inhibira 35% respiracije, dok oba blokatora u potpunosti inhibiraju respiraciju (Salcedo-Hernandez et al., 1994). Nije, međutim, primećeno da dodatak cijanida aktiviranim sporama povećava brzinu respiracije (Cano-Canchola et al., 1988). Činjenica da spore ove dve vrste ispoljavaju respiratorne puteve koji se mogu međusobno kompenzovati ukazuje na njihovu bolju prilagođenost promenama spoljašnjih uslova u odnosu na micelijum. Teško je međutim, izvesti opšti zaključak, pošto su ove dve vrste filogenetski veoma bliske, a naročito ako se uzme u obzir raznovrsnost regulacije alternativne respiracije u semenu biljaka. Tako je, na primer, u semenima *Cicer arietinum* respiracija predominantno citohromska u prvih 12 h razvića, nakon čega procenat učešća alternativne respiracije raste (Burguillo & Nicolas, 1974). Nasuprot tome, u proklijalom semenu soje između 4 i 8 h razvića dolazi do prelaza sa većinski alternativne na citohromsku respiraciju (Yentur & Leopold, 1976). Nakon imbibicije, u semenu biljaka dolazi do velikog unosa kiseonika i visoke stope oksidativne fosforilacije koja je neophodna za energetski veoma zahtevan proces klijanja, pa je neizbežna i produkcija povećane količine ROS. Kako semena sadrže veoma male količine enzima za eliminaciju ROS (Tommasi et al., 2001), moguće je da

povećana aktivnost AOX u semenima nekih biljaka, pa tako i u sporama navedenih gljiva, predstavlja mehanizam za odstranjivanje reaktivnih kiseoničnih vrsta.

Poznato je da kod gljiva inhibicija citohromskog respiratornog puta animicinom A ili cijanidom dovodi do povećanja kapaciteta CRR (*Sherald & Sisler, 1970; Sakajo et al., 1993*). Kod *P. blakesleeanus*, potrošnja kiseonika osetljiva na SHAM raste skoro 3 puta u prvih 80 min inkubacije sa antimicinom A, što je sličan odgovor onom primećenom kod *P. anomala* gde CRR raste dva puta u prvih 30 min (*Minagawa & Yoshimoto, 1987*). Odgovor *P. blakesleeanus* na inhibiciju citohromskog puta je brži nego kod *A. niger*, gde brzina potrošnje kiseonika počinje da raste tek nakon 3 h inkubacije sa ovim blokatorom (*Kirimura et al., 1996*). Kako je za ceo proces, od indukcije ekspresije jedarnog gena AOX do insercije proteina u unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani i njegove aktivacije potrebno od 3 do 5 h (*Joseph-Horne et al., 2001*), može se pretpostaviti da je u indukciju povećane aktivnosti alternativne respiracije kod *P. blakesleeanus* uključen i neki proces brži od indukcije transkripcije u jedru. Da bi proverili ovu pretpostavku, povećanje i represija indukcije CRR su ispitivani pomoću metaboličkih inhibitora. Cikloheksimid i CCCP su u potpunosti sprečili povećanje CRR izazvano antimicinom A (Slika 14), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za *A. niger* (*Kirimura et al., 1996*). Cikloheksimid inhibira sintezu proteina u citoplazmi dok CCCP, dekuplujući agens, onemogućava energetski zavisani unos polipeptida u mitohondrije (*Joseph-Horne et al., 2001; Gasser et al., 1982; Nelson & Schatz, 1979*), pa prema tome dobijeni rezultati pokazuju da je povećanje CRR posledica *de novo* sinteze alternativne oksidaze u citoplazmi i njenog transporta u mitohondrije. Ekspresija AOX kod biljaka i gljiva je kontrolisana uglavnom na nivou aktivacije transkripcije (*Vanlerberghe & McIntosh, 1997*), ali je inhibitor transkripcije gena kod eukariota, aktinomicin D (Slika 14), pokazao veoma slabo dejstvo na smanjenje indukcije alternativne respiracije izazvane antimicinom A, pa se može zaključiti da indukcija sinteze alternativne oksidaze nije, ili je veoma slabo regulisana na transkripcionom nivou. Da bi se ova hipoteza potvrdila, neophodno je određivanje nivoa proteina i informacione RNK alternativne oksidaze u standardnim i datim eksperimentalnim uslovima.

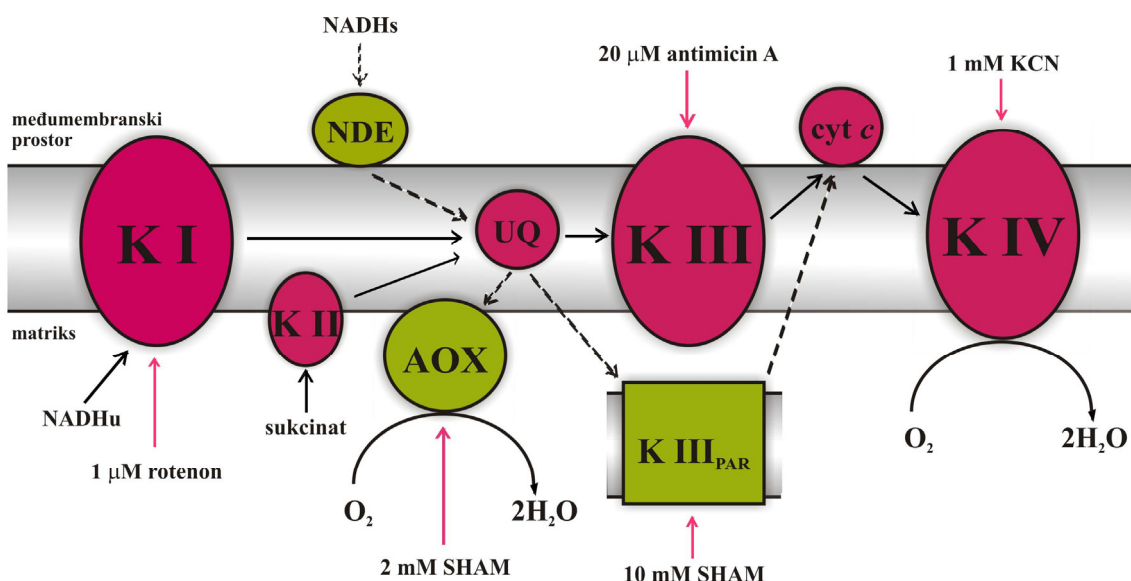
Micelijum *P. blakesleeanus* gajen u standardnim uslovima ispoljava cijanid osetljivu i cijanid neosetljivu respiraciju. Međutim, nakon nekoliko sati inkubacije u 20

$\mu\text{M}$  antimicinu A, javlja se novi tip respiracije koji je indukovano represijom citohromskog lanca, osetljiv je na KCN (1 mM) i visoke koncentracije SHAM-a (10 mM) ali neosetljiv na antimicin A i niske koncentracije SHAM-a (2 mM), koje bi inače bile dovoljne za inhibiciju CRR. Tip respiracije koji je neosetljiv na antimicin A i osetljiv na visoke koncentracije SHAM-a i KCN-a je pronađen kod gljive *C. parapsilosis* (Milani et al., 2001; Guerin & Camougrand, 1994), i autori su predložili postojanje respiratornog lanca paralelnog klasičnom citohromskom, a mesto razdvajanja bi bio ubihinon (Milani et al., 2001). Paralelni lanac *C. parapsilosis* se sastoji od  $\text{cytb}_{\text{PAR}}$  koji je osetljiv na visoke koncentracije SHAM-a (10 mM),  $\text{cytc}_{\text{PAR}}$  i  $\text{oxc}_{\text{PAR}}$  koji su osetljivi na 10 mM KCN. Kako kod *P. blakesleeanus* nema razlike u efektima visokih (10 mM) i niskih (1 mM) koncentracija KCN (Slika 15), može se zaključiti da ova gljiva nema elemenata respiratornog lanca koji bi odgovarali  $\text{cytc}_{\text{PAR}}$  i  $\text{oxc}_{\text{PAR}}$ , i treći tip respiracije se može pripisati komponenti respiratornog lanca koja odgovara  $\text{cytb}_{\text{PAR}}$  kod *C. parapsilosis* i osetljiva je na 10 mM SHAM. Osim toga, kod *M. rouxii*, vrste filogenetski veoma bliske *P. blakesleeanus* je pronađen dodatni citohrom (cyt o) koji ne pripada klasičnom citohromskom respiratornom lancu (Cano-Canchola et al., 1988), ali čija funkcija je ostala nepoznata. Na osnovu navedenih podataka, može se pretpostaviti da i *P. blakesleeanus* ispoljava treći tip respiracije sličan onome kod *C. parapsilosis*, ali za potvrđivanje ove hipoteze neophodna su detaljnija ispitivanja koja se tiču molekularne osnove ovog procesa.

Rotenon, blokator Kompleksa I je pri koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  i više doveo do inhibicije od oko 45% ukupne respiracije. Osim što je potvrđeno da *P. blakesleeanus* ima Kompleks I, očigledno je da kod ove gljive postoje i drugi načini ulaska elektrona u elektron transportni lanac. Postojanje Kompleksa I kod organizama koji imaju AOX je neophodno za održanje transmembranskog potencijala u uslovima kada funkcioniše samo alternativni respiratorni put, jer on tada predstavlja jedino mesto transporta protona iz matriksa u međumembranski prostor. Kod kvasaca je utvrđeno da je postojanje alternativnog puta uvek praćeno postojanjem Kompleksa I, dok kvasci koji su sposobni za aerobnu fermentaciju i ne poseduju AOX, najčešće nemaju ni kompleks I (Veiga et al., 2003b). Iako nakon primene rotenona više od 50% respiracije ostaje aktivno, u ovom stadijumu istraživanja se ne može tvrditi da *P. blakesleeanus* ima alternativne NADH dehidrogenaze, pošto elektroni ulaze u respiratorni lanac i preko

Kompleksa II. Međutim, iz rezultata dobijenih na izolovanim mitohondrijama može se naslutiti postojanje spoljašnje NADH dehidrogenaze, jer su mitohondrije oksidovale spolja dodat NADH koji ne prolazi unutrašnju mitohondrijalnu membranu (Veiga *et al.*, 2003b).

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, može se predložiti šema respiratornog lanca gljive *P. blakesleeanus*, koja osim klasičnih elemenata citohromskog respiratornog lanca, sadrži i enzim alternativnu oksidazu (AOX), komponentu koja zaobilazi Kompleks III (KIII<sub>PAR</sub>) i spoljašnju NADH:dehidrogenazu (NDE) (Slika 28).



**Slika 28:** Predlog šeme respiratornog lanca gljive *P. blakesleeanus*. Crvenom bojom su prikazani elementi klasičnog citohromskog respiratornog lanca, a zelenom dodatni, alternativni elementi. Punim strelicama je predstavljena putanja elektrona kroz citohromski respiratorni lanac, a isprekidane strelice prikazuju put elektrona kada su u respiratorni put uključeni alternativni elementi. Crvenim strelicama su označena mesta dejstva blokatora. NADHs – spoljašnji, citoplazmatski NADH; NADHu – unutrašnji, matriksni NADH.

