

УДК 612.22:632.938

О.П. ДМИТРИЄВ, Ж.М. КРАВЧУК

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
НАН України, Київ

АКТИВНІ ФОРМИ КИСНЮ ТА ІМУНІТЕТ РОСЛИН



Активні форми кисню (АФК) відіграють важливу роль в регуляції захисних механізмів рослин. Вони справляють пряму антимікробну дію, каталізують механічне зміцнення клітинних стінок, виступають в ролі вторинних месенджерів в супероксидсинтазній сигнальній системі та запуску реакції надчутливості. Дослідження останніх років сприяли розумінню природи та механізмів окиснювального «вибуху», проте регуляція утворення АФК, модуляція ними сигнальних шляхів, що контролюють ріст, розвиток та імунну відповідь рослин, залишаються загадкою.

© О.П. ДМИТРИЄВ, Ж.М. КРАВЧУК, 2005

Вступ. З появою близько 2,7 млрд років тому молекулярного кисню в земній атмосфері його активні форми (АФК) супроводжують життя всіх аеробних організмів. До числа АФК відносять синглетний кисень ($^1\text{O}_2$), супероксидний аніон-радикал (O_2^-), пероксид водню (H_2O_2) та гідроксил-радикал ($\text{OH}\cdot$). На відміну від молекулярного кисню АФК мають високу реакційну здатність, вони токсичні і можуть призводити до окиснювальної руйнації клітин [1]. Тому в процесі еволюції аеробні організми сформували ефективні захисні механізми, засновані на спроможності ряду ендогенних речовин виступати в ролі перехоплювачів АФК. В останні роки виявлено нові функції АФК: участь в регуляції росту і розвитку рослин, внутрішньоклітинної сигналізації, індукції захисних реакцій на біогенні та абіогенні стреси [2–7]. Ці дослідження свідчать про те, що АФК, з одного боку, є побічними продуктами аеробного метаболізму, з іншого — найважливішими регуляторами росту, розвитку і захисних механізмів рослин. Вважається, що АФК відіграють також важливу роль в реалізації механізмів старіння та програмованої загибелі клітин.

Окиснювальний «вибух» (інтенсивне утворення АФК) є однією з найбільш ранніх відповідей рослинної клітини на інфікування. Їм по праву належить важлива роль у пригніченні розвитку інфекції. Так, при реакції надчутливості (РНЧ) відбувається вихід фенолів з вакуолі та їх ферментативне окиснення. Оскільки цей процес супроводжується генерацією АФК в токсичних концентраціях, то вважають, що саме вони є причиною загибелі рослинних клітин разом з патогеном, що в них проник. Показано, що генерація супероксидного аніон-радикала у стійких сортів відбувається навкруги інфекційних гіф, що проникають в тканини рослини-хазяїна. Тобто у відповідь на ураження в стійкій, але не в сприйнятливій, рослині посилюється утворення АФК в потрібному місці і в потрібний час, причому це утворення АФК має системний характер [2].

Якщо раніше АФК розглядали як високотоксичні, хоча й короткоживучі молекули, що пригнічують розвиток паразита, то зараз вимальовується ще одна їх функція —

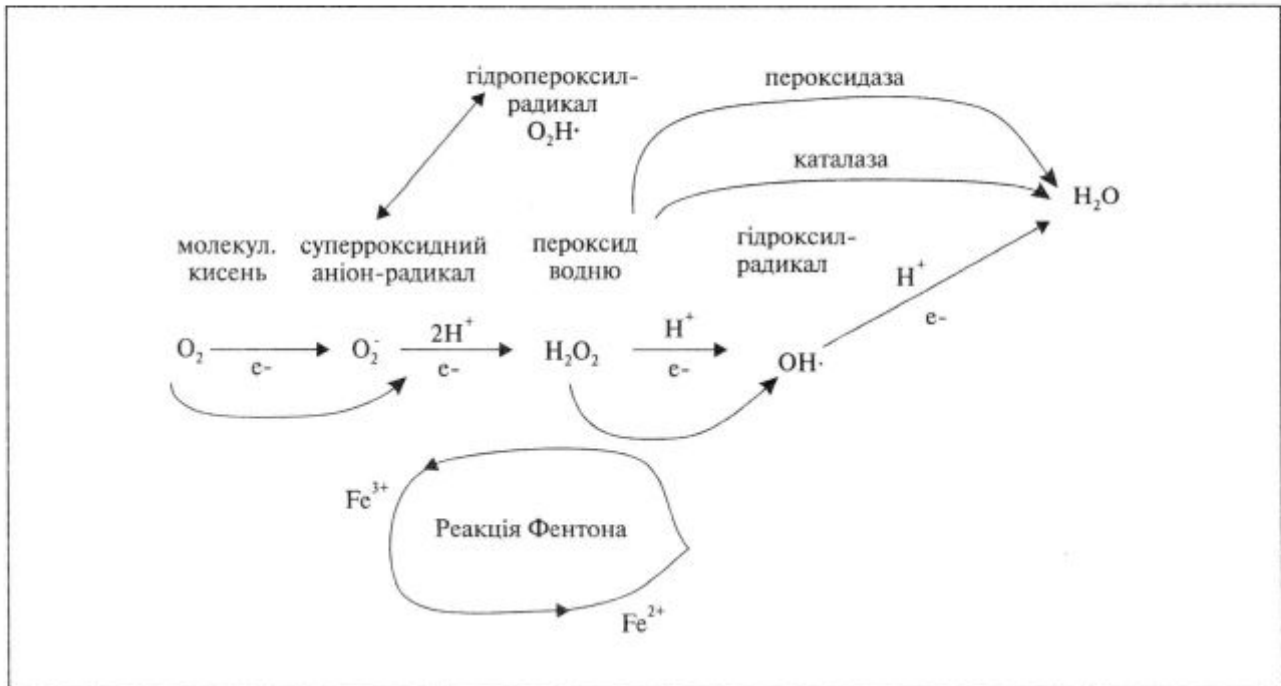


Рис. 1. Активні форми кисню та шляхи їх перетворення

участь у трансдукції сигналу для індукування захисних реакцій.

