

**Стресс и его регуляция у растений.
Механизмы оксидативного стресса.**



Что такое оксидативный стресс?

Классическое определение – состояние организма, при котором наблюдается дисбаланс между произведенными и детоксифицированными активными формами кислорода (АФК) и свободными радикалами.

Современное дополнение – это также может быть и стресс-фактор, напрямую вызывающий продукцию АФК.

Почему так важен оксидативный стресс?

- 1. Он вовлечен практически во все ответы растений на стрессоры. Пока не найдено ни одного стресс-фактора, который бы хотя бы частично не действовал через индукцию оксидативного стресса.**
- 2. Является универсальным «декодировщиком» стимулов, он играет основную роль в распознавании и усилении стресс-сигналов (в особенности, патогенных) и запускает иммунный ответа и генетические программы устойчивости (неспец. и спец.).**
- 3. Выступает в роли индуктора программируемой клеткой смерти при дистрессе.**

Поэтому АФК часто относят к «гормонам» стресса или «регуляторам» стресса.

Другой такой регулятор - это цитоплазматический Ca^{2+}

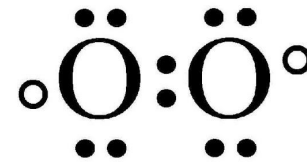
Основные типы АФК их синтез и роль.

АФК – вещества, имеющие более активный кислород

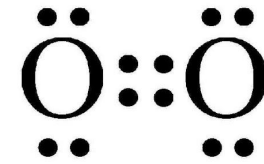
Свободный радикал, если имеет неспаренный электрон, и может существовать несвязанно

АФА – активные формы азота – у растений найдены, но функция в стрессе не до конца ясна