## 5.2. Regulacija energetskog metabolizma gljive *P. blakesleeanus* kiseonikom

Regulacija alternativne respiracije kiseonikom je do sada proučavana uglavnom kod biljaka. U ćelijama soje koje su izlagane anoksiji tokom 16 h, nivo alternativne oksidaze je porastao (Amor *et al.*, 2000), a ova pojava je od strane autora povezana sa ulogom ovog enzima u odbrani od ROS (Maxwell *et al.*, 1999; Purvis, 1997). Nasuprot tome, kod korena ječma je i nakon pet dana hipoksije respiracija ostala cijanid osetljiva, čak i u uslovima koji aktiviraju AOX, što znači da u ukupnoj respiraciji preovladava

citohromski put (Szal et al., 2003). Kapacitet AOX se vratio na kontrolne vrednosti nakon 24 h reoksigenacije, a Western blot analiza proteina je pokazala da se nivo proteina menjao u skladu sa promenama u potrošnji kiseonika. Različita tkiva mogu reagovati na isti stres na različite načine i različitom brzinom. Skutnik i Rihter (2008) su izlagali listove i koren ječma hipoksiji u trajanju od 4 h i zaključili da se kapacitet AOX ne menja kod korena ali opada za 55% kod listova. Nakon anoksije, kada su uzorci vraćeni u aerisani medijum u trajanju od 1 h, kapacitet AOX je nastavio da se smanjuje kod listova, ali je značajno porastao u mitohondrijama korena, a količina proteina se menjala na isti način kao i njegov kapacitet. Smanjenje kapaciteta AOX uzrokovano smanjenom koncentracijom kiseonika kod biljaka se bar delom može objasniti manjim afinitetom AOX za kiseonik u odnosu na citohrom *c* oksidazu (Affourtit et al., 2001; Ribas-Carbo et al., 1994).

U ovom radu je pokazano da se kapacitet alternativne respiracije praktično ne menja kada je micelijum gljive *P. blakesleeanus* izložen hipoksičnim i anoksičnim uslovima, pošto brzina CRR opada veoma malo nakon tretmana (Tabela 2). Uzimajući u obzir da ukupna brzina respiracije opada značajno, taj pad se može pripisati prvenstveno smanjenju aktivnosti citohromskog puta odnosno citohrom *c* oksidaze (Tabela 2). Samim tim, učešće alternativne respiracije u ukupnoj je vremenom raslo, a nakon 5 h izloženosti tretmanima je bilo oko 50% veće nego u kontroli (Tabela 1). Kada je micelijum nakon 5 h tretmana izložen reoksigenaciji u trajanju od 10 min, učešće AOX u respiraciji je opalo i kod hipoksičnih i kod anoksičnih uzoraka (Slika 17). Dok se kod hipoksičnih uzoraka ono vratilo na nivo kontrole, micelijum izložen anoksiji je bio otporniji na ponovno uvođenje kiseonika, što se moglo i očekivati pošto je količina redukovane citohrom *c* oksidaze u anoksiji daleko veća nego u hipoksiji (Taylor & Moncada, 2010). Slično ponašanje AOX kao odgovor na smanjenu koncentraciju kiseonika je uočeno kod dimorfne gljive *M. rouxii*. Kod aerobno gajenog micelijuma se javljala samo cijanid osetljiva respiracija, dok se kod kvasca gajenog u anaerobnim uslovima javljala respiracija osetljiva i na cijanid i na SHAM. Osim toga, ćelije *M. rouxii* gajene u anaerobnim uslovima sadrže znatno manje količine citohroma *b* i *c*, i nimalo citohroma *aa<sub>3</sub>* (Cano-Canola et al., 1988; Salcedo-Hernandez et al., 1994), što ukazuje na povećanu upotrebu alternativnog respiratornog puta. Nasuprot tome, kod nekih kvasaca izlaganje micelijuma azotu sprečava indukciju AOX (Veiga et



al., 2003a), ali je kod bakterije *Novosphingobium aromaticivorans* (Stenmark & Nordlund, 2003) nivo ekspresije AOX veći u uslovima smanjene koncentracije kiseonika.

*M. rouxii* je dimorfna gljiva koja, u zavisnosti od koncentracije kiseonika ima oblik kvasca (anaerobni uslovi) ili filamentozne gljive (aerobni uslovi) a *P. blakesleeanus* je isključivo aerobna i filamentozna gljiva. U skladu sa tim, hipoksija i anoksija nisu izazvale nikakve promene u morfologiji gljive (Slika 23 i 24), ali su značajno smanjile brzinu rasta kod micelijuma starog 12 h (Slika 24 i Tabela 3). Kada su starije gljive (24 h) izložene istom tretmanu, ovaj efekat nije bio tako očigledan, verovatno zato što u ovoj fazi razvija *P. blakesleeanus* usporava rast i formira »rezervne vezikule«, strukture koje sadrže materije potrebne za razvoj sporangiofora (Bergman et al., 1969). Ipak, iz dobijenih rezultata postaje očigledno da *P. blakesleeanus* može da preživi uslove smanjene koncentracije kiseonika znatno duže nego što se mislilo.

Iz svega do sada iznesenog, može se pretpostaviti da su kod gljiva zastupljene bar dve različite strategije suočavanja sa manjkom kiseonika. Prva, u kojoj citohromska respiracija ima prednost nad alternativnom, je zastupljena kod većine biljaka i askomiceta. Druga strategija je uočena kod zigomicetnih gljiva, nekih prokariota i biljaka, koje više zavise od alternativne nego od citohromske respiracije u uslovima smanjene koncentracije kiseonika. Ovu drugu strategiju je teže objasniti, naročito imajući u vidu manji afinitet AOX za kiseonik u odnosu na COX kod biljaka (Affourtit et al., 2001; Ribas-Carbo et al., 1994) i smanjen kapacitet za produkciju ATP-a alternativnog puta u odnosu na citohromski (Joseph-Horne et al., 2001). Objašnjenje ovakve strategije se može pronaći u već utvrđenoj ulozi AOX u odbrani ćelije od ROS (Maxwell et al., 1999; Purvis, 1997). Aerobni organizam poput *P. blakesleeanus* teško može preživeti duge periode anoksije, pa adaptacija na uslove anoksije u ovom slučaju može biti manje važna od pripreme za potencijalnu reoksigenaciju. Jedna od trenutnih posledica reoksigenacije je povećanje ROS izazvano zasićenjem citohromskog elektron transportnog lanca elektronima. U ovakvim uslovima alternativni put omogućava preusmeravanje dela elektrona iz zajedničkog ubihinonskog depoa spasavajući ćeliju od oksidativnog stresa, što je i pokazano za ćelije soje (Amor et al., 2000; Vanlerberghe & McIntosh, 1997). Žrtvovanje dela potencijala za proizvodnju ATP-a i afiniteta za

kiseonik favorizovanjem alternativne respiracije nad citohromskom može spasiti gljivu od ozbiljnih oštećenja izazvanih oksidativnim stresom do kojih može doći po ponovnom uspostavljanju povoljnih uslova.

Pitanje koje ostaje nerazrešeno je kako *P. blakesleeanus*, koja, za razliku od *M. rouxii* nije sposobna za anaerobnu respiraciju, uspeva ne samo da održi već i da poveća nivo ATP-a u uslovima manjka kiseonika i smanjene aktivnosti citohromske respiracije (Slika 19 B i Slika 21). Džozef-Horn i sar. (1998) su predložili postojanje komponente alternativne respiracije u *G. graminis* koja bi imala mogućnost transporta protona. Paralelni respiratorni lanac, čije komponente nisu osetljive na iste inhibitore kao njima odgovarajući elementi citohromskog respiratornog lanca, je pronađen kod *C. parapsilosis* (Milani et al., 2001), a sada i kod *P. blakesleeanus* (Slika 15, Slika 28). Međutim, učešće ovog paralelnog lanca u produkciji ATP-a nije pokazano. Pored toga, Kompleks I ima ulogu u održavanju transmembranskog elektrohemijskog potencijala, ali nije poznato da u stresnim uslovima Kompleks I može toliko da poveća aktivnost da održi i čak premaši ATP produkciju potpuno funkcionalnog respiratornog lanca.

Drugo i verovatnije objašnjenje ovog fenomena je hidroliza polifosfata, molekula odgovornog za akumulaciju i skladištenje fosfata kod gljiva. PPn imaju važnu ulogu u regulaciji različitih biohemijških procesa u uslovima stresa, uključeni su u preživljavanje u uslovima osmotskog šoka (Yang et al., 1993), promene pH (Greenfield et al., 1987), nedostatka glukoze i fosfata (Bourne, 1991; Kulaev & Kulakovskaya, 2000), pa se može očekivati da PPn imaju ulogu i u odgovoru na stres kakav je smanjena koncentracija kiseonika. Međutim, dosadašnji podaci o promenama nivoa PPn kod gljiva su kontradiktorni. Kod *S. cerevisiae* je utvrđeno da nakon uzorkovanja ćelija koje se nalaze u logaritamskoj fazi rasteња iz medijuma bogatog glukozom, <sup>31</sup>P NMR spektri u oksigenisanim i anoksičnim uslovima ne pokazuju značajne razlike u intenzitetu PPn signala (den Holander et al., 1981). Međutim, kada su uzorkovane u toku stacionarne faze, kada je glukoza iz medijuma utrošena, <sup>31</sup>P NMR spektar u anoksičnim uslovima karakteriše drastično manji intenzitet PPn signala i veći intenzitet Pi signala u odnosu na spektar dobijen u oksigenisanim uslovima (den Holander et al., 1981; Campbell-Burk et al., 1987). Rezultati drugih istraživača pokazuju da kod ćelija u logaritamskoj fazi rasteња može doći do značajnog pada PPn signala pri prelasku iz oksigenisanih u anoksične uslove (Beauvoit et al., 1991), a treća studija, u kojoj je

objekat istraživanja bila *N. crassa* pokazuje da prelazak na anaerobne uslove u prisustvu izvora ugljenika ne dovodi do promena intenziteta PPn i Pi signala, dok kod gljiva uzetih iz medijuma bez izvora ugljenika dolazi do veoma malog pada intenziteta oba signala (*Pilatus & Techel, 1991*). Može se zaključiti da kod kvasaca prelazak u anaerobne uslove dovodi do sinhronizovanih promena u koncentracijama PPn i Pi koje mogu biti zavisne od stupnja razvića. Odsustvo ovakvog odgovora kod *N. crassa* može biti posledica posebnosti respiratornog lanca, pošto je već ukazano na mogućnost veze između koncentracije PPn i energetskeg metabolizma u mitohondrijama (*Beauvoit et al., 1989*), kao i veliku složenost i raznovrsnost elemenata respiratornog lanca kod gljiva. Sva navedena istraživanja se odnose na kratkotrajnu izloženost anoksiji, do 1 h.

Kao što se može videti na Slici 19 B i Slici 21, odnos PPc/Pi i u hipoksičnim i u anoksičnim uslovima opada postepeno sa vremenom što se može protumačiti kao sposobnost PPn da održi energetske i homeostazu fosfata u ćeliji bar nekoliko sati u uslovima stresa (*Freimoser et al., 2006*). Veoma malo smanjenje u  $\beta$  ATP/Pi odnosu i negativna korelacija PPc i  $\beta$  ATP podržavaju ovu pretpostavku. Poznato je da je depo PPn u ravnoteži sa depoom ATP-a kod bakterija preko enzima polifosfat kinaze (PPK1) koja katalizuje povratnu reakciju  $PPn + ATP \leftrightarrow PPn + ADP$  (*Kulaev & Kulakovskaya, 2000*), ali je homolog ovog enzima kod eukariota pronađen samo kod *D. discoideum* – DdPPK1 (*Hooley et al., 2008*). Kada se poredi sa PPK1 *E. coli*, DdPPK1 sadrži konzervirane ostatke za vezivanje ATP-a i autofosforilaciju ali na N-terminusu sadrži produžetak od 370 aminokiselina koje nisu homologe nijednom poznatom proteinu a neophodne su za funkcionisanje DdPPK1 (*Rao et al., 2009*). Nedavno je sinteza PPn zavisna od ATP-a otkrivena kod *C. humicola G-1* (*McGrath et al., 2005*) i mikorizne gljive *Glomus sp.* (*Tani et al., 2009*). Odgovarajući enzim izolovan iz *C. humicola* je specifičan po tome što koristi isključivo ATP kao donor fosfata za elongaciju PPn, a ne pokazuje aktivnost u prisustvu GTP, CTP ili TTP (guanozin-, citozin- i timin trifosfat). Ova osobina ukazuje na ulogu PPn u regulaciji energetskeg statusa ćelije (*McGrath et al., 2005*). Mutanti *D. discoideum* koji nemaju DdPPK1 i dalje pokazuju značajnu PPn sintetsku aktivnost, koja je vezana pre svega za vakuolu i acidokalcizome, zahvaljujući enzimu DdPPK2 (*Gómez-García & Kornberg, 2004*), tetrameru koji je sastavljen od tri proteina srodna aktinu. Sinteza PPn merena u membranskoj frakciji koja sadrži vakuole i acidokalcizome može se inhibirati i do 75% CCCP-om, toksinom koji ukida

membranski potencijal. Sinteza fosfoanhidridnih veza PPn-a od strane DdPPK2 je izgleda zavisna od protonskog gradijenta, što veoma podseća na sintezu neorganskih pirofosfata (*Belogurov et al., 2002*) i ATP-a (*Boyer 1997*).