Біохімічні властивості АФК. У рослинних клітинах АФК є побічними продуктами нормального метаболізму внаслідок негерметичності електрон-транспортних ланцюгів у хлоропластах, мітохондріях, а також у тих компартментах, де є ферменти окисно-відновних реакцій. У нормально функціонуючій клітині існує певний баланс між активацією та дезактивацією кисню, тому кількість його активних форм залишається на безпечному рівні. Однак ушкодження рослинних тканин при дії стресових чинників, як правило, приводять до активації кисню. При цьому порушується баланс між утворенням та руйнуванням АФК.

Генерація супероксидного аніон-радикала потребує поглинання незначної кількості енергії. Надлишок енергії може приводити до формування синглетного кисню ($^1\text{O}_2$), більш високореактивної молекули порівняно з $\text{O}_2^{\cdot-}$. Час існування $^1\text{O}_2$ становить близько 4 мкс у воді і 100 мкс у неполярному середовищі [8]. Він здатний передавати свою енергію збудження іншим біологічним молекулам та формувати ендопероксиди або гідропероксиди.

Шляхи перетворення АФК представлені на рис. 1. $\text{O}_2^{\cdot-}$ є відносно активною короткоживучою формою активного кисню з часом напівжиття близько 2–4 мкс. При кислих значеннях рН, характерних для клітинної стінки рослин, час напівжиття супероксидного аніон-радикала становить менше 1 с [9]. $\text{O}_2^{\cdot-}$ не проникає через біологічні мембрани, але дуже швидко дисмутує до H_2O_2 . Ця реакція відбувається спонтанно або каталізується супероксиддисмутазою (СОД), яка знайдена у цитозолі, хлоропластах та мітохондріях [10]. Супероксидні аніон-радикали здатні відновлювати хінони і комплекси таких перехідних металів, як Fe^{3+} і Cu^{2+} , змінюючи активність металовмісних ферментів. $\text{O}_2^{\cdot-}$ існує паралельно зі своєю протонованою формою — гідропероксил-радикалом ($\text{O}_2\text{H}\cdot$). Процес протонування потребує низького рН. Оскільки гідропероксил-радикал є більш гідрофобним (менш полярним) порівняно з $\text{O}_2^{\cdot-}$, він легше проникає через біологічні мембрани. Тому $\text{O}_2\text{H}\cdot$ на відміну від $\text{O}_2^{\cdot-}$ може прямо взаємодіяти з жирними кислотами, перетворювати лінолеву, ліноленову і арахідонову кислоти в пероксили ліпідів, ініціюючи таким чином автоокиснення ліпідів [1].

H_2O_2 — відносно стабільна форма. Внаслідок електронейтральності ця сполука проникає через мембрани клітини і досягає компартментів, які віддалені від місця її утворення. Пероксид водню може інактивувати ферменти, окиснюючи їх тіолові групи. Наприклад, H_2O_2 інактивує ферменти циклу Кальвіна, Cu/Zn СОД і Fe СОД [11]. У рослинних клітинах швидко утворений H_2O_2 може: 1) перетворюватись спонтанно або за участю каталази у воду і молекулярний кисень; 2) використовуватись як субстрат різноманітними пероксидазами (для утворення фенокси-радикалів, які є необхідними для синтезу лігніну); 3) знешкоджуватись аскорбатпероксидазою, що функціонує разом з дегідроаскорбатредуктазою і глутатіонредуктазою у шляху Галівела-Асади. Однак за певних умов та при достатній кількості відновників H_2O_2 утворюється пероксидазами.

У прямій реакції H_2O_2 і O_2^- утворюється гідроксил-радикал, який є найбільш реакційно здатним серед усіх АФК. Однак за нормальних умов ця реакція у клітинах відбувається досить повільно і не дає значної кількості $OH\cdot$. Достатня його кількість може утворюватись у циклі реакцій окиснення перехідних металів (Fe^{2+} або Cu^{2+}) з подальшим відновленням окиснених іонів через реакцію з O_2^- . Оскільки перехідні метали тут діють як каталізатори, їх місцезнаходження і доступність є, мабуть, головними факторами, що визначають місце утворення $OH\cdot$ у клітині.

Завдяки здатності ініціювати ланцюгові радикальні реакції гідроксил-радикал вважають головною формою активного кисню, яка відповідає за незворотні модифікації макромолекул клітини і пошкодження органел [1]. Якщо H_2O_2 , проникаючи в цитоплазму в значних концентраціях, досягає ядра рослинної клітини або патогена, він може реагувати з іонами металів, утворюючи при цьому $OH\cdot$. Останній, як відомо, сайт-специфічно фрагментує ДНК [10]. Але оскільки час напівжиття гідроксил-радикала складає 10^{-9} с, кількісне його визначення і з'ясування ролі у регуляторних процесах досліджувалось мало.

Таким чином, утворення АФК може призводити до значних пошкоджень як рослини-хазяїна, так і патогена, тому потребує від рослинної клітини ефективних механізмів захисту.

Антиоксидантні механізми. Рослини мають декілька механізмів детоксикації форм активного кисню. Насамперед, це низькомолекулярні антиоксиданти, ферменти і комплексні системи, які перехоплюють АФК і ефективно захищають ті компартменти клітини, де істотно збільшується їх концентрація.