○ - свободный радикал



триплетный кислород

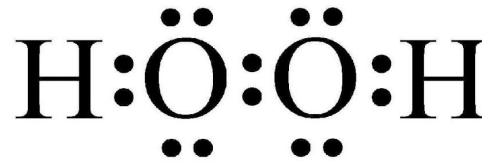


синглетный кислород

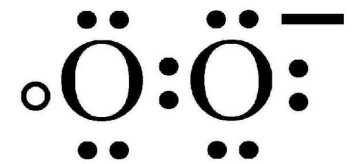
3.1 -
3.9 μ s



< 1с



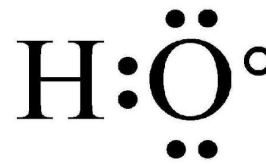
перекись водорода



супероксидный анионный радикал
1 μ s – 1 мс



1 нс



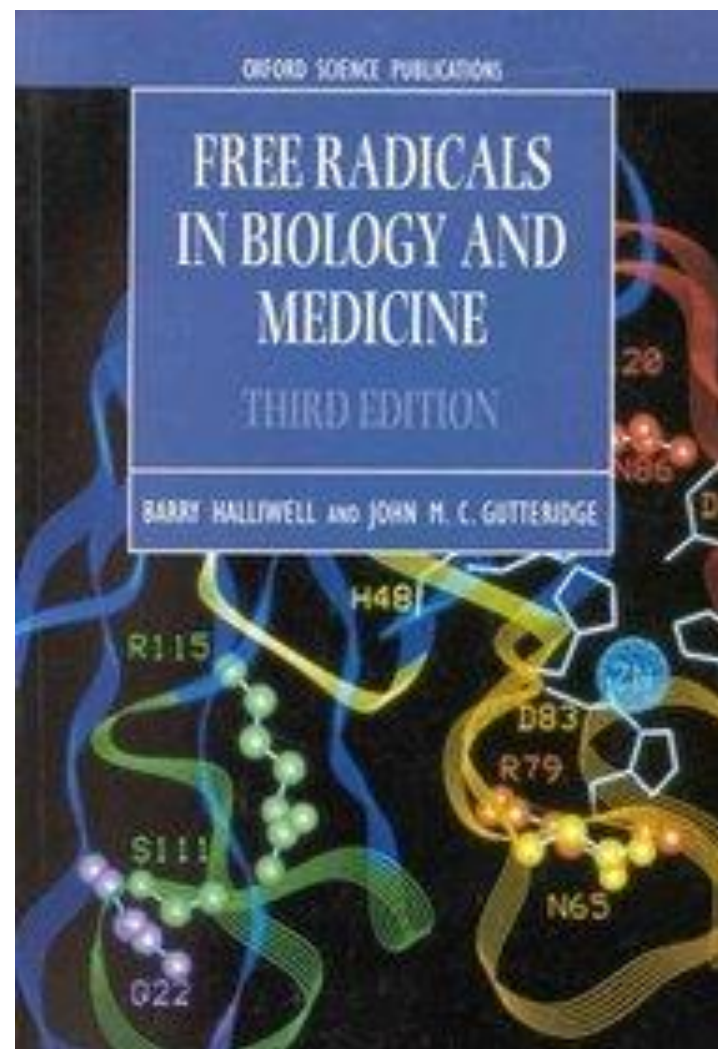
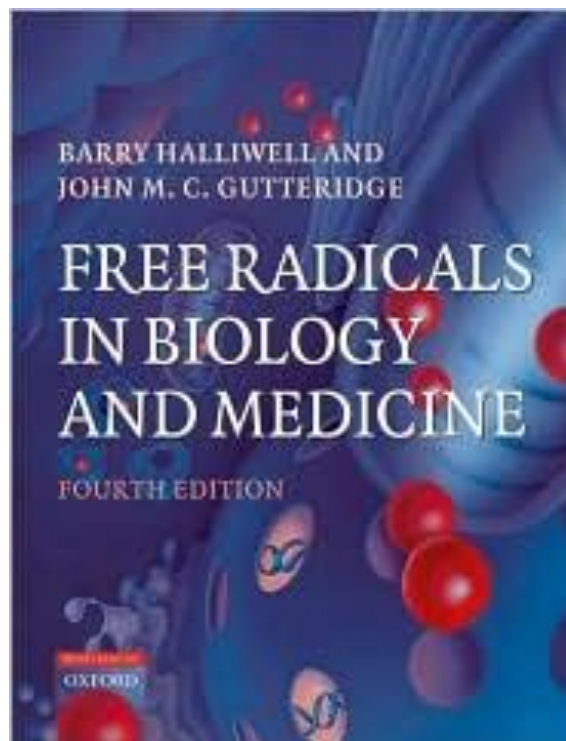
гидроксильный радикал



моноксид азота

Основные типы АФК их синтез и роль.

«Библия» для исследователей
свободных радикалов в живых
системах:

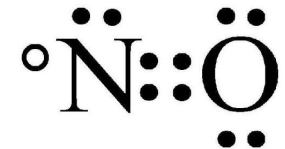
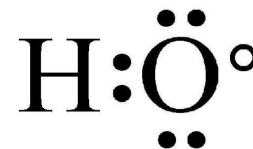
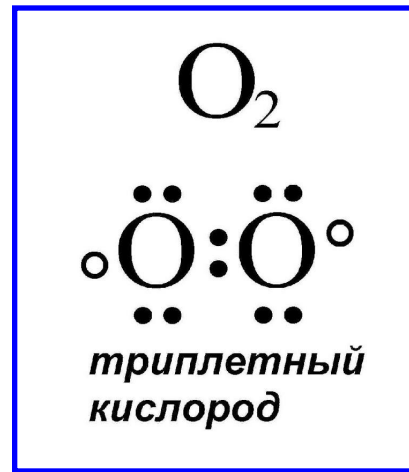


Кислород – наиболее обильный элемент земной коры (Guido, 2001).

89% массы H_2O – превалирует по массе в живых системах.

Атмосферный элементарный O_2 начал накапливаться с появлением первых растений и его содержание сейчас примерно 21% от всего объема воздуха.

Кислород – важнейший окислитель аэробного мира, включая живые системы, поскольку он второй по силе окислитель после фтора, который намного более редок в природе.



Наиболее распространенная форма кислорода атмосфера - O_2 . Он **дирадикал ($O_2^{2\cdot}$)** и существует как свободная молекула, поэтому он свободный радикал. Но электроны у данного молекулярного кислорода имеют однонаправленные спины. В виду спиновой рестрикции они малоактивны.

Для **активации** электронная конфигурация кислорода должна измениться – например, под действием **внешней энергии**.

Внешнюю энергию могут передать **энергизированные электроны** в ЭТЦ, ультрафиолет, некоторые химические реакции, кавитация, ионизирующая радиация и т.д.).