Postojanje enzima kod *P. blakesleeanus*, odgovornog za sintezu PPn iz ATP-a i obratno, bi moglo objasniti inverzni odnos između intenziteta PPc i  $\beta$  ATP signala u hipoksiji i anoksiji. Pokazano je da PPn imaju ulogu u energetskom metabolizmu kao direktni donori fosfatne grupe u sintezi ATP-a (*Beauvoit et al., 1989*), a njihova uloga rezerve energije je već pokazana za *P. blakesleeanus* (*Živić et al., 2007*). Može se pretpostaviti da je smanjenje sinteze ATP-a u mitohondrijama odgovorno za inverzni odnos između intenziteta PPc i  $\beta$  ATP signala u hipoksiji i anoksiji. Ovakav zaključak podržavaju eksperimenti sa azidom, inhibitorom COX. Nakon dodavanja azida, odnos PPc/Pi se smanjuje neznatno u micelijumu izloženom hipoksiji i anoksiji, dok u kontroli i reoksigenisanim uzorcima odnos PPc/Pi značajno opada. Ovo bi moglo da znači da je azid smanjio sintezu ATP-a u mitohondrijama kontrolnog i reoksigenisanih uzoraka inhibicijom COX, što je dalje dovelo do povećane hidrolize PPn i sinteze ATP-a od ADP-a i Pi. Kako je u micelijumu izloženom hipoksiji i anoksiji COX već inhibirana, azid nije imao efekta na ove uzorke.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da postoji veza između respiratornog lanca u mitohondrijama i nivoa PPn, koju bi mogao predstavljati enzim ili enzimski kompleksi sa polifosfat kinaznom aktivnošću. Nedostatak kiseonika pogađa respiratorni lanac tako što inhibira COX ali ne i AOX, što može biti odraz pripreme micelijuma za reoksigenaciju i odbranu ćelije od ROS. Inhibicija COX dovodi do smanjenja sinteze ATP-a, koja pomera ravnotežu ovog hipotetičkog enzima ka hidrolizi PPn i sintezi ATP-a.

### **5.3. Oporavak citohromske respiracije prilikom inkubacije micelijuma *P. blakesleeanus* u cijanidu**

Akutno dejstvo cijanida dovodi do potpune inhibicije funkcionisanja citohromskog respiratornog lanca, međutim, izgleda da to nije slučaj pri inkubaciji micelijuma u 5 mM cijanidu (Slika 25 B i C). Prilikom inkubacije, u prvih ~100 min sva izmerena respiracija je bila alternativna, ali nakon toga postepeno dolazi do ponovnog uspostavljanja osetljivosti respiracije na 1 mM KCN, da bi se nakon 5 h,

brzina cijanid osetljive respiracije vratila na kontrolne vrednosti (Slika 25 C). Mogućnost da je primećeni efekat posledica isparavanja cijanida je testiran merenjem koncentracije cijanidnog jona u suspenziji micelijuma nakon 5 h i pokazano je da je ostalo 1,29 mM CN<sup>-</sup> što je dovoljno za inhibiciju COX. Treći tip disanja pronađen kod *P. blakesleeanus* (Slika 15) koji se javlja prilikom inkubacije u antimicinu A je osetljiv na 1 mM KCN, međutim, kako se ova koncentracija inhibitora već nalazi u suspenziji, primećeni efekat se ne može pripisati ni indukciji KIII<sub>PAR</sub>. Indukcija dodatnih terminalnih oksidaza se ne može isključiti, ali to svakako nisu cyt<sub>C<sub>PAR</sub></sub> i ox<sub>C<sub>PAR</sub></sub> koje su nađene kod *C. parapsilosis* (Milani et al., 2001; Guerin & Camougrand, 1994) posto su osetljive na visoke koncentracije KCN (10 mM). Brzina alternativne respiracije u periodu potpune inhibicije citohromske respiracije raste i postaje oko 70% veća od vrednosti u netretiranom micelijumu (Slika 25 C), što znači da je došlo do indukcije AOX kao i kod inkubacije u antimicinu A. Međutim, sa početkom oporavka cijanid osetljive respiracije, porast alternativne respiracije prestaje, a samo učešće CRR u ukupnoj respiraciji opada (Slike 25 A i C).

Prilikom inkubacije micelijuma *P. blakesleeanus* u antimicinu A situacija je drugačija, ne dolazi do oporavka cijanid osetljive respiracije (Slika 25 B), alternativna respiracija raste brže, rast se nastavlja i nakon 100 min (Slika 25 D) i njeno učešće u ukupnoj respiraciji nakon dostizanja maksimuma ne opada (Slika 25 A). Sve ovo navodi na zaključak da je za oporavak CSR odgovoran oporavak citohrom *c* oksidaze, koja je direktna meta inhibicije od strane KCN.

Oporavak funkcije citohrom *c* oksidaze je zabeležen u jetri miševa, pacova i džerbila. Nakon davanja subletalne doze ovog toksina, do oporavka je dolazilo u roku od 20 min do 1 h (Schubert & Brill, 1968), ali ovaj fenomen nije detaljnije opisan. Nuskova i sar. (2010) su pokazali da dodavanje piruvata u višku (60 mM na 250 μM KCN u izolovanim mitohondrijama) dovodi do visokog ali nekompletnog oporavka aktivnosti COX. Mehanizam ovog oporavka se zasniva na formiranju cijanohidrina (Nusková et al., 2010). Piruvat je krajnji produkt glikolize pa se prirodno nalazi u ćelijama, ali kako je za ovu reakciju potreban veliki višak piruvata, teško je zamisliti da ovaj mehanizam igra veliku ulogu u zaštiti COX od blokade cijanidom. Pored toga, najveći oporavak CSR se dešava između 1.5 h i 3 h inkubacije, a nakon 5 h u suspenziji

je i dalje bilo dovoljno KCN za potpunu blokadu citohromskog lanca, dakle formiranje cijanohidrina se može isključiti.

Mogući mehanizam oporavka COX tokom inkubacije micelijuma *P. blakesleeanus* u KCN je oslobađanje aktivnog mesta COX pomoću azot oksida – NO (Collman *et al.*, 2008). U osnovi inhibicije COX cijanidom je njegovo vezivanje za oksidovanu formu hem  $a_3$  ( $Fe^{3+}$ ) sa daleko većim afinitetom nego za  $Fe^{2+}$ , što dovodi do smanjenja redoks potencijala hem  $a_3$  sa +350 na +150 mV, čime je onemogućena dalja redukcija cyt *a* (Kojima & Palmer, 1983). Ovaj kompleks je stabilan u kiseoniku ali se pojavom superoksida ( $O_2^-$ ) redukuje do  $Fe^{2+}$  forme (Collman *et al.*, 2008). Povećanje koncentracije superoksida je primećeno u COX kada je hem  $a_3$  inhibiran različitim ligandima (CN<sup>-</sup>, CO) (Sipos *et al.*, 2003) a proizvodi se *in situ* u COX jednoelektronskom redukcijom  $O_2$  od strane  $Cu_A$ . NO ima izuzetno visok afinitet za redukovanu formu hem  $a_3$  i može zameniti CN<sup>-</sup> formirajući fero-nitrozil kompleks koji se dalje oksiduje od strane  $O_2^-$ , čime se regeneriše aktivan enzim (Collman *et al.*, 2008). Sam NO je takođe inhibitor COX ali ovakva „simbiotska“ interakcija između potencijalnog inhibitora – NO, i reaktivne kiseonične vrste –  $O_2^-$ , bi mogla igrati ulogu u zaštiti enzima od spoljašnjih inhibitora. NO sintaza (NOS) postoji kod gljiva pa i kod *P. blakesleeanus* (Ninnemann & Maier, 1996; Maier *et al.*, 2001). Livsli i sar. (2010) su pokazali na dopaminergičnim N27 ćelijama pacova i izolovanim mitohondrijama, da se inhibicija COX cijanidom može sprečiti NaNO<sub>2</sub> predtretmanom, pri čemu je dodavanje nitrita dovelo do povećanja unutarćelijske i mitohondrijalne koncentracije NO, međutim, toksičnost cijanida je ponovo uspostavljena primenom PTIO (2-fenil-4,4,5,5,-tetrametilimidazolin-1-oksil-3-oksil), selektivnog NO sakupljača (*scavenger*). Paradoksalno, isti autori (Leavesley *et al.*, 2008) su u drugom istraživanju primetili da niske koncentracije NO koje endogeno proizvodi NOS pojačavaju inhibiciju COX cijanidom, dok visoke koncentracije NO kakve se javljaju nakon dodatka NaNO<sub>2</sub> ćelijama u kulturi, imaju antagonistički efekat. Podaci o zaštitnom efektu NO na COX su dobijeni mahom na kulturama sisarskih ćelija, izolovanom COX enzimu i modelovanjem, tako da je pitanje koliko se od navedenog može primeniti na metabolizam gljiva, za koje zapravo nema nikakvih podataka o ovoj problematici.

Pojava oporavka, koja je primećena pri inkubaciji u cijanidu, se ne dešava pri inkubaciji u antimicinu A, a kako je mesto delovanja antimicina A različito (Kompleks

III) od mesta delovanja  $\text{CN}^-$  (COX), razumljivo je da isti način odbrane od inhibicije ne može biti primenjen. Međutim, pri inkubaciji u azidu, koji deluje na isto mesto kao  $\text{CN}^-$ , rezultati su slični onima dobijenim sa antimicinom A. Ovo može biti posledica različitog afiniteta vezivanja  $\text{N}_3^-$  za hem  $a_3$  u odnosu na  $\text{CN}^-$ .

Efekat oporavka se može pratiti i na nivou odnosa PPn/Pi (Slika 26 A) koji, iako očigledan, vidno zaostaje za oporavkom CSR. Odnos PPc/Pi nakon inicijalnog pada ne raste kada se micelijum *P. blakesleeanus* inkubira u antimicinu A i azidu (Slika 26 B), što podržava već predloženu hipotezu da nivo PPn direktno zavisi od aktivnosti citohromskog respiratornog lanca. Pri inhibiciji COX, bilo blokatorima, bilo smanjenom koncentracijom kiseonika, uvek dolazi do pada odnosa PPc/Pi signala, a nakon ponovnog uspostavljanja aktivnosti ovog enzima, raste i odnos PPc/Pi (Slika 26 A i Slika 20). Pri inkubaciji u antimicinu A i azidu, respiracija raste u poređenju sa inicijalnim momentom primene blokatora, ali na račun povećanja aktivnosti alternativne respiracije. Kako ne dolazi do oporavka PPc/Pi odnosa, jasno je da je za održavanje nivoa polifosfata u ćelijama *P. blakesleeanus* neophodan funkcionalan citohromski respiratorni lanac koji ima sposobnost formiranja transmembranskog protonskog gradijenta i sinteze ATP-a.