Основними антиоксидантними ферментами рослин є СОД, аскорбат-пероксидаза (АП), каталаза, глутатіон-пероксидаза та пероксіредоксин [12]. Разом з антиоксидантами — аскорбіновою кислотою та глутатіоном — ці ферменти забезпечують ефективний механізм детоксикації АФК. Баланс між активністю СОД, АП та каталази у клітині є вирішальним для визначення базового постійного рівня O_2^- і H_2O_2 [11]. Цей баланс разом зі зменшеною кількістю іонів металів є також важливим для упередження формування високотоксичних гідроксил-радикалів через металозалежну реакцію Хабера-Вейса або Фентона [13]. Різна спорідненість АП (мкМ рівень) і каталази (мМ рівень) до H_2O_2 свідчить, що вони складають два різних класи H_2O_2 -детоксикуючих ферментів: АП відповідає за тонку регуляцію рівня АФК при трансдукції сигналу, тоді як каталаза — за видалення надлишку АФК при абіогенному чи біогенному стресі.

Основні антиоксидантні шляхи включають також H_2O_2 — H_2O_2 цикл у хлоропластах, аскорбат-глутатіоновий цикл у хлоропластах, цитозолі, мітохондріях, апопласті і пероксисомах, глутатіонпероксидазу і каталазу у пероксисомах. Аскорбат-глутатіоновий цикл відіграє важливу роль у контролі рівня АФК у клітині, оскільки він виявлений майже у всіх клітинних компартментах, а АП має високу спорідненість до H_2O_2 . Каталаза знаходиться тільки у пероксисомах, але вона необхідна для детоксикації високих концентрацій АФК. Це підтверджує і той факт, що окиснювальний «вибух» викликає проліферацію пероксисом [14]. У бактерій показано

збільшення щільності популяції пероксисом у місцях утворення АФК, особливо H_2O_2 , який дифундує у пероксисоми з цитозоллю [15]. Цикл $H_2O_2-H_2O_2$ забезпечується енергією фотосинтетичного апарату [16]. Однак джерело енергії для детоксикації АФК у аскорбат-глутатіоновому циклі при нормальному метаболізмі і, частково, при стресі, коли фотосинтетичний апарат пошкоджений або зарепресований, невідоме. У тварин і дріжджів основним джерелом НАДФН для детоксикації АФК є пентозофосфатний шлях [17]. Каталаза може бути не чутливою до окисно-відновного (редокс) балансу клітини, оскільки вона не потребує відновників для свого функціонування.

Дуже важливими для захисту рослин від окиснювального стресу є такі антиоксиданти, як аскорбінова кислота та глутатіон. Вони виявлені у високих концентраціях, наприклад, у хлоропластах (5–20 мМ аскорбінової кислоти і 1–5 мМ глутатіону). Мутанти зі зменшеним рівнем аскорбінової кислоти [18] і трансгенні рослини зі зменшеним вмістом глутатіону [19] виявились більш чутливими до стресових умов. Аскорбінова кислота та глутатіон підтримуються у клітинних компартментах у відновленому стані за допомогою ферментів, що здатні використовувати НАДФН для відновлення їх окиснених форм [16]. Це такі ферменти, як глутатіон-редуктаза, монодегідроаскорбат-редуктаза та дегідроаскорбат-редуктаза. Співвідношення між рівнем відновлених та окиснених форм антиоксидантів є, імовірно, сигналом для регуляції механізмів детоксикації АФК, хоча підвищений рівень синтезу глутатіону у хлоропластах призводить більше до окиснювальних пошкоджень клітини, ніж до її захисту [19], що відбувається, мабуть, внаслідок зміни окисно-відновного балансу в хлоропластах.

Перехоплення H_2O_2 може відбуватись також «класичними» пероксидазами рослин. Ці ферменти кодуються значною кількістю генів [20]. Наприклад, у рослин *Arabidopsis* їх кодують 73 гена, і вони знайдені в цитозолі, апопласті, клітинній стінці та вакуолі. Взагалі роль вакуолі у редокс-балансі рослинної клітини виглядає загадковою. Для неї неві-

домі АФК-продукуючі чи АФК-перехоплюючі системи. Можливо, що вакуоль завдяки своєму відносно великому розмірові відіграє істотну роль у регуляції метаболізму АФК у рослин. До речі, антиоксидантні властивості апопласту і пероксисом та їх участь у регуляції трансдукції сигналу виявлені зовсім недавно [21]. А специфічні ферменти та гени, що беруть участь у регуляції метаболізму АФК в цих компартментах, тільки почали вивчати.

Останнім часом дослідження на рослинах *Arabidopsis* показали, що координація між різними компартментами клітини для детоксикації АФК є складною і навіть несподіваною [22]. Так, світловий стрес викликає індукцію не хлоропластних, а цитозольних захисних ферментів, в той час як вважалося, що генерація АФК під дією цього стресу відбувається саме у хлоропластах та пероксисомах. Крім того, щонайменше три різних ферменти з АФК-перехоплюючого арсеналу рослин були знайдені у хлоропластах та мітохондріях, що свідчить про високий ступінь координації захисних реакцій між цими органелами [23]. Подальші дослідження на мутантах *Arabidopsis* з виключеними генами різних АФК-перехоплюючих ферментів дозволять з'ясувати, яким чином певні ланки складної системи знешкодження АФК взаємодіють між собою і як їх інтеграція пов'язана з проявом оптимального захисту проти біогенного чи абіогенного стресу.

Супероксидсинтазна сигнальна система. Вперше окиснювальний «вибух» спостерігали ще 20 років тому [24] при інфікуванні збудником фітофторозу *Phytophthora infestans* бульб картоплі. Пізніше його реестрували у відповідь на ураження грибами, бактеріями, вірусами та на обробку біогенними еліситорами. У багатьох дослідженнях показано, що в оброблених еліситорами рослинних клітинах відбувається активація НАДФН-оксидази — стартового ферменту НАДФН-оксидазної системи, внаслідок чого інтенсивно накопичуються АФК. Важливою рисою є скороминучий характер цього окиснювального «вибуху», що проявляється у відносно швидкому поверненні концент-

рації пероксиду водню до вихідного рівня. Це може бути пов'язане з різними механізмами: зниженням активності НАДФН-оксидази, внаслідок чого зменшується прибуткова частина балансу пероксиду водню, посиленням видаткової частини цього балансу, а саме виходом частини H_2O_2 за межі клітин (де вона використовується в пероксидазних реакціях), руйнуванням пероксиду водню каталазою [12] або використанням частини H_2O_2 в аскорбат-пероксидазній реакції аскорбат-глутатіонового циклу.

