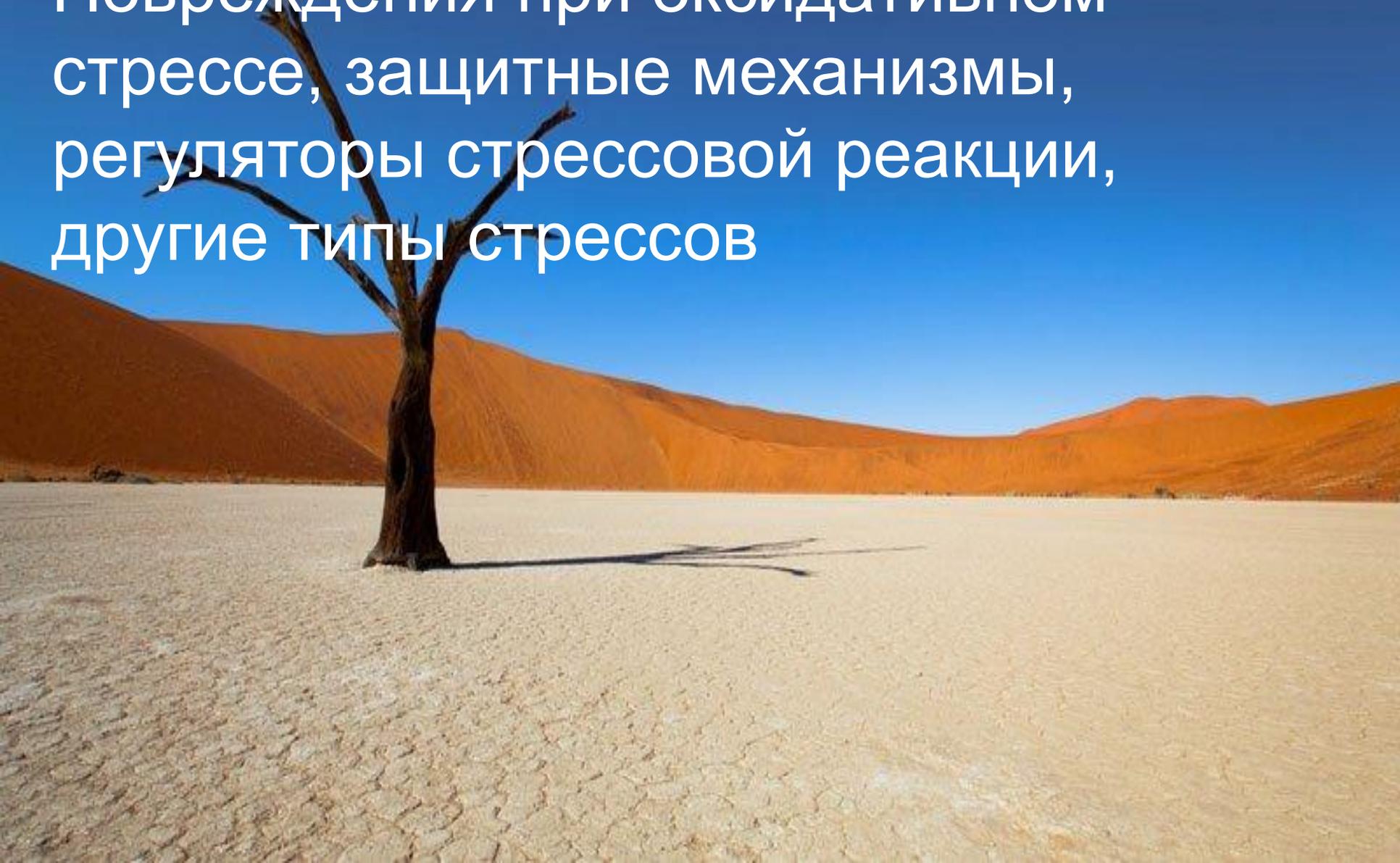


Лекции 26-28

Повреждения при оксидативном стрессе, защитные механизмы, регуляторы стрессовой реакции, другие типы стрессов



АФК-сенсоры (рецепторы) в клетках растений:

- 1. Двухкомпонентные гистидин-киназы;**
- 2. Редокс-чувствительные факторы транскрипции, такие как NPR1 или HSFs (Heat Shock Factors)**
- 3. АФК-чувствительные фосфатазы**
- 4. Редокс-регулируемые ионные каналы.**

Кальций-связывающие белки (CBPs) – 5 классов:

- Кальмодулины
- кальмодулин-подобные белки
- Ca^{2+} -зависимые протеин-киназы (CDPKs)
- Кальцинеурин В-подобные белки
- НАДФН-оксидазы



CDPKs (на них воздействует АБК и жасмоновая кислота) напрямую переводят (трансдуцируют) Ca^{2+} -сигналы в каталитическую активность.