#### 5.4. Uticaj cijanida na promene intenziteta različitih signala u $^{31}\text{P}$ NMR spektru

$^{31}\text{P}$  NMR spektri gljive *P. blakesleeanus* sa dodatkom 10 mM KCN se mogu podeliti na dve jasne grupe uprkos tome što nije bilo nikakvih razlika u gajenju micelijuma ili eksperimentalnoj postavci (Slika 17 A, B i C). Razlike su najočiglednije u promenama intenziteta PPc i Pi signala, pa tako njihov odnos (PPc/Pi) u jednoj grupi rezultata pokazuje veliki (tip I odgovora), a u drugoj mali porast (tip II odgovora) nakon dodavanja cijanida u odnosu na kontrolni spektar. U toku eksperimenta koji je trajao 4 h, različiti odgovori na tretman su se naizmenično menjali dajući efektu cijanida na odnos PPc/Pi oscilatorni karakter (Slika 27 A). Osim PPc/Pi odnosa, najznačajnije razlike su primećene u delu spektra sa fosfatnim šećerima, a među njima se SP čiji se signali nalaze u opsegu 4-6 ppm pojavljuju tek sa dodatkom cijanida dok se oni u opsegu 3-4 ppm značajno povećavaju (Slika 27 B i Tabela 4). Pojava koja se može povezati sa ovako brzim promenama koncentracije šećera su glikolitičke oscilacije, koje predstavljaju oscilatorne promene u koncentracijama glikolitičkih intermedijera, a

vezuju se za oscilatorne promene aktivnosti fosfofruktokinaze – PFK (Hess, 1979; Aon et al., 1991). Koncentracije glikolitičkih intermedijera se u toku glikolitičkih oscilacija mogu menjati i za dva reda veličine (Hess, 1979) pa ovakve promene mogu biti zabeležene i manje osetljivom metodom kao što je  $^{31}\text{P}$  NMR. Najbolje su izučene kod kvasaca (Hess, 1979; Aon et al., 1991; Bier et al., 1996; Richard et al., 1994; Hald et al., 2012), primećene su u mozgu pacova (Shvets-Teneta-Gurii et al., 1998), a značaj im se pripisuje i u izlučivanju insulina iz  $\beta$ -pankreatičnih ćelija (Merrins et al., 2012; Bertram et al., 2009). Glikolitičke oscilacije se najčešće indukuju dodatkom cijanida nakon dodatka supstrata (npr. glukoze) što odgovara uslovima izvedenog eksperimenta jer je micelijum u NMR kivetu stavljan sa svežim eksperimentalnim medijumom. Prema literaturnim podacima, period glikolitičkih oscilacija može biti od 1 – 20 min (Goldbeter, 1996), što se uklapa u vremenski okvir oscilacija primećenih u eksperimentu.

Aon i sar. (1991) su primetili da svi procesi koji povećavaju potrebu za proizvodnjom ATP-a u glikolitičkom putu (inhibicija respiracije), kao i promena influksa glukoze u sistem, povećavaju težnju sistema da ispolji oscilatorno ponašanje. Isti autori su primetili da smanjenje citoplazmatskog ATP-a dovodi do indukcije oscilatornog ponašanja, ali ovo smanjenje ne mora biti posledica inhibicije sinteze ATP-a, već inhibicije mitohondrijalnog translokatora adeninskih nukleotida. Inhibiciju ovog translokatora izazivaju dugolančani acetyl-CoA-estri, čije je povećanje primećeno u mitohondrijama srca pacova izolovanih u prisustvu KCN (Paulson & Shug, 1984), a u ovakvim mitohondrijama je aktivnost translokatora adeninskih nukleotida bila izuzetno niska. Međutim, u spektrima *P. blakesleeanus*, nivo ATP-a raste (Tabela 4) u tipu I odgovora na cijanid, ali metoda koja je korišćena ne može ukazati na lokaciju tog ATP-a. Efekat cijanida na translokator adeninskih nukleotida može pružiti delimično objašnjenje primećenih razlika u efektu cijanida i antimicina A na spektre gljive *P. blakesleeanus* (Slika 27 E i Tabela 4), iako oba blokatora deluju u smislu smanjenja citohromske respiracije. U  $^{31}\text{P}$  NMR spektrima, 20  $\mu\text{M}$  antimicin A je smanjio intenzitete svih signala osim Pi, koji je značajno povećan, i  $\alpha$  ATP na koji ovaj blokator nije ispoljio nikakvo dejstvo. Kod *S. cerevisiae*, antimicin A je izazvao kratkotrajne i prigušene oscilacije (Aon et al., 1991), pa je verovatno da takav efekat, ako se i javio kod *P. blakesleeanus*, nije mogao biti zabeležen  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopijom. Smanjenje



transmembranskog potencijala u mitohondrijama ima prigušujući efekat na oscilacije (Aon *et al.*, 1991), pa ovaj fenomen može poslužiti kao još jedno objašnjenje razlike u efektima antimicina A i cijanida. Antimicin A deluje na Kompleks III respiratornog lanca, time ukidajući dva mesta na kojima dolazi do transporta protona, za razliku od cijanida koji dejstvom na Kompleks IV ukida samo jedno. Osim toga, Nuskova i sar. (2010) su prilikom poređenja efekata cijanida na afinitet COX prema kiseoniku, elektronski transport i transmembranski potencijal, zaključili da cijanid ima najveći inhibicioni efekat na O<sub>2</sub> afinitet, zatim na elektronski transport i tek na kraju na transmembranski potencijal. Nije poznato da li je upoređivanje ovih parametara rađeno i za antimicin A. Uzimajući sve navedeno u obzir, jasno je da se efekat cijanida na <sup>31</sup>P NMR spektre micelijuma gljive *P. blakesleeanus* najverovatnije ostvaruje preko dejstva na mitohondrije, a razlike efekata KCN i antimicina A se mogu pripisati suptilnim razlikama nastalim usled različitog mesta vezivanja i različitog mehanizma dejstva na citohromski lanac.

Za oscilatorne reakcije je pokazano da se odvijaju uz pozitivnu promenu entalpije, za razliku od istih reakcija koje se odvijaju u neoscilatornim uslovima uz negativnu promenu entalpije (Durup, 1979). Zato se smatra da je odvijanje reakcija na oscilatorni način energetski povoljno za sistem u kom se odvijaju (Hess, 1979).

Adeninski nukleotidi imaju značajnu ulogu u kontroli glikolitičkih oscilacija, a depo adeninskih nukleotida u ćeliji je u ravnoteži sa PPn (Kulaev i Kulakowskya, 2000). Do povećanja intenziteta signala fosfatnih šećera dolazi u istim spektrima u kojima se javlja i značajno povećanje odnosa PPc/Pi. Odatle je moguće pretpostaviti da promena koncentracije adeninskih nukleotida u citoplazmi nakon dodatka cijanida reguliše i glikolitičke oscilacije i nivo PPn, ali ne može se isključiti mogućnost da su ova dva procesa međuzavisna i na neki drugi, nepoznat način.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Gljiva *Phycomyces blakesleeanus* u standardnim uslovima ispoljava dva tipa respiracije, cijanid osetljivu i cijanid neosetljivu respiraciju. Za cijanid neosetljivu, odnosno alternativnu respiraciju je prvenstveno odgovoran enzim alternativna oksidaza – AOX.

2. AOX je kod *P. blakesleeanus* stalno prisutna tokom razvića, ali u standardnim uslovima nije sav prisutan enzim aktivan. Tako se mogu razlikovati aktivnost AOX (aktivnost u standardnim uslovima) i kapacitet AOX (maksimalna moguća aktivnost izazvana inhibicijom citohromskog lanca). Najveći kapacitet AOX ima u aktiviranim sporama.

3. Sinteza AOX se može indukovati inkubacijom u antimicinu A. Sinteza proteina se odigrava u citoplazmi nakon transkripcije sa jedarnog gena, a unos proteina u mitohondriju je energetski zavisian. Regulacija indukcije ovog proteina je najverovatnije na post-translacionom nivou.

4. Osim alternativne oksidaze, *P. blakesleeanus* ima i druge alternativne elemente respiratornog lanca. Jedan je Kompleks III<sub>PAR</sub> koji se može indukovati dugotrajnom blokadom respiratornog lanca inkubacijom u antimicinu A, a veoma je verovatno da poseduje i spoljašnju, citoplazmatsku alternativnu NADH:dehidrogenazu (NDE).

5. U odgovoru na smanjenu koncentraciju kiseonika, kapacitet AOX se ne menja. Kako se alternativnoj oksidazi pripisuje značajna uloga u odbrani ćelije od ROS, može se pretpostaviti da otpornost AOX na smanjenu koncentraciju kiseonika predstavlja strategiju pripreme micelijuma za reoksigenaciju i odbranu od neizbežnog nastanka velike količine ROS u tim uslovima.

6. U uslovima smanjene koncentracije kiseonika, odnos PPc/Pi opada, ali nivo ATP-a raste. Ovo se može objasniti postojanjem enzima ili enzimskog kompleksa sličnog bakterijskoj PPK, koji bi bio i spona između mitohondrijalnog respiratornog lanca i metabolizma polifosfata. Smanjena sinteza ATP-a u mitohondrijama izazvana

inhibicijom citohrom *c* oksidaze bi u ovakvim eksperimentalnim uslovima pomerila ravnotežu reakcije, koju taj enzim katalizuje, prema sintezi ATP-a iz PPn-a i ADP-a.

7. Smanjena koncentracija koseonika ne izaziva nikakve morfološke promene na micelijumu *P. blakesleeanus*, ali u zavisnosti od trenutka primene tretmana, može usporiti rast hifa.

8. Prilikom inkubacije micelijuma *P. blakesleeanus* u cijanidu, nakon 100 min počinje oporavak citohromske respiracije. U istim eksperimentalnim uslovima, oporavak je zabeležen i na nivou odnosa PPc/Pi, a do oporavka ovog parametra ne dolazi kada je za rast respiracije odgovorna povećana aktivnost AOX. Može se zaključiti da je za održavanje nivoa polifosfata u ćelijama *P. blakesleeanus* neophodan funkcionalan citohromski respiratorni lanac koji ima sposobnost formiranja transmembranskog protonskog gradijenta i sinteze ATP-a.

9. Akutno dejstvo cijanida nije ograničeno na respiratorni lanac, jer može izazvati periodične promene odnosa PPc/Pi kao i porast nivoa nekih fosfatnih šećera. Cijanid u ovom slučaju najverovatnije izaziva pojavu glikolitičkih oscilacija koje bi preko nivoa ATP-a mogle biti povezane sa promenama odnosa PPc/Pi.