В утворенні АФК в оброблених еліситорами клітинах можуть брати участь й інші ферменти, наприклад, ті, що локалізовані в клітинній стінці — оксалатоксидаза [25] та пероксидази, котрі активуються при лужному зсуві рН за межами плазматичної мембрани, який спостерігається при ураженні патогеном або обробці еліситорами [26]. Проте головну увагу дослідників механізмів окиснювального «вибуху» привертає все ж таки НАДФН-оксидаза плазматичної мембрани. Вона являє собою гетеродимерний цитохром *b*-типа, який складається з двох субодиниць, 22 та 91 кДа. Для активації цього ферменту потрібна участь ще двох цитоплазматичних білків — 47 та 67 кДа. У відповідь на інфікування або обробку еліситором перший з цих двох білків фосфорилується, потім вони мігрують до плазматичної мембрани і утворюють активний комплекс ферменту [3].

Індукована еліситорами генерація пероксиду водню пригнічується інгібіторами протеїнази, наприклад, стауроспоріном, але активується інгібіторами протеїнофосфатази 2А [27]. В останньому випадку окиснювальний «вибух» відбувається і за відсутності еліситора, що свідчить про важливу роль фосфорилування та дефосфорилування білків в реалізації супероксидсинтазного сигнального шляху [28].

Для активації НАДФН-оксидази потрібна участь G-білків, що знайшло підтвердження в дослідях з мастопараном — активатором G-білків [26]. Активність НАДФН-оксидази, як виявилось, стимулює також фосфоліпаза С, що свідчить про взаємодію супероксидсинтазного шляху з кальцієвою сигнальною системою. Це видається тим більш імовірним,

що у субодиниці 91 кДа НАДФН-оксидази є два Ca^{2+} -зв'язуючих сайти [30].

В той час як кальцієва сигнальна система функціонує завдяки зберіганню та вивільненню кальцію [31], сигнальна роль АФК здійснюється за рахунок їх утворення та перехоплення (рис. 2). Сигнали зовнішнього середовища, які сприймає рослинна клітина, змінюють концентрацію АФК в різних її компартментах. Такі зміни концентрації спричиняють активацію різних рецепторів та ферментів і викликають відповідні зміни перебігу біохімічних реакцій. Інтенсивність утворення, тривалість існування та локалізація різних форм активного кисню визначається взаємодією між АФК-продукуєчими та АФК-перехоплюєчими системами клітини. Така взаємодія здійснює тонку регуляцію клітинних реакцій і включає ампліфікацію та інгібування по типу зворотного зв'язку [32]. Крім регуляції динаміки утворення та знешкодження різних форм активного кисню, важлива функція АФК-перехоплювачів полягає в тому, щоб підтримувати базовий низький рівень АФК в клітинних компартментах. Це необхідно, щоб на фоні базового рівня могли реєструватися різні сигнали зовнішнього середовища. Таким чином, супероксидсинтазна сигнальна система підтримує постійний рівень АФК в різних компартментах клітини для трансдукції сигналу до генетичного апарату, а також для захисту від окиснювального ушкодження.

Регуляторна роль АФК як сигнальних молекул полягає, мабуть, у використанні них клітиною для сприйняття стресів. Більшість біогенних та абіогенних стресів порушують метаболічні процеси, що призводить до збільшення продукування АФК. Простіші організми, такі як бактерії чи дріжджі, сприймають підвищення утворення АФК своїми редокс-чутливими факторами транскрипції або іншими молекулярними сенсорами, активують різні АФК-залежні захисні реакції, а потім концентрація АФК повертається до базового рівня [33].

Одним з найбільш істотних наслідків активації супероксидсинтазної системи в інфікованих клітинах є сигнал для загибелі