Определения:

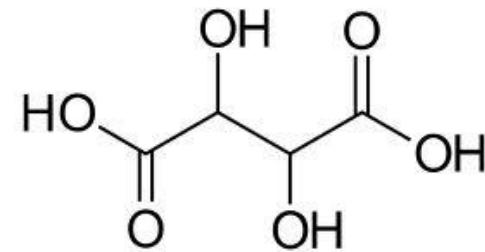
АФК или РФК (А или Р – «активные» или «реактивные» формы кислорода): вещества, содержащие кислород в более активной, чем в O_2 форме. Они не всегда радикалы (H_2O_2).

Свободные радикалы (СР) – вещества, имеющие неспаренные электроны, и способные к свободной диффузии. Не все СР имеют в своем составе кислород, т.е. не все они АФК.

Переходные металлы (ПМ) – IUPAC: "*an element whose atom has an incomplete d sub-shell, or which can give rise to cations with an incomplete d sub-shell*". В клетке $Fe^{2+/3+}$ и Cu^{+2+} легко принимают и передают электроны, играя ключевую роль в активации O_2 .

Согласно IUPAC Gold Book переходные металлы «условно» не относят к СР, хотя они имеют неспаренные электроны.

Всё началось с растений:



Генри Джон Хорстман Фентон (Кембридж)

Fenton HJH (1894) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. J Chem Soc Trans 65: 899-911

Tartaric acid – винная кислота – обильна в вине и соке

Окисляющим агентом, на самом деле был гидроксильный радикал – наиболее сильный окислитель из АФК (Хабер и Вейс – 20-30-е годы открыли реакцию его биосинтеза)



Классические реакции Фентона:

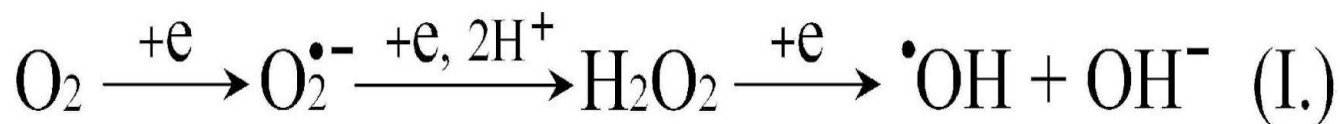
(I.) металл восстановленный + $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ металл окисленный + $\cdot\text{OH} + \text{OH}^-$;

(II.) металл окисленный + $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ металл восстановленный + $\text{HO}_2^\cdot + \text{H}^+$

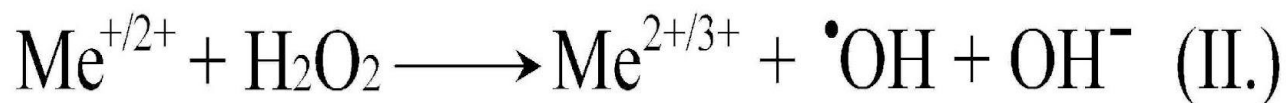
Примечательно, что в статье Фентона 1894 г. было также открыто окислительное действие озона!



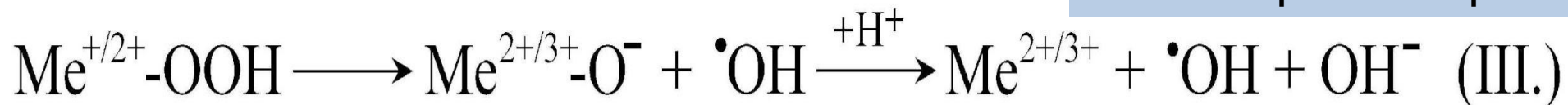
Для активации электронная конфигурация кислорода должна измениться – например, под действием внешней энергии. Это могут быть энергизированные электроны в ЭТЦ, ультрафиолет, некоторые химические реакции, кавитация, ионизирующая радиация и т.д.).



Восстановление
кислорода



Классическая
Реакция Фентона
Внешний перенос электрона



Неклассический синтез гидроксильного радикала
Внутренний перенос электрона (с образованием интермедиата)

Характерен для гемовых оксигеназ, цитохрома P450, superoxide reductases, и некоторых белков ФСII

**$\cdot\text{O}_2^-$ – супероксидный анионный радикал –
ключевая АФК** (он же «супероксид» или «супероксидный анион»)

Синтез супероксида лежит в начале большинства редокс-процессов клетки. Это вещество чаще выступает в роли восстановителя, и является предшественником перекиси водорода.