## 7. LITERATURA

1. **Abdrakhmanova A., Zickermann V., Bostina M., Radermacher M., Schagger H., Kerscher S., Brandt U.** (2004) Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* 1658:148–156
2. **Ackrell B.A.C.** (2000) Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II. *FEBS Lett* 466, 1-5
3. **Affourtit C., Krab K., Moore A.L.** (2001) Control of plant mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 1504:58-69
4. **Ajayi W.U., Chaudhuri M., Hill G.C.** (2002) Site-directed mutagenesis reveals the essentiality of the conserved residues in the putative diiron active site of the trypanosome alternative oxidase. *J Biol Chem.* 277:8187-8193
5. **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** (2002) *Molecular Biology of the Cell*. Published by Garland Science, Taylor & Francis Group, New York
6. **Albury M.S., Affourtit C., Crichton P.G., Moore A.L.** (2002) Structure of the plant alternative oxidase. Site-directed mutagenesis provides new information on the active site and membrane topology. *J Biol Chem.* 277:1190-1194
7. **Albury M.S., Elliott C., Moore A.L.** (2009) Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants. *Physiol Plant* 137:316–327
8. **Amor Y., Chevion M., Levine A.** (2000) Anoxia pretreatment protects soybean cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase. *FEBS Lett.* 477:175-180
9. **Andersen J., Andresini W., Delihias N.** (1982) On the phylogeny of *Phycomyces blakesleeanus* nucleotide sequence of 5 S ribosomal RNA. *J. Biol. Chem.* 257: 9114-9118
10. **Andersson M.E., Nordlund P.** (1999) A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett.* 449: 17–22

11. **Andreeva N.A., Kulakovskaya T.V., Karpov A.V., Sidorov I.A., Kulaev I.S.** (1998). Purification and properties of polyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* cytosol. *Yeast* 14: 383-390
12. **Andreeva N.A., Kulakovskaya T.V., Kulaev I.S.** (1998a). Purification and properties of exopolyphosphatase isolated from *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles. *FEBS Lett.* 429: 194-196
13. **Andreeva N.A., Kulakovskaya T.V., Kulaev, I.S.** (2001) Two exopolyphosphatases of the cytosol of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparative characteristics. *Biochem. (Moscow)* 66: 147-153
14. **Andreeva N.A., Lichko L.P., Kulakovskaya T.V., Okorokov, L.A.** (1993). Characterization of polyphosphatase activity of vacuoles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. (Moscow)* 58: 737-744
15. **Aon M.A., Cortassa S., Westerhoff H.V., Berden J.A., Van Spronsen E., van Dam K.** (1991) Dynamic regulation of yeast glycolytic oscillations by mitochondrial functions. *J Cell Sci.* 99:325-334
16. **Archibald F.S. and Fridovich I.** (1982) Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 215: 589-596
17. **Atkinson G.F.** (1915) Phylogeny and relationships in the ascomycetes. *Ann. Missouri Botan. Gardens* 2:315-376
18. **Baldauf S.L.** (1999) A search for the origins of animals and fungi: Comparing and combining molecular data. *American Naturalist* 154: S178-S188
19. **Baldauf S.L., Palmer J.D.** (1993) Animals and fungi are each other's closest relatives, congruent evidence from multiple proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11558-11562
20. **Barton V., Fisher N., Biagini G.A., Ward S.A., O'Neill P.M.** (2010) Inhibiting *Plasmodium* cytochrome bc1: a complex issue. *Curr Opin Chem Biol* 14:440–446
21. **Beauvoit B., Rigoulet M., Guerin B., Canioni P.** (1989) Polyphosphates as a source of high energy phosphates in yeast mitochondria: A <sup>31</sup>P NMR study. *FEBS Lett* 252: 17-21

22. **Beauvoit, B., Rigoulet, M., Raffard, G. and Canioni, P.** (1991). Differential sensitivity of the cellular compartments of *Saccharomyces cerevisiae* to protonophoric uncoupler under fermentative and respiratory energy supply. *Biochem.* 30: 11212-11220
23. **Belevich I. & Verkhovsky M.I.** (2008) Molecular mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase. *Antioxid. Redox Signaling* 10: 1–29
24. **Belogurov G.A., Turkina M.V., Penttinen A., Huopalahti S., Baykov A.A., Lahti R.** (2002) H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. High yield expression in *Escherichia coli* and identification of the Cys residues responsible for inactivation by mersalyl. *J Biol Chem.* 277:22209-22214
25. **Berbee M.L., and Taylor J.W.** (1992) Two ascomycete classes based on fruiting body characters and ribosomal DNA sequence. *Mol. Biol. Evol.* 9: 278-284
26. **Bergman K., Burke P.V., Cerda'-Olmedo E., David C.N., Delbruck M., Foster K.W., Goodell E.W., Heisenberg M., Meissner G., Zalokar M., Dennison D.S., Shropshire Jr. W.** (1969) *Phycomyces*. *Bacteriol. Rev.* 33:99-157
27. **Berthold D.A., Voevodskaya N., Stenmark P., Gräslund A., Nordlund P.** (2002) EPR studies of the mitochondrial alternative oxidase. Evidence for a diiron carboxylate center. *J Biol Chem.* 277:43608-43614
28. **Bertram R., Budu-Grajdeanu P., Jafri M.S.** (2009) Using phase relations to identify potential mechanisms for metabolic oscillations in isolated  $\beta$ -cell mitochondria. *Islets.* 1:87-94
29. **Bianchet M.A., Pedersen P.L., Amzel L.M.** (2000) Notes on the mechanism of ATP synthesis. *J Bioenerg Biomembr.* 32:517-521
30. **Bier M., Teusink B., Kholodenko B.N., Westerhoff H.V.** (1996) Control analysis of glycolytic oscillations. *Biophys Chem* 62:15–24
31. **Blackwell M.** (2011) The fungi:1, 2, 3...5.1 millions species? *Am. J. Bot.* 98: 428-436
32. **Bölker M.** (2001). *Ustilago maydis* – a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiol.* 147: 1395-1401
33. **Booth J.W., Guidotti G.** (1995) An alleged yeast polyphosphate kinase is actually diadenosine-5', 5'''-P<sub>1</sub>,P<sub>4</sub>-tetraphosphate alpha,beta-phosphorylase. *J Biol Chem.* 270:19377-19382

34. **Bourne R.M.** (1991) Net phosphate-transport in phosphate-starved *Candida utilis*: relationship with pH and K<sub>p</sub>. *Biochim. Biophys. Acta* 1067:81-88
35. **Boyer P.D.** (1997) The ATP synthase-a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* 66:717-749
36. **Bradford M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
37. **Bricheux G. & Brugerolle G.** (1997) Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 153:205–213
38. **Burguillo P.F. & Nicolas G.** (1974) Respiratory activity during germination of seeds of *Cicer arietinum* L. I. Glycolysis and fermentation. *Plant Sci Lett* 3:143–148
39. **Burke P.V., Poyton R.O.** (1998) Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase. *J Exp Biol* 201:1163–1175
40. **Campbell-Burk S.L., Jones K.A., Shulman R.G.** (1987). <sup>31</sup>P NMR saturation-transfer measurements in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of phosphate exchange reactions by iodoacetate and antimycin A inhibition. *Biochem.* 26:7483-7492
41. **Cano-Canchola C., Escamilla E., Ruiz-Herrera J.** (1988) Environmental control of the respiratory system in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*, *J. Gen. Microbiol.* 134:2993-3000
42. **Cavalier-Smith T.** (1987) The origin of Fungi and pseudofungi. In *Evolutionary Biology of the Fungi* (ed. A. D. M. Rayner, C. M. Brasier and D. M. Moore), (Symp. Br. Mycol. Soc. 13), pp. 339-353. Cambridge University Press.
43. **Cavalier-Smith T.** (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* 73:203-266
44. **Ceredá-Olmedo E. & Lipson E.D.,** eds. (1987) *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory
45. **Ceredá-Olmedo E.** (2001). *Phycomyces and the biology of light and color.* *FEMS Microbiol. Rev.* 25:503-512

46. **Claisse M.L., Boze H., Dubreucq E., Segueilha L., Moulin G., Galzy P.** (1991) Characterization of alternative respiratory pathways in the yeast *Schwanniomyces castellii* by the study of mutants deficient in cytochromes a + a<sub>3</sub> and/or b. *Acta Biochim Pol.* 38:365-392
47. **Collman J.P., Dey A., Decreau R.A., Yang Y., Hosseini A., Solomon E.I., Eberspacher T.A.** (2008) Interaction of nitric oxide with functional model of cytochrome c oxidase. *PNAS* 105:9892-9896
48. **Considine M.J., Holtzapffel R.C., Day D.A., Whelan J., Millar A.H.** (2002) Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol* 129:949–953
49. **Cramer C.L. & Davis R.H.** (1984) Polyphosphate-cation interaction in the amino-containing vacuoles of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 259:5152-5157
50. **Dayhoff M.O.** (1976) Atlas of protein sequence and structure. National Biomedical Research Foundation 5, Washington
51. **de Paulo Martins V., Magnani Dinamarco T., Curti C., Uyemura S.A.** (2011) Classical and alternative components of the mitochondrial respiratory chain in pathogenic fungi as potential therapeutic targets. *J Bioenerg Biomembr* 43:81–88
52. **den Hollander J.A., Ugurbil K., Brown T.R., Shulman, R.G.** (1981). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the effect of oxygen upon glycolysis in yeast. *Biochem.* 20:5871-5880
53. **Dimroth P., von Ballmoos C., Meier T.** (2006) Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. *EMBO Rep* 7: 276–282
54. **Dunn T., Gable K., Beeler T.** (1994) Regulation of cellular Ca<sup>2+</sup> by yeast vacuoles. *J. Biol. Chem.* 269:7273-7278
55. **Durr M., Urech K., Boller T., Wiemken A., Schwencke J., Nagy M.** (1979) Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 121:169–175
56. **Durup J.** (1979) Amount of negentropy required for the appearance of a temporal pattern in biochemical processes. *New J Chem* 3:433-441



57. **Ferrero I., Viola A.M., Goffeau A.** (1981) Induction by glucose of an antimycin-insensitive, azide-sensitive respiration in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 47:11-24
58. **Fey T.G., Mannella C.A.** (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 25:319-324
59. **Freimoser F.M., Hürlimann H.C., Jakob C.A., Werner T.P., Amrhein N.** (2006) Systematic screening of polyphosphate (poly P) levels in yeast mutant cells reveals strong interdependence with primary metabolism. *Genome Biol*. 7:R109
60. **Gabaldon T., Rainey D., Huynen M.A.** (2005) Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J Mol Biol* 348:857–870
61. **Gamow I.R., Ruiz-Herrera J., Fischer P.E.** (1987). The cell wall of *Phycomyces*. In: Cerda-Olmedo E. & Lipson E.D., (eds.) *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory. 223-316
62. **Gasser S.M., Daum G., Schatz G.** (1982) Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent uptake of precursors by isolated mitochondria. *J Biol Chem* 257:13034–13041
63. **Gier B., Schagger H., Ortwein C., Link T.A., Hagen W.R., Brandt U., Von Jagow G.** (1995) Kinetic properties and ligand binding of the eleven-subunit cytochrome-c oxidase from *Saccharomyces cerevisiae* isolated with a novel large-scale purification method. *Eur J Biochem* 227:296–302
64. **Goldbeter A.** (1996) *Biochemical Oscillators and Biological Rhythms*. Cambridge University Press.
65. **Gómez-García M.R. & Kornberg A.** (2004) Formation of an actin-like filament concurrent with the enzymatic synthesis of inorganic polyphosphate. *PNAS* 101:15876-15880
66. **Gonzalez H. & Jensen T.E.** (1998) Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Stafilococcus aureus*. *Microbiol* 93:179-185

67. **Greenfield N.J., Mussadeq H., Lenard J.** (1987) Effect of growth state and amines on cytoplasmic and vacuolar pH, phosphate and polyphosphate levels in *Saccharomyces cerevisiae*: a <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance study. *Biochim. Biophys. Acta* 926:205-214
68. **Grigoriev I.V., Nordberg H., Shabalov I., Aerts A., Cantor M., Goodstein D., Kuo A., Minovitsky S., Nikitin R., Ohm R.A., Otiillar R., Poliakov A., Ratnere I., Riley R., Smirnova T., Rokhsar D., Dubchak I.** (2012) The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic Acids Res.* 40:D26-D32
69. **Guerin M.G. & Camougrand N.M.** (1994) Partitioning of electron flux between the respiratory chains of the yeast *Candida parapsilosis*: parallel working of the two chains. *Biochim Biophys Acta* 1184:111–117
70. **Hald B.O., Smrcinova M., Sørensen P.G.** (2012) Influence of cyanide on diauxic oscillations in yeast. *FEBS J.* 279:4410-4420
71. **Heckman D.S., Geiser D.M., Eidell B.R., Stauffer R.L., Kardos N.L., Hedges S.B.** (2001) Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293:1129-1133
72. **Heldt-Hansen H.P., Grant N.G., Olson L.W.** (1983) Respiration of gametangia of the aquatic phycomycete *Allomyces macrogynus*. Inhibition by cyanide or antimycin and salicylhydroxamic acid or propyl gallate, *Plant Physiol.* 73:111-117
73. **Heldt-Hansen H.P., Grant N.G., Olson L.W.** (1983a) The respiratory system of the aquatic Phycomycete *Allomyces macrogynus* wild-type and sexual mutants, *Exp. Microbiol.* 3:253-265
74. **Helmerhorst E.J., Murphy M.P., Troxler R.F., Oppenheim F.G.** (2002). Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1556:73– 80
75. **Helmerhorst E.J., Stan M., Murphy M.P., Sherman F., Oppenheim F.G.** (2005). The concomitant expression and availability of conventional and alternative, cyanide-insensitive, respiratory pathways in *Candida albicans*. *Mitochondrion* 5:200–211
76. **Hess B.** (1979) The glycolytic oscillator. *J Exp Biol* 81:7-14