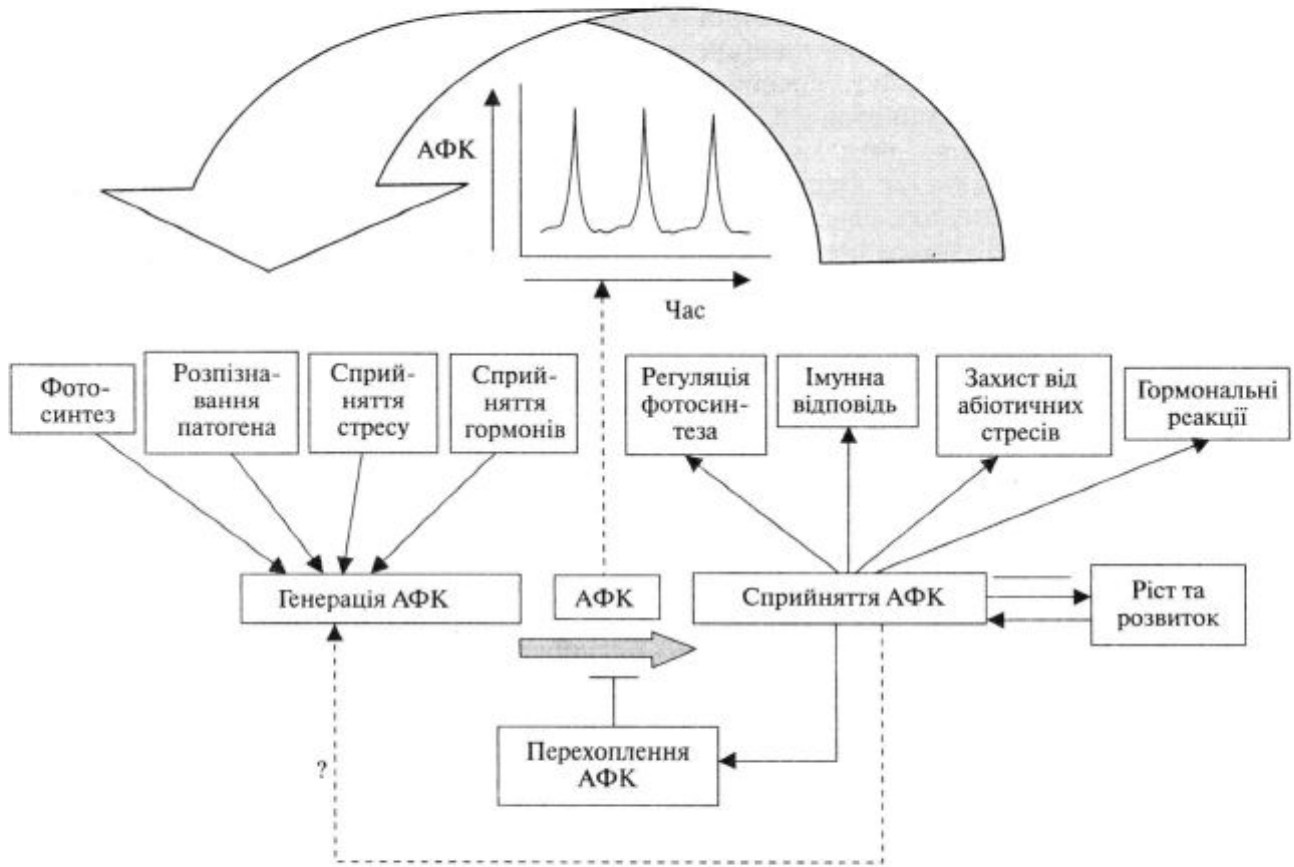


Рис. 2. Сигнальна роль активних форм кисню

клітин. АФК виступають при цьому своєрідними «еліксирами» смерті. У рослин описані два різних типи клітинної загибелі: прогрована загибель клітин (апоптоз) і некроз. Хоча вони мають багато однакових молекулярних ознак, апоптоз, на відміну від некрозу, є енергозалежним процесом — для його реалізації необхідним є певний вміст АТФ у клітині. Тому в разі виснаження пулу АТФ в клітинах, а також при надлишку АФК клітини стійкої рослини, які в нормі зазнавали б апоптозу, гинуть шляхом некрозу. Таким чином, механізми клітинної загибелі багато в чому схожі, і апоптоз і некроз є ніби різними екстремумами неперервного процесу, який, імовірно, ініціюється одним і тим же сигналом — АФК [4].

Здатність АФК індукувати загибель клітин була продемонстрована в досліджах *in vitro* та *in planta*. У трансгенних рослин з низькою

здатністю здійснювати детоксикацію H_2O_2 або з підвищеною активністю H_2O_2 -генеруючих ферментів загибель клітин спостерігалась спонтанно, а також легко індукувалась різними стресами [6].

Необхідно зазначити, що в ініціації клітинної загибелі беруть участь також деякі інтермедіати кальцієвої, ліпоксигеназної та NO-синтазної систем, але головна роль належить H_2O_2 та саліциловій кислоті (СК) супероксидсинтазної системи. Встановлено, що в інфікованих тканинах або в клітинах, оброблених елісаторами чи екзогенним H_2O_2 , концентрація СК зростає в десятки разів [34].

Саліцилова кислота. Однією з причин такого зростання СК є індуковане елісаторами утворення фенілаланін-амоній-ліази (ФААЛ) — ключового ферменту терпеноїдного біосинтеза. ФААЛ активує метаболіч-

ний шлях фенілаланін→корична кислота→→бензойна кислота СК. Іншою причиною зростання вмісту СК може бути швидка активація гідролази, котра вивільнює СК з О-β-D-глюкозидсаліцилата, локалізованого в клітинній стінці рослин [2]. Через деякий час вміст СК в оброблених еліситорами клітинах знижується. Це пояснюється декількома причинами: виходом її з клітин в апопласт, перетворенням в леткий метилсаліцилат, утворенням глюкозильного ефіру саліцилата або деградацією СК.

Для з'ясування ролі СК почали пошук саліцилат-зв'язуючих білків. ¹⁴C-мічена СК зв'язувалась в рослинах тютюну з білком, котрий виявився каталазою — ферментом, що розщеплює пероксид водню. Ідентифікація цього білка як каталази була підтверджена аналізом його амінокислотної послідовності [35]. Вважається, що СК інгібує каталазу і, перекриваючи в такий спосіб основний видатковий канал балансу H₂O₂, сприяє накопиченню останнього. Деякі дослідники не поділяли думки щодо ролі СК в НАДФН-оксидазній сигнальній системі, однак одержані дані про існування декількох органоспецифічних ізоформ каталази, що відрізнялись за ступенем інгібування СК, розвіяли ці сумніви [36].

Цікаво, що СК є інгібітором не тільки каталази, але й ряду інших металомістких ферментів — аскорбат-пероксидази, акотінази. Є дані про існування мітоген-активованих протеїнкіназ (МАР кіназ), що активуються СК, та рецепторних кіназ, що активуються СК, а також патогенами та окиснювальним «вибухом» [37]. Зважаючи на те, що розташування двох гідроксильних груп у СК та пероксида водню може бути схожим [2], не виключено, що СК-активовані протеїнкінази є також і H₂O₂-активованими протеїнкіназами.