$\cdot\text{O}_2^-$ может реагировать с H^+ , формируя гидропероксильный радикал (гидропероксил): HO_2^\cdot , который более реакционно-активен и более стабилен и, возможно, может проходить через водные каналы биомембран

В реакции дисмутации 2 молекулы HO_2^\cdot дают O_2 и H_2O_2 .

Соотношение $\cdot\text{O}_2^-/\text{HO}_2^\cdot$ возрастает с pH:

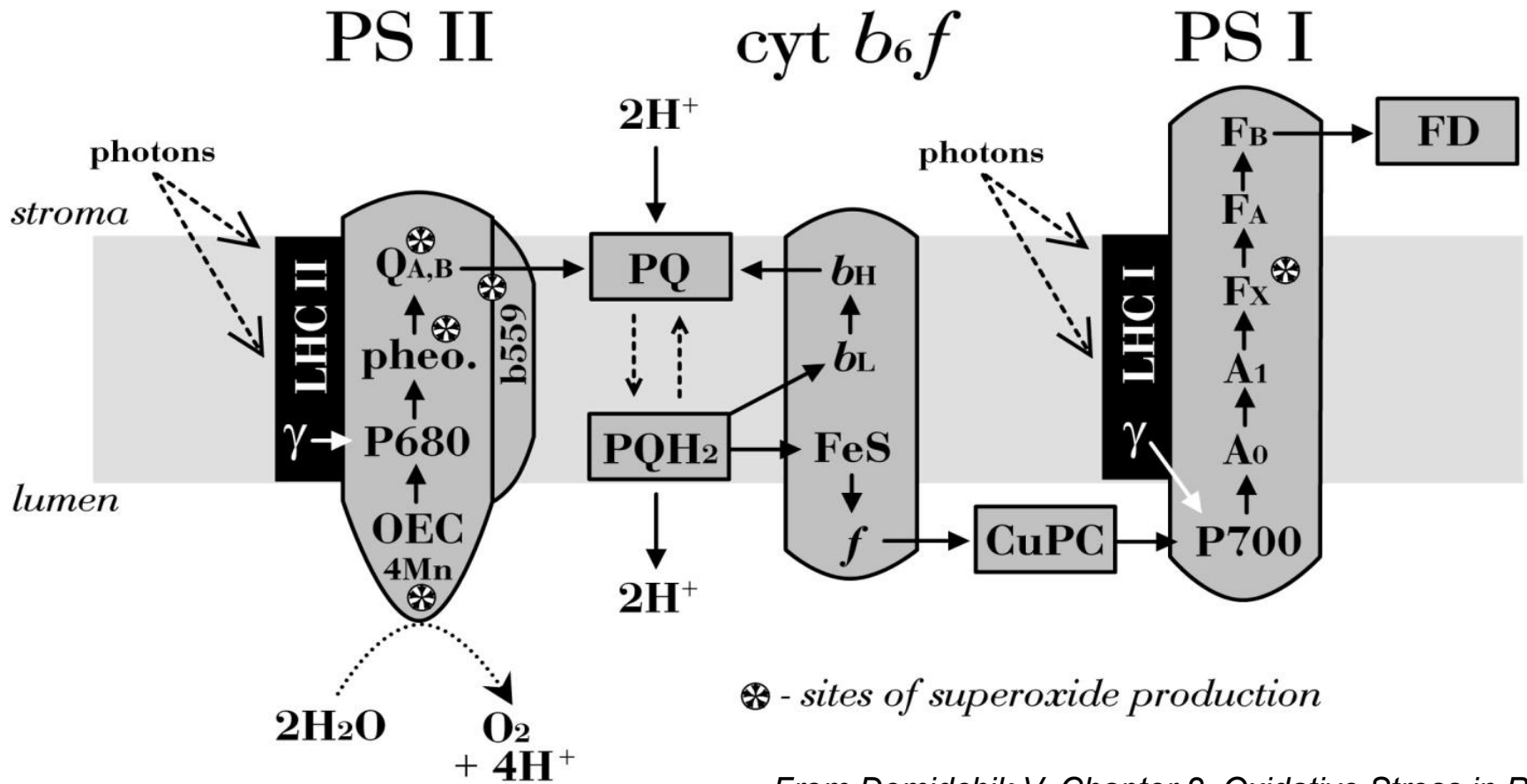
1/1 при pH 4.8

10/1 при pH 5.8

100/1 при pH 6.8

Развитие представлений о механизмах оксидативного стресса - до 80-х годов 20-го века