77. **Hirst J.** (2010) Towards the molecular mechanism of respiratory complex I. *Biochem. J.* 425:327–339
78. **Hooley P., Whitehead M.P., Brown M.R.W.** (2008) Eukaryote polyphosphate kinases: is the ‘Kornberg’ complex ubiquitous? *Trends Biochemical Sciences.*33:577-582
79. **Hsieh P.C., Shenoy B.C., Jentoft J.E., Phillips N.F.B.** (1993) Purification of polyphosphate and ATP glucose phosphotransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra: evidence that poly(P) and ATP glucokinase activities are catalyzed by the same enzyme. *Protein Expr. Purif.* 4:76–84
80. <http://genome.jgi-psf.org/Phybl2/Phybl2.home.html>
81. **Huh W.K., Kang S.O.** (2001) Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochem J* 356: 595–604
82. **Hunte C., Palsdottir H., Trumpower B.L.** (2003) Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. *FEBS Lett* 545:39-46
83. **Igamnazarov, R.P., Valikhanov, M.N.** (1980). Hydrolysis of condensed phosphates by extracellular phosphohydrolase of cotton plant root system. *Physiol. Rastenii (Moscow)* 27:1947-1951
84. **Ivanov A.J., Vagabov V.M., Fomchenkov V.M., Kulaev I.S.** (1996) Study of the influence of polyphosphates of cell envelope on the sensitivity of yeast *Saccharomyces carlsbergensis* to the cytyl-3- methylammonium bromide. *Microbiology* 65:611–616
85. **Iwata S., Ostermeier C., Ludwig B, Michel H.** (1995) Structure at 2.8 A resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376:660–669
86. **Jacobson L, Helman M, Yariv J.** (1982) The molecular composition of the volutin granules of yeast. *Biochem. J.* 201:437–479
87. **Jarmuszkiewicz W., Behrendt M., Navet R., Sluse F.E.** (2002) Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development. *FEBS Lett.* 532:459-464

88. **Jiang W., Hermolin J., Fillingame R.H.** (2001) The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10. Proc Natl Acad Sci USA 98:4966–4971
89. **Joseph-Horne T. and Hollomon, D.W.** (2000) Functional diversity within the mitochondrial electron transport chain of plant pathogenic fungi. Pest. Manag. Sci. 56:24-30
90. **Joseph-Horne T., Hollomon D.W., Wood P.M.** (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. Biochim Biophys Acta 1504:179–195
91. **Joseph-Horne T., Wood P.M., Wood C.K., Moore A.L., Headrick J., Hollomon D.** (1998). Characterization of a Split Respiratory Pathway in the Wheat “Take-all” Fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. J Biol Chem 273:11127–11133
92. **Juárez O., Guerra G., Martínez F., Pardo J.P.** (2004) The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. Biochim Biophys Acta 1658:244–251
93. **Juárez O., Guerra G., Velázquez I., Flores-Herrera O., Rivera-Pérez R.E., Pardo J.P.** (2006) The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. FEBS J. 273:4603-4615
94. **Juszczuk I.M., Rychter A.M.** (2003). Alternative oxidase in higher plants. Acta Biochim Pol 50:1257–1271
95. **Kaila V.R.I., Verkhovsky M.I., Wikstrom M.** (2010) Proton-coupled electron transfer in cytochrome oxidase. Chem. Rev. 110:7062–7081
96. **Keasling J.D. & Hupf G.A.** (1996) Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 62:743-746
97. **Keefe A.D. & Miller S.L.** (1996) Potentially prebiotic synthesis of condensed phosphates. Orig. Life Evol. Biosph. 26:15-25
98. **Kern A., Hartner F.S., Freigassner M., Spielhofer J., Rumpf C., Leitner L., Fröhlich K.U., Glieder A.** (2007) *Pichia pastoris* ‘just in time’ alternative respiration. Microbiology 153:1250–1126
99. **Kerscher S.J.** (2000). Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. Biochim Biophys Acta 1459:274-283

100. **Keyhani J., Keyhani E., Goodgal S.H.** (1972) Studies of the cytochrome content of *Phycomyces* spores during germination. *Eur J Biochem* 27:527–534
101. **Keyhani S., Lopez J. L., Clark D. S., Keasling J.D.** (1996) Intracellular polyphosphate content and cadmium tolerance in *Anacystis nidulans* R2. *Microbios.* 88:105-114
102. **Kim H.J., Khalimonchuk O., Smith P.M., Winge D.R.** (2012) Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta* 1823:1604–1616
103. **Kim H.Y., Schllctman D., Shankar S., Xie Z.D., Chakrabarty A.M., Kornberg A.** (1998) Alginate, inorganic polyphosphate, GTP and ppGpp synthesis co-regulated in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for stationary phase survival and synthesis of RNA/DNA precursors. *Mol. Microbiol.* 27:717-725
104. **Kirimura K., Hirowatari Y., Usami S.** (1987) Alterations of respiratory systems in *Aspergillus niger* under the conditions of citric acid fermentation. *Agric Biol Chem* 51:1299–1303
105. **Kirimura K., Matsui T., Sugano S., Usami S.** (1996) Enhancement and repression of cyanide-insensitive respiration in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* 141:251-254
106. **Kojima N. & Palmer G.** (1983) Further characterization of the potentiometric behavior of cytochrome oxidase cytochrome *a* stays low spin during oxidation and reduction. *J Biol Chem* 258:14908–14913
107. **Konstantinov A.A.** (2012) Cytochrome c oxidase: Intermediates of the catalytic cycle and their energy-coupled interconversion. *FEBS Lett* 586 :630–639
108. **Kornberg A.** (1995) Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J Bacteriol.* 177:491-496
109. **Kornberg A., Rao N.N., Ault-Rich, D.** (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule with many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68:89-125
110. **Krauss S.** (2001) Mitochondria: structure and role in respiration. *Encyclopedia of life sciences.* Nature Publishing Group. 1-6

111. **Kulaev I. & Kulakovskaya T.** (2000) Polyphosphate and phosphate pump. *Annu Rev Microbiol.* 54:709-734
112. **Kulaev I., Vagabov V., Kulakovskaya T.** (1999) New aspects of polyphosphate metabolism and function. *J. Biosci. Bioeng.* 88:111–129
113. **Kulaev I.S. & Vagabov V.M.** (1983) Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 24:83–171
114. **Kulaev I.S.** (1979). *The biochemistry of inorganic polyphosphates.* J. Wiley and Sons, Chichester, New York.
115. **Kumble K.D., Kornberg A.** (1996) Endopolyphosphatases for long chain polyphosphate in yeast and mammals. *J. Biol. Chem.* 271:27146–27151
116. **Kusano S. & Ishihama A.** (1997) Functional interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with inorganic polyphosphate. *Genes to Cells* 2:433-441
117. **Lambers H.** (1982) Cyanide-resistant respiration: a non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Plant Physiol* 55:478–485
118. **Lambers H.** (1985) Respiration in intact plants and tissues: its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invited organisms. In: Douce C.R., Day D.A. (eds) *Encyclopedia of plant physiology, new series* 18. Springer-Verlag, Berlin, 444-448
119. **Leavesley H.B., Li L., Mukhopadhyay S., Borowitz J.L., Isom G.E.** (2010) Nitrite-mediated antagonism of cyanide inhibition of cytochrome c oxidase in dopamine neurons. *Toxicol Sci* 115:569–576
120. **Leavesley H.B., Li L., Prabhakaran K., Borowitz J.L., Isom G.E.** (2008). Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: implications for acute cyanide toxicity. *Toxicol Sci* 101:101–111
121. **Lee R.M, Hartman P.A., Stahr H.M., Olson D.G., Williams F.D.** (1994) Antibacterial mechanism of long chain polyphosphate in *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* 57:289-294
122. **Lemery N.** (1675) *Cours de Chymie contenant la maniere de faire les operations qui sont en usage dans la medecine, par une methode facile avec des raisonnements chaque operation, pour l'instruction de ceux qui veulent s'appliquer a cette science.* Lemery, Paris

123. **Leyva J.A., Bianchet M.A., Amzel L.M** (2003) Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F1-ATPase. *Mol Membr Biol* 20:27-33
124. **Lichko L., Kulakovskaya T., Kulaev I.** (2002) Effect of PPX1 inactivation on exopolyphosphatases of different cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1599:102-105
125. **Lichko L.P., Andreeva N.A., Kulakovskaya T.V. and Kulaev I.S.** (2003) Exopolyphosphatases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 3:233-238
126. **Lichko L.P., Kulakovskaya T.V., Kulaev I.S.** (1998) Membrane- bound and soluble polyphosphatases of mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and comparative characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1372:153-162
127. **Lichko L.P., Kulakovskaya T.V., Kulaev, I.S.** (1996) Characterization of the nuclear polyphosphatase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. (Moscow)* 61:361-366
128. **Lichko L.P., Okorokov L.A., Kulaev I.S.** (1982) Participation of vacuoles in regulation of K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and orthophosphate ions in cytoplasm of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *Arch. Microbiol.* 132:289–293
129. **Liebig J.** (1851) Titration of cyanide with silver nitrate. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 77:102–105
130. **Lobau S., Weber J., Senior A.E.** (1997) Nucleotide occupancy of F1-ATPase catalytic sites under crystallization conditions. *FEBS Lett* 404:15-18.
131. **Lobau S., Weber J., Senior A.E.** (1998) Catalytic site nucleotide binding and hydrolysis in F1F0-ATP synthase. *Biochemistry* 37:10846-10853.
132. **Lorin S., Dufour E., Boulay J., Begel O., Marsy S., Sainsard-Chanet A.** (2001) Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient mutant of *Podospora anserina*. *Mol Microbiol.* 42:1259-1267
133. **Ludwig B., Bender E., Arnold S., Hüttemann M., Lee I., Kadenbach B.** (2001) Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *ChemBiochem* 2:392–403