СК виявилась сигнальною молекулою, яка призводить до ініціації системної індукованої стійкості (СІС), коли хворобостійкість розвивається у віддалених від місця ураження тканинах інфікованої рослини. Експерименти з ¹⁴C-міченою СК *in vivo* показали, що саме вона є мобільним сигналом для СІС. Виявилось, що СК, яка утворюється

в листках тютюну, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки, транспортується в рослині по флоемі і послідовно перетворює рослинні тканини в імунізовані [38]. Деякі дослідники заперечували участь СК як мобільного системного сигналу, однак експерименти з трансгенними рослинами, в яких експресується ген бактеріальної саліцилатгідроксилази (не здатних накопичувати СК після інфікування), зняли ці заперечення [6].

Проте, для інших рослин, наприклад, картоплі і рису, характерний конститутивно високий рівень концентрації СК [39]. Тому питання про її участь як сигналу у картоплі і рису є дискусійним. Незрозуміло, чи може СК індукувати стійкість у рослин з її високим конститутивним вмістом. Нещодавно на трансгенних NahG рослинах картоплі було показано, що СК необхідна для індукції арахідоновою кислотою стійкості рослин картоплі до *P. infestans* [40]. При цьому стійкість зростає як результат підвищення чутливості до СК, а не посилення її синтезу. Механізм такого індукції невідомий. Можливо, відбувається збільшення доступності СК до рецептора або індукція синтезу і підвищення активності цього рецептора.

Участь АФК у реалізації імунної відповіді. У культурі клітин різних рослин, як правило, спостерігається двофазне зростання концентрації АФК у відповідь на обробку грибними або бактеріальними еліситорами [41, 42]. Перший пік спостерігається через 1 год після обробки, а другий, більш тривалий, настає через 4—5 год. Перший пік вважають неспецифічним збільшенням концентрації АФК, оскільки він індукується як вірулентними, так і авірулентними бактеріями, а другий пік розглядають як расо-специфічний. Особливою рисою АФК є концентраційна залежність індукованого ними ефекту: малі кількості АФК індукують синтез антиоксидантних ферментів, наприклад, глутатіон S-трансферази, в той час як великі кількості ведуть до запуску опосередкованої R-генами програмованої загибелі клітин [43].

АФК відіграють важливу роль у захисних механізмах рослин. Вони справляють пряму антимікробну дію, каталізують механічне зміцнення клітинних стінок, виступають в

ролі вторинних месенджерів в супероксид-синтазній сигнальній системі та запуску реакції НЧ. Окиснювальний «вибух» необхідний також для активації захисних генів і синтезу антибіотичних речовин — фітоалексинів [2, 42]. Розпізнавання елісатора патогена рецепторами на початковій фазі взаємодії партнерів змінює проникність іонних каналів плазматичної мембрани рослинної клітини, що призводить до утворення АФК. Молекули, які зв'язують між собою ці події, ще мають бути визначені. Інгібіторний аналіз показав, що активація рецептора пов'язана зі стимуляцією іонних каналів і утворенням АФК по механізму, що включає фосфорилування білків і ГТФ-зв'язуючих білків [44]. Нещодавно була ідентифікована патогензалежна ізоформа кальмодуліна, котра є, очевидно, мішенню для змінених іонних потоків [45]. Крім того, виявлені декілька ізоформ MAP-кіназ. У одному випадку MAP-кіназа переміщується до ядра відразу після інфікування, її активація і переміщення здійснюються незалежно від окиснювального «вибуху» [46]. Поранення або змішані інфекції рослинної тканини активують іншу MAP-кіназу [47], також не пов'язану з окиснювальним «вибухом». Ці дані дозволяють говорити про індуковану зараженням активацію транскрипції, яка не залежить від утворення АФК.

Аналіз участі АФК у взаємодії в системі патоген—рослина показує, що вони є необхідними сигналами для ініціації імунної відповіді, але не є достатніми і потребують помічників. Крім СК, таким помічником виявилась і інша сигнальна молекула — оксид азоту (NO), який може виступати як токсичний агент, регулятор метаболізму та вторинний месенджер при трансдукції сигналу для активації експресії захисних генів [48]. Рослини навчилися використовувати всі ці три типи сигнальних молекул для регуляції захисних реакцій. Одержані дані свідчать, що взаємодія АФК, СК та NO є синергічною і відбувається, можливо, за механізмом посилення сигналу [48, 49], коли АФК та NO стимулюють синтез СК, котра, в свою чергу, посилює АФК—NO-залежні захисні реакції.

Все наведене свідчить, що роль АФК в процесах, пов'язаних з реалізацією фітоімунного потенціалу, складна і суперечлива. Але рослинні клітини здатні сприймати АФК та транслювати цей сигнал у відповідні реакції. Що ж може слугувати мішенню для АФК у рослин?

Білкові сенсори АФК. Ними виступають так звані редокс-чутливі білки, які здатні зворотно окиснюватись та відновлюватись. АФК можуть окиснювати редокс-чутливі білки безпосередньо [50] або непрямим шляхом через молекули, що контролюють окисно-відновний баланс клітини, такі як глутатіон або тіоредоксин [51]. Редокс-чутливі метаболічні ферменти здатні безпосередньо модулювати процеси метаболізму у клітині, в той час як редокс-чутливі сигнальні білки функціонують через інші компоненти сигнальних систем — протеїнкінази, протеїнфосфатази та фактори регуляції транскрипції [2]. У живих організмів переважають, щонайменше, два механізми редокс-регуляції функцій білків. Перший з них забезпечується окисненням тіолових груп білків. Тіолові групи, як відомо, можуть приєднувати атоми кисню з утворенням сульфгідрильних залишків або формувати дисульфідні зв'язки. Зміни у хімічній будові -SH груп модифікують електронну та стеричну конформацію цистеїнових залишків. Внаслідок цього змінюється конформація білків та/або взаємодії білок—білок. Це призводить до змін активності тих білків, які мають цистеїнові залишки у важливих сайтах [51]. Другим механізмом редокс-регуляції є окиснення залізо-сірчаних (Fe-S) кластерів у білках. Fe²⁺, що виділяється при цьому з окиснених Fe-S кластерів, формує у клітинах найбільш реакційноздатний OH· [52].