- радикальное окисление фотосинтетических пигментов и гемов, глиоксилатный путь (Асада, Халливел, Фойер, Бэйкер и др.)



From Demidchik V, Chapter 2. Oxidative Stress in Plants. In "Plant Stress Physiology" CABI, 2012, in press

До 80-х годов 20-го века:

- биосинтез АФК в митохондриях – *по аналогии с животными и бактериями (супероксид в комплексах I и III)*
- гидроперекисное окисление липидов, цепные радикальные реакции – *по аналогии с животными*

детально:

<http://www.plantstress.com/Articles/Oxidative%20Stress.htm>

Начиная с 80-х годов 20-го века:

- работы **Нариюке Доке** (Нагоя, Япония)

впервые показано, что патогенные организмы – *Phytophthora infestans* – вызывают у растений (клубни картофеля) биосинтез (*de novo*) АФК (супероксидного анионного радикала)

Doke N (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of Phytophthora infestans and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. Physiol Plant Pathol 23: 359-367

Doke N, Miura N (1995) In vitro activation of NADPH-dependent O_2^- generating system in isolated plasmamembrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from Phytophthora infestans and digitonin. Physiol Mol Plant Pathol 46: 17-28

Park HJ, Doke N, Miura Y, Kawakita K, Noritake T, Komatsubara H (1998) Induction of a systemic oxidative burst by elicitor-stimulated local oxidative burst in potato plant tissues: A possible systemic signaling in systemic acquired resistance. Plant Sci 138: 197-208

Начиная с 80-х годов 20-го века:

- работы **Мёрфи, Бонэ, Хасегавы, Брессана**

показано, что абиотические стрессы, такие как засоление, засуха, холод и др. вызывают биосинтез *de novo* АФК



Сейчас установлено, что практически любой стресс-фактор среды может вызвать так называемый

оксидативный стресс

(дисбаланс между генерацией и детоксификацией АФК, приводящий к окислительному повреждению клеточных компонентов и нарушению физиологических функций)

Новые механизмы биосинтеза АФК (1990-2000-е), «включающиеся» при стрессе:

- НАДФН-оксидазы (расположены в плазматической мембране, «выбрасывают» электрон наружу, активируя O_2 до супероксида, 10 генов у арабидопсиса, цитоплазматический Ca^{2+} является кофактором)

- пероксидазы (класс-III, свободные ферменты, продуцирующие пероксиды и гидроксильные радикалы, содержат гем, многие транспортируются в апопласт и вакуоль, 73 гена у арабидопсиса)

Начиная с конца 1990-х, становится понятно, что АФК нужны и в других процессах – росте, гравитропизме, полярности, для действия гормонов и при эмбриогенезе:

- например, работы лаборатории Стивена Фрая (Эдинбург) Анны Лизкай и Петера Шопфера (Фрейбург, Германия)