134. **Maier J., Hecker R., Rockel P., Ninnemann H.** (2001) Role of nitric oxide synthase in the light-induced development of sporangiophores in *Phycomyces blakesleeanus*. *Plant Physiology* 126:1323-1330
135. **Mannazzu I., Guerra I., Strabbioli R., Masia A., Maestrone G.B., Zoroddu M.A., Fatichenti F.** (1997) Vanadium affects vacuolization and phosphate metabolism in *Hansenula polymorpha*. *FEMS Microbiol* 147:23-28
136. **Mannella C.A., Frank J., Delihans N.** (1987) Interrelatedness of 5S RNA sequences investigated by correspondence analysis. *J.Mol.Evol.* 24:228-235
137. **Martinez-Cadena, G., Saavedra-Calixto, J., Messina-Valencia, G., Domínguez-Guitérrez, G., Novoa-Martinez, G.** (1995) Effect of carbon source and pH of the growth medium on spore germination of *Phycomyces blakesleeanus*. *Arch. Microbiol.* 164:231-234
138. **Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L.** (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:8271-8276
139. **McDonald A.E., Vanlerberghe G.C.** (2006) Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 1:357-364
140. **McDonald A.E., Vanlerberghe G.C., Staples J.F.** (2009) Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *J Exp Biol* 212:2627–2634
141. **McGrath J.W., Kulakova A.N., Kulakov L.A., Quinn J.P.** (2005) In vitro detection and characterisation of a polyphosphate synthesising activity in the yeast *Candida humicola* G-1. *Res Microbiol.* 156:485-491
142. **Medentsev A.G. & Akimenko V.K.** (1999) Development and activation of cyanide-resistant respiration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemistry (Mosc)* 64:945–951
143. **Meier T., Matthey U., von Ballmoos C., Vonck J., Krug von Nidda T., Kühlbrandt W., Dimroth P.** (2003) Evidence for structural integrity in the undecameric c-rings isolated from sodium ATP synthases. *J Mol Biol* 325:389–397



144. **Merrins M.J., Bertram R., Sherman A., Satin L.S.** (2012) Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase modulates oscillations of pancreatic islet metabolism. *PLOS One*. 7:e34036
145. **Milani G., Jarmuszkiewicz W., Sluse-Goffart C.M., Schreiber A.Z., Vercesi A.E., Sluse F.E.** (2001) Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. *FEBS Lett* 508:231–235
146. **Minagawa N. & Yoshimoto A.** (1987) The induction of cyanideresistant respiration in *Hansenula anomala*. *J Biochem* 101:1141–1146
147. **Miyoshi H.** (2005) Inhibitors of Mitochondrial Respiratory Enzymes. *J. Pestic. Sci.* 30:120–121
148. **Mizutani A., Miki N., Yukioka H., Tamura H., Masuko M.** (1996) A Possible Mechanism of Control of Rice Blast Disease by a Novel Alkoxyiminoacetamide Fungicide, SSF126. *Phytopathology* 86:295-300
149. **Moore A.L., Umbach A.L., Siedow J.N.** (1995) Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: a model of the active site. *J Bioenerg Biomembr* 27:367–377
150. **Murata K., Kato J., Chibata I.** (1979) Continuous production of NADP by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 21:887–895
151. **Nakamura K., Sakamoto K., Kido Y., Fujimoto Y., Suzuki T., Suzuki M., Yabu Y., Ohta N., Tsuda A., Onuma M., Kita K.** (2005) Mutational analysis of the *Trypanosoma vivax* alternative oxidase: the E(X)6Y motif is conserved in both mitochondrial alternative oxidase and plastid terminal oxidase and is indispensable for enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 334:593-600
152. **Nelson N. & Schatz G.** (1979) Energy-dependent processing of cytoplasmically made precursors to mitochondrial proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4365–4369
153. **Nicholls D.G. & Ferguson S.J.** (2002) *Bioenergetics 3*. Elsevier Science Ltd., London UK

154. **Ninnemann H. & Maier J.** (1996) Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochemistry and Photobiology* 64:393-398
155. **Nůsková H., Vrbacký M., Drahotka Z., Houšťek J.** (2010) Cyanide inhibition and pyruvate-induced recovery of cytochrome *c* oxidase. *J Bioenerg Biomembr.* 42:395-403
156. **Okorokov L.A., Lichko L.P., Kulaev I.S.** (1980) Vacuoles: the main compartment of potassium, magnesium and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *J Bacteriol.* 144:661–665
157. **Paulson D.J. & Shug A.L.** (1984) Inhibition of the adenine nucleotide translocator by matrix-localized palmitoyl-CoA in rat heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 766:70-76
158. **Perkins D.D. & Davis R.H.** (2000). *Neurospora* at the millennium. *Fungal Gen. Biol.* 31:153-167
159. **Perkins G.A., Renken C.W., van der Klei I.J., Ellisman M.H., Neupert W., Frey T.G.** (2001) Electron tomography of mitochondria after the arrest of protein import associated with Tom19 depletion. *Eur J Cell Biol.* 80:139-150
160. **Pestov N.A., Kulakovskaya T.V., Kulaev I.S.** (2004) Inorganic polyphosphate in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* at phosphate limitation and phosphate excess. *FEMS Yeast Res.* 4:643-648
161. **Pick U. & Weiss M.** (1991) Polyphosphate hydrolysis within acidic vacuoles in response to amino-induced alkaline stress in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 97:1234–1240
162. **Pick U., Bental M., Chitlaru E., Weiss M.** (1990) Polyphosphate-hydrolysis—a protective mechanism against alkaline stress? *FEBS Lett.* 274:15–18
163. **Pilatus U. & Techel D.** (1991) <sup>31</sup>P-NMR-studies on intracellular pH and metabolite concentrations in relation to the circadian rhythm, temperature, and nutrition in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* 1091:349-355

164. **Pogoryelov D., Yu J., Meier T., Vonck J., Dimroth P., Müller D.J.** (2005) The c15 ring of the *Spirulina platensis* F-ATP synthase: F1/F0 symmetry mismatch is not obligatory. *EMBO Rep* 6:1040–1044
165. **Purvis A.C.** (1997) Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol. Plantarum* 100:165-170
166. **Rao N.N., Gómez-García M.R., Kornberg A.** (2009) Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu Rev Biochem.* 78:605-647
167. **Rao N.N., Liu S., Kornberg A.** (1998) Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J. Bacteriol.* 180:2186-2193
168. **Ribas-Carbo M., Berry J.A., Azcon-Bieto J., Siedow J.N.** (1994) The reaction of the plant mitochondrial cyanide-resistant alternative oxidase with oxygen. *Biochim. Biophys. Acta* 1188:205-212
169. **Rich P.R.** (2003) The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans.* 31:1095-1105
170. **Richard P., Diderich J.A., Bakker B.M., Teusink B., van Dam K., Westerhoff H.V.** (1994) Yeast cells with a specific cellular make-up and an environment that removes acetaldehyde are prone to sustained glycolytic oscillations. *FEBS Lett.* 341:223-226
171. **Roberts J.K.M.** (1986) NMR methods for determination of intracellular pH. In: Linskens H.F. and Jackson J.F. eds. *Modern methods of plant analysis, Nuclear Magnetic Resonance*, Springer-Verlag, 2:106-124
172. **Roberts P.G. & Hirst J.** (2012) The Deactive Form of Respiratory Complex I from Mammalian Mitochondria Is a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter. *J Biol Chem.* 287:34743–34751
173. **Roger A.J., Sandblom O., Doolittle W.F., Philippe H.** (1999) An evaluation of elongation factor 1 $\alpha$  as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 16:218–233
174. **Ruy F., Vercesi A.E., Kowaltowski A.J.** (2006) Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. *J Bioenerg Biomembr.* 38:129-135

175. **Sakajo S., Minagawa N., Yoshimoto A.** (1993) Characterization of the alternative oxidase protein in the yeast *Hansenula anomala*. FEBS Letters 318:310-312
176. **Sakajo S., Minagawa N., Yoshimoto A.** (1997) Effects of nucleotides on cyanide-resistant respiratory activity in mitochondria isolated from antimycin A-treated yeast *Hansenula anomala*. Biosci Biotechnol Biochem 61:396–399
177. **Salcedo-Hernandez R., Escamilla E., Ruiz-Herrera J.** (1994) Organization and regulation of the mitochondrial oxidative pathway in *Mucor rouxii*, Microbiol. 140:399-407
178. **Saraste M.** (1999) Oxidative Phosphorylation at fin de siècle. Science 283:1488-1493
179. **Sazanov L.A. & Hinchliffe P.** (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. Science 311:1430–1436
180. **Schimek C., Eibel P., Grolig F., Horie T., Ootaki T., Galland P.** (1999). Gravitropism in *Phycomyces*: a role for sedimenting protein crystals and floating lipid globules. Planta 210:132-142
181. **Schubert J. & Brill W.A.** (1968) Antagonism of experimental cyanid toxicity in relation to the *in vivo* activity of cytochrome oxidase. JPET 162:352-359
182. **Seelert H., Poetsch A., Dencher N.A., Engel A., Stahlberg H., Müller D.J.** (2000) Proton-powered turbine of a plant motor. Nature 405:418–419
183. **Shelemekh O.V., Geïdebekht O.V., Plakunov V.K., Beliaev S.S.** (2006) "Oxygen regulation" of the respiratory chain composition in the yeast *Debaryomyces hansenii* under multiple stress. Mikrobiologiya. 75:562-569
184. **Shepherd M.G., Chin C.M., Sullivan P.A.** (1978) The alternate respiratory pathway of *Candida albicans*. Arch Microbiol. 116:61-67
185. **Sherald J.L. & Sisler H.D.** (1970) Antimycin A-resistant respiratory pathway in *Ustilago maydis* and *Neurospora sitophila*. Plant Physiol. 46:180-182

186. **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., Kita K.** (2013) Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110:4580-4585
187. **Shiba T., Tsutsumi K., Yano H., Ihara Y., Kameda A., Tanaka K., Takahashi H., Munekata M., Rao N.N., Konberg A.** (1997) Inorganic polyphosphate and the induction of ROS expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11210-11215
188. **Shirahama K., Yazaki Y., Sakano K., Wada Y., Ohsumi Y.** (1996) Vacuolar function in the phosphate homeostasis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant. Cell. Physiol.* 37:1090-1093
189. **Shvets-Teneta-Gurii T.B.; Dubinin A.G.; Alexandrov V.I.; Churkina T.S.; Polunina L.G.; Troshin G.I.** (1998) Fast glycolytic oscillations induced by potassium cyanide in the brain of behaving rats (potentiometric recording) *Bioelectrochem Bioenerg* 47:143-149
190. **Siedow J.N. & Umbach A.L.** (2000) The mitochondrial cyanideresistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta* 1459:432–439
191. **Siedow J.N., Umbach A.L., Moore A.L.** (1995) The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett* 362:10–14
192. **Siedow J.N., Umbach, A.L.** (1995). Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. *The Plant Cell* 7:821-831
193. **Simons B.H., Lambers H.** (1999) The alternative oxidase – is it a respiratory pathway allowing a plant to cope with stress? In: Lerner H.R. (eds) *Plant responses to environmental stresses from phytohormones to genome reorganization*. Plenum Press, New York, 265-286
194. **Sipos I., Tretter L., Adam-Vizi V.** (2003) Quantitative relationship between inhibition of respiratory complexes and formation of reactive oxygen species in isolated nerve terminals. *J Neurochem* 84:112–118

195. **Skorko R., Osipuk J., Stetter K.O.** (1989) Glycogen-bound polyphosphate kinase from Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. J. Bacteriol. 171:5162-5164
196. **Skutnik M. & Rychter A.M.** (2008) Differential response of antioxidant systems in leaves and roots of barley subjected to anoxia and post-anoxia. J. Plant Physiol. 166:926-937
197. **Stahlberg H., Müller D.J., Suda K., Fotiadis D., Engel A., Meier T., Matthey U., Dimroth P.** (2001) Bacterial Na<sup>+</sup>-ATP synthase has an undecameric rotor. EMBO Rep 2:229–233
198. **Stanić M., Živić M., Zakrzewska J.** (2009) Effects of anoxia on <sup>31</sup>P NMR spectra of *Phycomyces blakesleeanus* during development. Arch. Biol. Sci. 61:17-22
199. **Stenmark P. & Nordlund P.** (2003) A prokaryotic alternative oxidase present in the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*. FEBS Lett. 552:189-192
200. **Stock D., Leslie A.G., Walker J.E.** (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. Science 286:1700–1705
201. **Stubbs M., den Boogaart A.V., Bashford C.L., Miranda P.M.C., Rodrigues L.M., Howe F.A., Griffiths J.R.** (1996) <sup>31</sup>P-Magnetic resonance spectroscopy studies of nucleated and non-nucleated erythrocytes; time domain data analysis (VARPRO) incorporating prior knowledge can give information on the binding of ADP. Biochim. Biophys. Acta 1291:143–148
202. **Sutter R. P.** (1975) Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*. Proc. natn. Acad. Sci.U.S.A. 72:127-130
203. **Sutter R.P.** (1987) Sexual development. In: *Phycomyces*. Cerda-Olmedo, E. and Lipson, E.D., eds. Cold Spring Harbor Laboratory 223-316
204. **Szal B., Jolivet Y., Hasenfratz-Sauder M.P., Dizengremel P., Rychter A.M.** (2003) Oxygen concentration regulates alternative oxidase expression in barley roots during hypoxia and post-hypoxia. Physiol. Plantarum 119:494-502
205. **Tamura H., Mizutani A., Yukioka H., Miki N., Ohba K., Masuko M.** (1999) Effect of the methoxyiminoacetamide fungicide, SSF129, on respiratory activity in *Botrytis cinerea*. Pestic Sci 55: 681-686