Активність багатьох ферментів хлоропластів, таких як ключові ферменти циклу Кальвіна — глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа і фактор, що забезпечує АТФ для біосинтетичних реакцій, регулюються змінами окисно-відновного балансу [53]. Вважається, що значна кількість метаболічних ферментів у прокариот та еукариот (аконітаза, сукцинат-дегідрогеназа, фумараза, сульфідредуктаза,

нітритредуктаза, ферменти метаболізму пуринів, що містять Fe-S кластери) є мішенню для редокс-регуляції [52].

В залежності від характеру стресу рослини генерують АФК, які відрізняються за хімічною будовою. При біогенному стресі, наприклад, у несумісній комбінації патоген — рослина, O_2^- і H_2O_2 генеруються ферментативно і виділяються назовні клітини. Разом з тим як при абіогенному стресі (посуха, сольовий стрес, низькі температури), крім вищезгаданих форм, утворюється ще синглетний кисень в хлоропластах. Відповідно і захисні реакції рослин на біогенний та абіогенний стреси відрізняються між собою. Якщо АФК діють як сигнал для ініціації різних захисних реакцій, то вони, мабуть, повинні мати певну ступінь специфічності, що залежить від їх хімічної будови. Проте, на цей час дуже мало відомо — чи має конкретна форма активного кисню свою специфіку як внутрішньоклітинного сигналу. Очевидно, це пояснюється тим, що більшість досліджень була присвячена сигнальній ролі H_2O_2 та супероксидного аніон-радикала [54], тоді як інші АФК ($OH\cdot$ та 1O_2) одержали значно менше уваги.

Заключення. В ході еволюції живих організмів, які адаптувалися до аеробних умов існування, роль АФК набула певної трансформації. Безперервна їх генерація як неодмінних супутників процесів дихання та фотосинтеза стимулювала виникнення у рослинних клітин АФК-перехоплювачів для мінімізації токсичної дії АФК всередині клітини. В той же час рослини розвинули здатність сприймати зміни концентрацій АФК, які відбуваються при порушенні метаболічних процесів, для включення своїх захисних реакцій, зокрема, проти біогенного стресу.

В рослинних клітинах підтримується певний екзогенний рівень АФК. Наприклад, в регуляції рівня АФК у рослин *Arabidopsis* беруть участь 152 гени, що свідчить про динамічну та високонадійну, навіть надмірну сукупність генів, які кодуєть АФК-продукуючі та АФК-перехоплюючі білки.

Зараз одержано чимало доказів участі кальцієвої сигналізації при розпізнаванні

патогена рослиною. Можливо, що локалізація АФК в окремих органелах та клітинних компартментах в чомусь подібна до просторової та часової організації пролонгованих осциляторних коливань концентрації Ca^{2+} в примембранній області оброблених еліситорами клітин. Розробка внутрішньоклітинних АФК-сенсорів, аналогічних до Ca^{2+} -чутливих флуоресцентних білкових зондів, значно сприяла б розумінню сигнальної ролі АФК в імунітеті рослин.

Подальше вивчення АФК дозволить визначити, чому рослина віддає перевагу тому або іншому сигнальному шляху, як хімічна будова конкретної форми активного кисню та/або внутрішньоклітинна локалізація пов'язані з його сигнальною роллю і які фактори обумовлюють специфічність біологічної активності АФК.

SUMMARY. Reactive oxygen species (ROS) play a key role in plant defense mechanisms. They exert direct antimicrobial action, catalyze the mechanical strengthening of cell walls, function as secondary messengers in the superoxide synthase signal pathway and in triggering the hypersensitive response. Although recent studies have unraveled a nature and the mechanisms of the oxidative burst, many questions related to its mode of regulation, its modulation of signaling networks that control growth, development and defense responses remain unanswered.

РЕЗЮМЕ. Активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в регуляции защитных механизмов растений. Они оказывают прямое антимикробное действие, катализируют механическое упрочнение клеточных стенок, являются вторичными мессенджерами в супероксидсинтазной сигнальной системе и запуске реакции сверхчувствительности. Результаты недавних исследований способствовали пониманию природы и механизмов окислительного «взрыва», хотя регуляция образования АФК, модулирование ими сигнальных путей, которые контролируют рост, развитие и иммунный ответ растений, остаются загадкой.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Halliwell B., Cutleridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. — Clarendon Press, 1989.
2. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 294 с.
3. Дмитрієв А.П. Сигнальные системы иммунитета