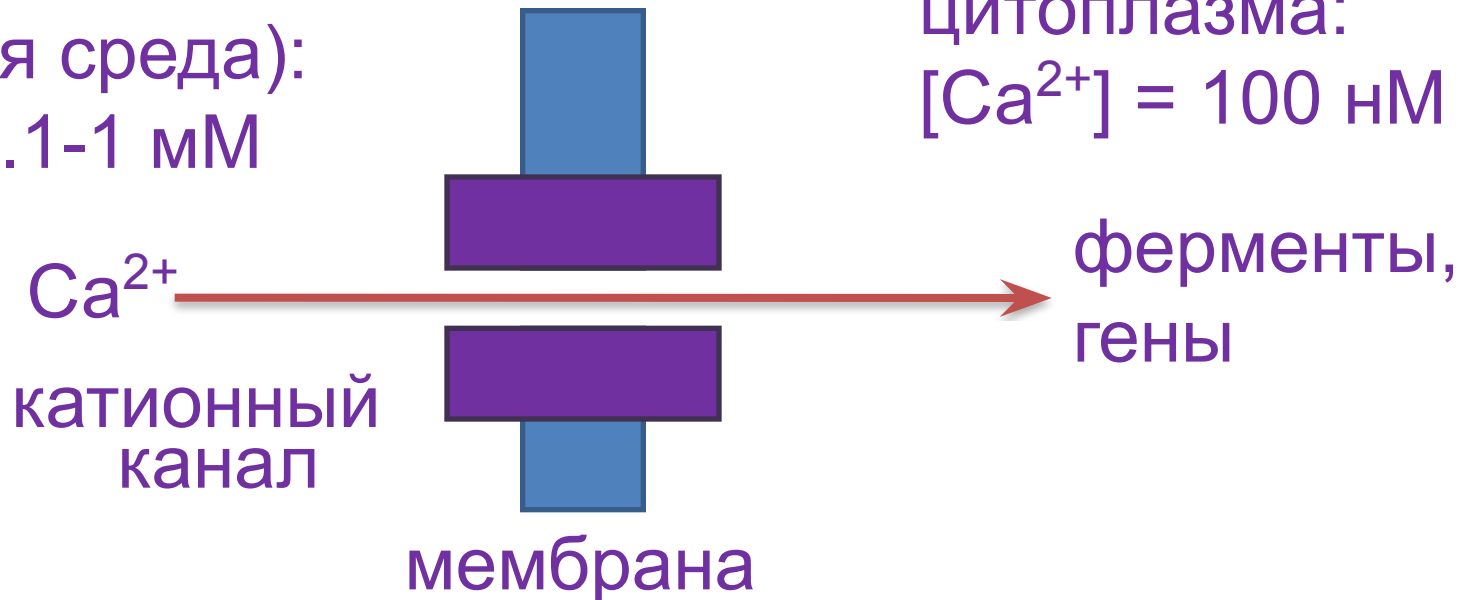
гидроксильный радикал, производимый в клеточной стенке из H_2O_2 под действием связанного переходного металла (медь или железо), вызывает разрывы в полисахаридах и пектине, необходимые для роста клеток

Почему так важен Ca^{2+} ?

- **повышение уровня Ca^{2+} в цитоплазме** (4-мерная кальциевая волна) – это код для внешних сигналов у клеток растений (и животных тоже), которые «видят и слышат» окружающий мир при помощи мембранных рецепторов и волны изменения активности Ca^{2+}