206. **Tani C., Ohtomo R., Osaki M., Kuga Y., Ezawa T.** (2009) ATP-dependent but proton gradient-independent polyphosphate-synthesizing activity in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7044-7050
207. **Taylor C.T. & Moncada S.** (2010) Nitric oxide, cytochrome c oxidase, and the cellular response to hypoxia. *Arterioscl. Throm. Vasc.* 30:643-647
208. **Taylor J.W., Bowman B., Berbee M.L. & White T.J.** (1993) Fungal model organisms: phylogenetics of *Saccharomyces*, *Aspergillus* and *Neurospora*. *Syst. Biol.* 42:440-457
209. **Terry M.J., Williams L.E.** (2002) Fractionation of plant tissue for biochemical analyses. In: Gilmartin P, Bowler C (eds) *Molecular plant biology, Vol 2: A practical approach.* Oxford University Press, Oxford, pp 147–171
210. **Thioulouse J., Dolédec S., Chessel D., Olivier J.M.** (1997) ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat. Comput.* 7:75-83
211. **Tinsley C.R. & Gotschlich E.C.** (1995) Cloning and characterization of the meningococcal polyphosphate kinase gene: production of polyphosphate synthesis mutant. *Infect. Immun.* 63:1624-1630
212. **Tischner R., Planchet E., Kaiser W.M.** (2004) Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *FEBS Lett.* 576:151-155
213. **Titus D.E., Hondred D., Becker W.M.** (1983) Purification and characterization of hydroxypyruvate reductase from cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 72: 402–408
214. **Tolbert N.E.** (1974) Isolation of subcellular organelles of metabolism on isopycnic sucrose gradients. *Meth Enzymol* 31:734–746
215. **Tommasi F., Paciolla C., Cocetta de Pinto M., De Gara L.A.** (2001) Comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *J Exp Bot* 52:1647–1654
216. **Trumpower B.L.** (2002) A concerted, alternating sites mechanism of ubiquinol oxidation by the dimeric cytochrome bc(1) complex. *Biochim Biophys Acta.* 1555:166-173

217. **Umbach A.L. & Seidow J.N.** (2000) The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. *Arch Biochem Biophys* 378:234–245
218. **Umbach A.L. & Siedow J.N.** (1993) Covalent and noncovalent dimmers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol* 103:845–854
219. **Umbach A.L., Gonzalez-Meler M.A., Sweet C.R., Siedow J.N.** (2002) Activation of the plant alternative oxidase: insights from site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 1554:118–128
220. **Urech K., Durr M., Boller T., Wiemken A.** (1978) Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 116:275–278
221. **Vagabov V.M. & Kulaev I.S.** (1964) Inorganic polyphosphate in the roots of maize. *Dokl. Acad. Nauk SSSR.* 158:218-221
222. **Vagabov V.M., Trilisenko L.V., Shchipanova I.N., Sibeldina L.A., Kulaev I.S.** (1998) Changes in inorganic polyphosphate length during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. (Moscow)* 67:154-157
223. **Valikhanov M.N. & Sagdullaev J.N.** (1979) On the absence of high-molecular polyphosphates in chloroplasts of cotton plants. *Physiol. Rastenii (Moscow)* 26:116-122.
224. **Valikhanov M.N., Beknazarov B.O., Igamnazarov R.P.** (1980) Study of possible role of polyphosphates as a source phosphorus nutrition for cotton plants. *Physiol. Rastenii (Moscow)* 27:296-300
225. **Vanderleyden J., Peeters C., Verachtert H., Bertrand H.** (1980) Stimulation of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* by nucleoside phosphates. *Biochem J* 188:141–144
226. **Vanlerberghe G.C. & McIntosh L.** (1996) Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant-mitochondria. *Plant Physiol* 111:589–595
227. **Vanlerberghe G.C. & McIntosh L.** (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:703-734



228. **Vanlerberghe G.C.** (2013) Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14:6805-6847
229. **Vanlerberghe G.C., McIntosh L., Yip J.Y.H.** (1998) Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport. *Plant Cell* 10:1551–1560
230. **Vázquez-Acevedo M., Antaramian A., Corona N., Gonzalez-Halphen D.** (1993) Subunit structures of purified beef mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex from liver and heart. *J Bioenerg Biomemb* 25:401–410
231. **Veiga A., Arrabaça J.D., Loureiro-Dias M.C.** (2000) Cyanide resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation. *FEMS Microbiol Lett* 190:93–97
232. **Veiga A., Arrabaça J.D., Loureiro-Dias M.C.** (2003) Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Res.* 3:239-245
233. **Veiga A., Arrabaça J.D., Loureiro-Dias M.C.** (2003a) Stress situations induce cyanide-resistant respiration in spoilage yeasts. *J Appl Microbiol.* 95:364-371
234. **Veiga A., Arrabaça J.D., Sansonetty F., Ludovico P., Côrte-Real M., Loureiro-Dias M.C.** (2003b) Energy conversion coupled to cyanide-resistant respiration in the yeasts *Pichia membranifaciens* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 3:141-148
235. **Videira A. & Duarte M.** (2001) On complex I and other NADH:ubiquinone reductases of *Neurospora crassa* mitochondria. *J Bioenerg Biomembranes* 33:197–203
236. **Videira A.** (1998) Complex I from the fungus *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* 1364:89–100
237. **Voet D. & Voet J.G.** (1995) *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., USA
238. **Voet D., Voet J.G., Pratt C.W.** (2006) *Fundamentals of Biochemistry*. Second Edition, Copyright by John Wiley & Sons, Inc., USA

239. **Wagner A.M. & Krab K.** (1995) The alternative respiration pathway in plants: role and regulation. *Plant Physiol* 95:318–325
240. **Walker W.F. & Doolittle W.F.** (1982) Nucleotide sequences of 5S ribosomal RNA from four oomycete and chytrid water moulds. *Nucleic Acid Res.* 10:5717-5721
241. **Weber J. & Senior A.E.** (2001) Bi-site catalysis in F1-ATPase: does it exist? *J Biol Chem* 276:35422-35428.
242. **Weiss H., Friedrich T., Hofhaus G., Preis D.** (1991) The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur J Biochem* 197:563–576
243. **Whittaker R.H.** (1969) New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science* 163:150-160
244. **Wiemken A. & Durr M.** (1974) Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 101:45-57
245. **Wurst H. & Kornberg A.** (1994) A soluble exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269:10966-11001
246. **Yang Y.C., Bestos M., Chen K.J.** (1993) Effect of osmotic stress and growth stage on cellular pH and polyphosphate metabolism in *Neurospora crassa* as studied by 31-P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1179:141–47
247. **Yentur S. & Leopold A.C.** (1976) Respiratory transition during seed germination. *Plant Physiol* 57:274–276
248. **Yip J.Y. & Vanlerberghe G.C.** (2001) Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake. *Physiol Plant.* 112:327-333
249. **Yukioka H., Inagaki S., Tanaka R., Katoh K., Miki N., Mizutani A., Masuko M.** (1998). Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1442:161-169

250. **Zakrzewska J., Žižić M., Živić M.** (2005) The effect of anoxia on PolyP content of *Phycomyces blakesleeanus* mycelium studied by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1048:482-486
251. **Zara V., Conte L., Trumpower B.L.** (2009) Biogenesis of the yeast cytochrome bc1 complex. *Biochim Biophys Acta* 1793:89–96
252. **Zimmer E., Blanchard S., Boze H., Moulin G., Galzy P.** (1997) Glucose metabolism in the yeast *Schwanniomyces castellii*: role of phosphorylation site I and an alternative respiratory pathway. *Appl Environ Microbiol.* 63:2779-2784
253. **Živić M.** (2005) Identifikacija jonskih kanala I uloga polifosfata u rastenju kod gljive *Phycomyces blakesleeanus* (Burgeff), doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd
254. **Živić M., Zakrzewska J., Žižić M., Bačić G.** (2007) <sup>31</sup>P NMR study of polyphosphate levels during different growth phases of *Phycomyces blakesleeanus*. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 91:169-177
255. **Zoroddu M.A., Fruianu M., Dallochio R., Masia A.** (1996) Electron paramagnetic resonances studies and effects of vanadium in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMetals* 9:91-97
256. **Zwicker K., Galkin A., Dröse S., Grgić L., Kerscher S., Brandt U.** (2006) The redox-Bohr group associated with iron-sulfur cluster N2 of complex I. *J. Biol. Chem.* 281:23013–23017

## 8. BIOGRAFIJA

Marina Stanić je rođena 02.03.1977. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Školske 1998/99 je upisala Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, koji je završila 2007. godine, sa prosečnom ocenom 9,37. Školske 2007/08 je upisala doktorske studije Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, smer Neuronauke, modul Neurofiziologija sa biofizikom. Od 2008 do 2010 je bila zaposlena kao saradnik u nastavi na Državnom univerzitetu u Novom Pazaru, a od 2010 je zaposlena kao istraživač saradnik na odseku Nauka o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja. Tranutno je uključena na projekat Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja – OI173040 „Interakcija membrana sa unutarćelijskim i apoplastičnim prostorom: izučavanje bioenergetike i signalizacije koristeći biofizičke i biohemijske metode“. Član je društva biofizičara Srbije. Bila je član organizacionog odbora Regionalne biofizičke konferencije 2012. u Kladovu, Srbija. Autor je i koautor više publikacija, a rezultati predstavljeni u doktorskoj disertaciji publikovani su u radovima:

1. Živić M., Zakrzewska J., Stanić M., Cvetić T., Živanović B., (2009) Alternative respiration of fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 95:207-217
2. Stanić M, Zakrzewska J, Hadžibrahimović M, Žižić M, Marković Z, Vučinić Ž, Živić M. (2013) Oxygen regulation of alternative respiration in fungus *Phycomyces blakesleeanus*: connection with phosphate metabolism. *Res Microbiol.* doi: 10.1016/j.resmic.2013.03.002.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Марина Станић

број индекса КА070006

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање елемената респираторног ланца гљиве *Phycomyces blakesleeanus*

---

Burgeff: veza sa metabolizmom fosfatnih jedinjenja

---

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 01.07.2013.

Stanic Marina

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора

Марина Станић

Број индекса

КА070006

Студијски програм

Неуронауке

Наслов рада

Испитивање елемената респираторног ланца гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff: veza sa metabolizmom fosfatnih jedinjenja

Ментор

др Мирослав Живић, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Joanna Zakrzewska, виши научни сарадник, Институт за општу и физичку хемију, Београд

Потписани/а

Марина Станић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 01.07.2013.

Staic' Marina

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање елемената респираторног ланца гљиве *Phycomyces blakesleeanus*

---

Burgeff: veza sa metabolizmom fosfatnih jedinjenja

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

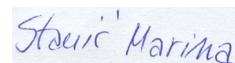
5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 01.07.2013.





1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.