- растений // Цитология и генетика. — 2002. — 36, № 3. — С. 58—68.
4. *Dat J.* Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2000. — 57. — P. 779—795.
 5. *Neill S.* Hydrogen peroxide signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2002. — 5. — P. 388—395.
 6. *Mittler R.* Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant. Sci.* — 2002. — 7. — P. 405—410.
 7. *Foreman J.* Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth // *Nature.* — 2003. — 422. — P. 442—446.
 8. *Foyer C.H., Harbinson J.* Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport // *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants.* — Boca Raton : CRC Press, 1994. — P. 1—42.
 9. *Sutherland M.W.* The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* — 1991. — 39. — P. 79—93.
 10. *Scandalios J.* Oxygen stress and superoxide dismutases // *Plant Physiol.* — 1993. — 101. — P. 7—12.
 11. *Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inze D.* Superoxide dismutase in plants // *Crit. Rev. Plant Sci.* — 1994. — 13. — P. 199—218.
 12. *Willekens H., Chamnongpol S., Davey M. et al.* Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants // *EMBO J.* — 1997. — 16. — P. 4806—4816.
 13. *Asada K., Takahashi M.* Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis // *Photoinhibition.* — Elsevier, 1987. — P. 227—287.
 14. *Lopez-Huertas E., Charlton W., Johnson B. et al.* Stress induces peroxisome biogenesis genes // *EMBO J.* — 2000. — 19. — P. 6770—6777.
 15. *Ma M., Eaton J.W.* Multicellular oxidant defense in unicellular organisms // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1992. — 89. — P. 7924—7928.
 16. *Asada K.* The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1999. — 50. — P. 601—639.
 17. *Juhnke H., Krems B., Kotter P. et al.* Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress // *Mol. Gen. Genet.* — 1996. — 252. — P. 456—464.
 18. *Conklin P.L., Williams I.C., Last R.L.* Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1996. — 93. — P. 9970—9974.
 19. *Creissen G., Firmin J., Fryer M. et al.* Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress // *Plant Cell.* — 1999. — 11. — P. 1277—1292.
 20. *Hiraga S. et al.* A large family of class III plant peroxidases // *Plant Cell Physiol.* — 2001. — 42. — P. 462—468.
 21. *Pignocchi C., Foyer C.H.* Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2003. — 6. — P. 145—150.
 22. *Rizsky L. et al.* The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress // *J. Biol. Chem.* — 2003. — 278. — P. 38921—38925.
 23. *Chew O. et al.* Characterization of the targeting signal of dual-targeted pea glutathione reductase // *Plant Mol. Biol.* — 2003. — 53. — P. 341—356.
 24. *Doke N.* Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato-tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components // *Physiol. Plant Pathol.* — 1983. — 23. — P. 345—357.
 25. *Zhou F., Zhang Z., Gregersen P.L. et al.* Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus // *Plant Physiol.* — 1998. — 117. — P. 33—41.
 26. *Wojtaszek P.* Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection // *Biochem J.* — 1997. — 322. — P. 681—692.
 27. *Tenhaken R., Levine A., Brisson L. et al.* Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1995. — 92. — P. 4158—4163.
 28. *Rajasekhar V.K., Lamb C., Dixon R.A.* Early events in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* // *Plant Physiol.* — 1999. — 120. — P. 1137—1146.
 29. *Kauss H., Jeblick W.* Pretreatment of parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H₂O₂ // *Plant Physiol.* — 1995. — 108. — P. 1171—1178.
 30. *Keller T., Damude H.G., Verner D. et al.* A plant homologue of the neutrophil NADPH oxidase gp91 phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs // *Plant Cell.* — 1998. — 10. — P. 235—266.
 31. *Дмитриев А.П.* Фитоалексины и их роль в устойчи-

- ности растений. — Киев : Наук. думка, 2000. — 208 с.
32. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F.V. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. — 2004. — 9. — P. 490—498.
 33. Georgiou G. How to flip the (redox) switch // Cell. — 2002. — 111. — P. 217—246.
 34. Wu Y., Kusma J., Marechal E. et al. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plant // Science. — 1997. — 278. — P. 2126—2130.
 35. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid // Science. — 1993. — 262. — P. 1883—1886.
 36. Chen Z., Iyer S., Caplan A. et al. Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues // Plant Physiol. — 1997. — 114. — P. 193—201.
 37. Czernic P., Visser B., Sun W. et al. Characterization of an Arabidopsis thaliana receptor-like protein kinase gene activated by oxidative stress and pathogen attack // Plant J. — 1999. — 18. — P. 321—327.
 38. Shulaev V., Leon J., Raskin I. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? // Plant Cell. — 1995. — 7. — P. 1691—1701.
 39. Lamb C., Dixon R.A. The oxidative burst in plant disease resistance // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1997. — 48. — P. 251—275.
 40. McDowell J.M., Dangl J.L. Signal transduction in the plant immunity response // Trends Biochem. Sci. — 2000. — 25. — P. 79—82.
 41. Baker B., Zambryski P., Staskawicz B., Dinesh-Kumar S.P. Signaling in plant-microbe interactions // Science. — 1997. — 276. — P. 726—733.
 42. Перковская Г.Ю., Кравчук Ж.Н., Гродзинский Д.М., Дмитриев А.П. Индукция активных форм кислорода и фитоалексинов в культуре клеток *Allium cepa* биогенными элиситорами из гриба *Botrytis cinerea* // Физиология растений. — 2004. — 51. — С. 680—685.
 43. Levine A., Tenhaken R., Dixon R. et al. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response // Cell. — 1994. — 79. — P. 583—593.
 44. Scheel D. Resistance response physiology and signal transduction // Curr. Opin. Plant Biol. — 1998. — 1. — P. 305—310.
 45. Heo W.D., Lee S.H., Kim M.C. et al. Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1999. — 96. — P. 766—771.
 46. Ligterink W., Kroj T., Zur N. et al. Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants // Science. — 1997. — 276. — P. 2054—2057.
 47. Romeis T., Piedras P., Zang S. et al. Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses // Plant Cell. — 1999. — 11. — P. 273—287.
 48. Дмитриев А.П. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс // Физиология растений. — 2003. — 50. — С. 465—474.
 49. Neill S.J., Desikah R., Clarke A. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants // J. Exp. Bot. — 2002. — 53. — P. 1237—1247.
 50. Storz G., Imlay J. Oxidative stress // Curr. Opin. Microbiol. — 1999. — 2. — P. 188—194.
 51. Arrigo A.P. Gene expression and the thiol redox state // Free Rad. Biol. Med. — 1999. — 27. — P. 936—944.
 52. Imsande J. Iron-sulfur clusters formation, perturbation, and physiological functions // Plant Physiol. Biochem. — 1999. — 37. — P. 87—97.
 53. Vranova E., Inze D., Breusegem F. Signal transduction during oxidative stress // J. Exp. Bot. — 2002. — 53. — P. 1227—1236.
 54. Laloi C., Apel K., Danon A. Reactive oxygen signalling: the latest news // Curr. Opin. Plant Biol. — 2004. — 7. — P. 323—328.

Надійшла 10.01.05