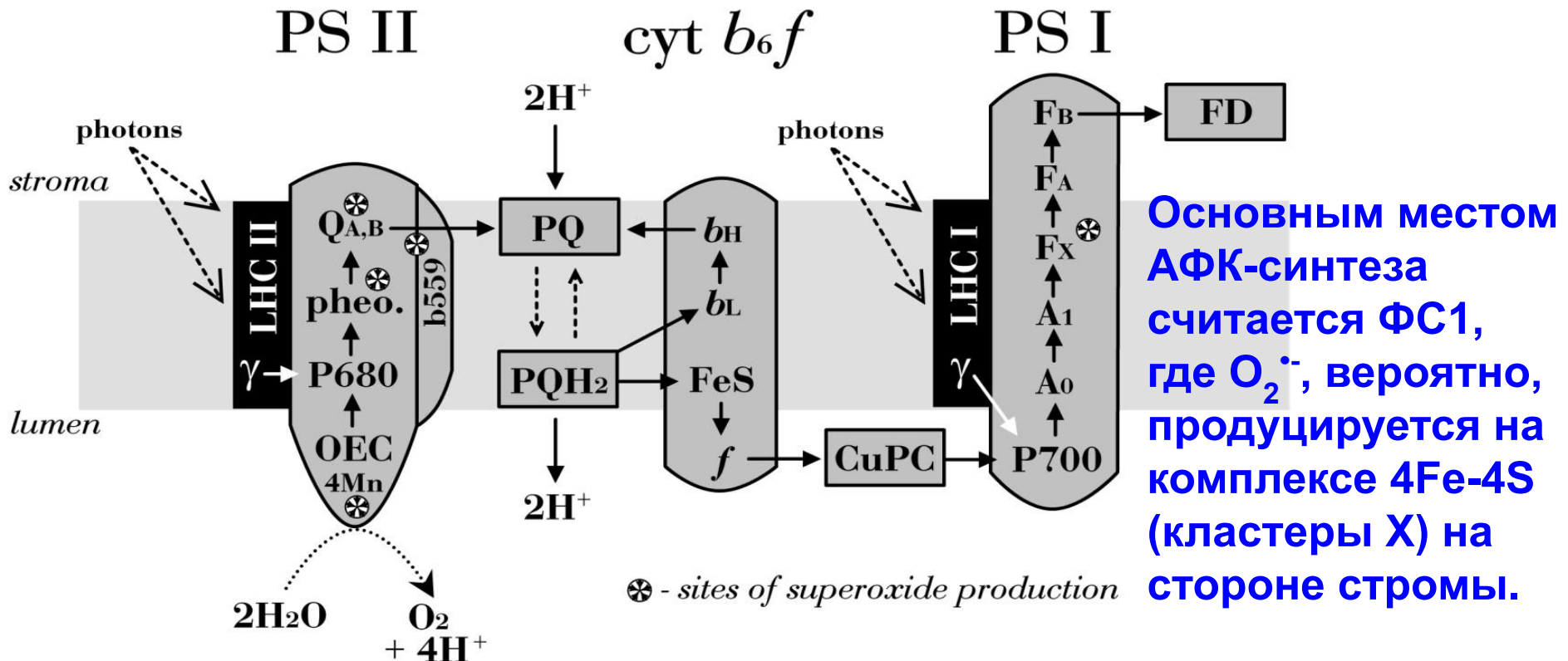
За развитие представлений о сигнальной роли Ca^{2+} дали 3 Нобелевские премии

клеточная стенка
(наружная среда):
 $[\text{Ca}^{2+}] = 0.1-1 \text{ мМ}$



Итого: основные сайты (места) биосинтеза АФК – хлоропласты, митохондрии, наружное внеклеточное пространство вблизи плазмалеммы и сайты локализации свободных пероксидаз типа-III.

Рисунок ниже – ЭТЦ фотосинтеза – ФС2 - согласно EPR-анализу – утечка электрона на кислород (супероксид генерируется) идет около феофитина (pheo.), первичного хинонового акцептора (Q_A) и цитохрома b_{559} . Также в ФС2 одноэлектронное окисление H_2O_2 на (ОЕС) дает дополнительный супероксид в лумене.



Основным местом АФК-синтеза считается ФС1, где O_2^- , вероятно, продуцируется на комплексе 4Fe-4S (кластеры X) на стороне стромы.

Антиоксиданты (АО): 2 типа – КАКИЕ?

Детоксификация АФК в органеллах растений:

В хлоропластах $O_2^{\cdot-}$ супероксид-дисмутаза превращает супероксид в O_2 и H_2O_2 , который детоксифицируется аскорбат пероксидазой (аскорбат + $H_2O_2 \rightarrow$ дегидроаскорбат + H_2O).

В митохондриях $O_2^{\cdot-}$ супероксид-дисмутаза превращает супероксид в O_2 и H_2O_2 , который детоксифицируется глутатион-пероксидазой.

Есть факты, что в некоторых тканях растений в митохондриях работают аскорбат пероксидаза и каталаза.

Кроме детоксификации – системы репарации – **ферменты восстановления поврежденных белков.**

АФК синтез в пероксисомах

(органеллы, играющие важную роль в фотодыхании)

Патогены, засоление, Cd^{2+} , гербициды и другие ксенобиотики приводят к синтезу супероксида в пероксисомах.

Два сайта синтеза супероксида в пероксисомах:

1 - Ксантин-оксидаза в матриксе

2 - НАДН/НАДФН-зависимая малая ЭТЦ пероксисомальной мембраны (*NADH:ferricyanide reductase, cytochrome b, monodehydroascorbate reductase and NADPH:cytochrome P450 reductase*) в цитоплазме.

Супероксид-дисмутаза – основной АО пероксисом.

Аскорбат-глутатионовый цикл

ascorbate-glutathione cycle

(хлоропласты, митохондрии, пероксисомы)