Кальмодулины и кальмодулин-подобные белки, кальцинеурин В-подобные белки действуют как связующий элемент, передавая сигнал на регуляторный белок, например, фактор транскрипции, MAPK, серин-треонин-киназы, фосфатазы.

Гидроперекисное окисление липидов

(липиды – наиболее чувствительны к оксидативному стрессу, они способны к лавинообразному окислению и разрушению по низкомолекулярных продуктов):

3 стадии: (1) инициации, (2) пропагации и (3) терминации

(1) Инициация – атом водорода отрывается от липидной молекулы – это вызывается мощными радикалами, не H_2O_2 и не супероксидом. Иницирующие факторы: **гидроксильный радикал, алкоксильный радикал, пероксильный радикал и, возможно, гидропероксильный радикал.**

Водород отнимается от метиленовой группы ($-CH_2-$) давая **$-CH-$**

Фосфолипиды – главная мишень – они имеют ослабленную двойную связь.

Липидный радикал (L^\bullet). L^\bullet может активировать O_2 и формировать липидный пероксильный радикал (LOO^\bullet), который способен отнимать H^+ от соседней жирной кислоты и продуцировать липидный гидропероксид ($LOOH$) и другой L^\bullet .

Это дает начало **(2) пропагации**:

$LOOH$ претерпевает «восстановительный разрыв» под действием восст. переходного металла (Fe^{2+} или Cu^+) и формирует липидный алкоксильный радикал (LO^\bullet), который также реагирует с ЖК, отнимая у них H^+ и формируя новый L^\bullet .

Другой механизм – прямая реакция синглетного кислорода с двойной связью липида, дающая сразу $LOOH$.

Но и сам синглетный кислород может продуцироваться при гидроперексинном окислении липидов – при реакции двух молекул липидный пероксильного радикала (LOO^\bullet).

(3) Фаза терминации

Липиды разлагаются во время стадии пропагации до терминальных низкомолекулярных продуктов (т. н. продуктов гидроперекисного окисления липидов) – это токсичные и реакционно-активные вещества, такие как:

- малоновый диальдегид**
- 4-гидрокси-2-ноненал**
- 4-гидрокси-2-гексенал**
- акролеин**

Наиболее важные модификации аминокислот под действием АФК (согласно Berlett and Stadtman, 1997; Shacter 2000; Stadtman and Levine, 2000; Cecarini *et al.*, 2007; Avery, 2011).

Аминокислота	Окисленная форма
Цистеин	Цистеин → цистин → цистеиноно-сульфеновая кислота → цистеиноно-сульфиновая кислота → цистеиновая кислота
Метионин	R- и S-стереоизомеры метионин-сульфоксида → метионин-сульфон
Гистидин	2-оксогистидин, аспарагин, аспартат, 4-гидроксиноненал-гистидин
Глутамил (глутамин, глутатион, глутамат)	Оксалат, пируват

Наиболее важные модификации аминокислот под действием АФК (согласно Berlett and Stadtman, 1997; Shacter 2000; Stadtman and Levine, 2000; Cecarini et al., 2007; Avery, 2011).

Аминокислота	Окисленная форма
Лизин	α -aminoadipic semialdehyde, chloramines, malondialdehyde-lysine (MDA-Lys), 4-hydroxynonenal-lysine (HNE-Lys), acrolein-lysine, carboxymethyllysine, p-hydroxyphenylacetaldehyde-lysine (pHA-Lys)
Тирозин	p-hydroxyphenylacetaldehyde, dityrosine, nitrotyrosine, chlorotyrosines, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA),
Треонин	2-amino-3-ketobutyric acid
Триптофан	hydroxy- and nitro-tryptophans, kynurenines
Фенилаланин	hydroxyphenylalanines
Валин, лейцин	hydroperoxides and hydroxides
Пролин	hydroxyproline, pyrrolidone, glutamic semialdehyde
Аргинин	glutamic semialdehyde, chloramines

Основные окислительные повреждения биомолекул при стрессе:

Оксидативное повреждение белков

A - окисление серусодержащих аминокислот:

цистеина, метионина

(см. ранее приведенную Таблицу)

В целом считается имеющим низкий повреждающий потенциал

Окисление цистеина обратимо под действием ферментативных систем (тиоредоксин и глутаредоксин). Приводит к обратимым, т.е. имеющим регуляторный характер, изменениям функций белка и клетки.

Окисление метионина часто обратимо, но в большинстве случаев не имеет регуляторной роли и не проявляется в модификации функций белка.

Б - Карбонилирование – формирование или встраивание свободной карбонильной группы (C=O)

Вторая по встречаемости реакция оксидативного повреждения белков при стрессе.

Требует большей энергии, чем реакции АФК с серусодержащими аминокислотами.

Вызывает серьезные повреждения, имеющие более продолжительный патофизиологический характер по сравнению с эффектами АФК на Мет и Цис.

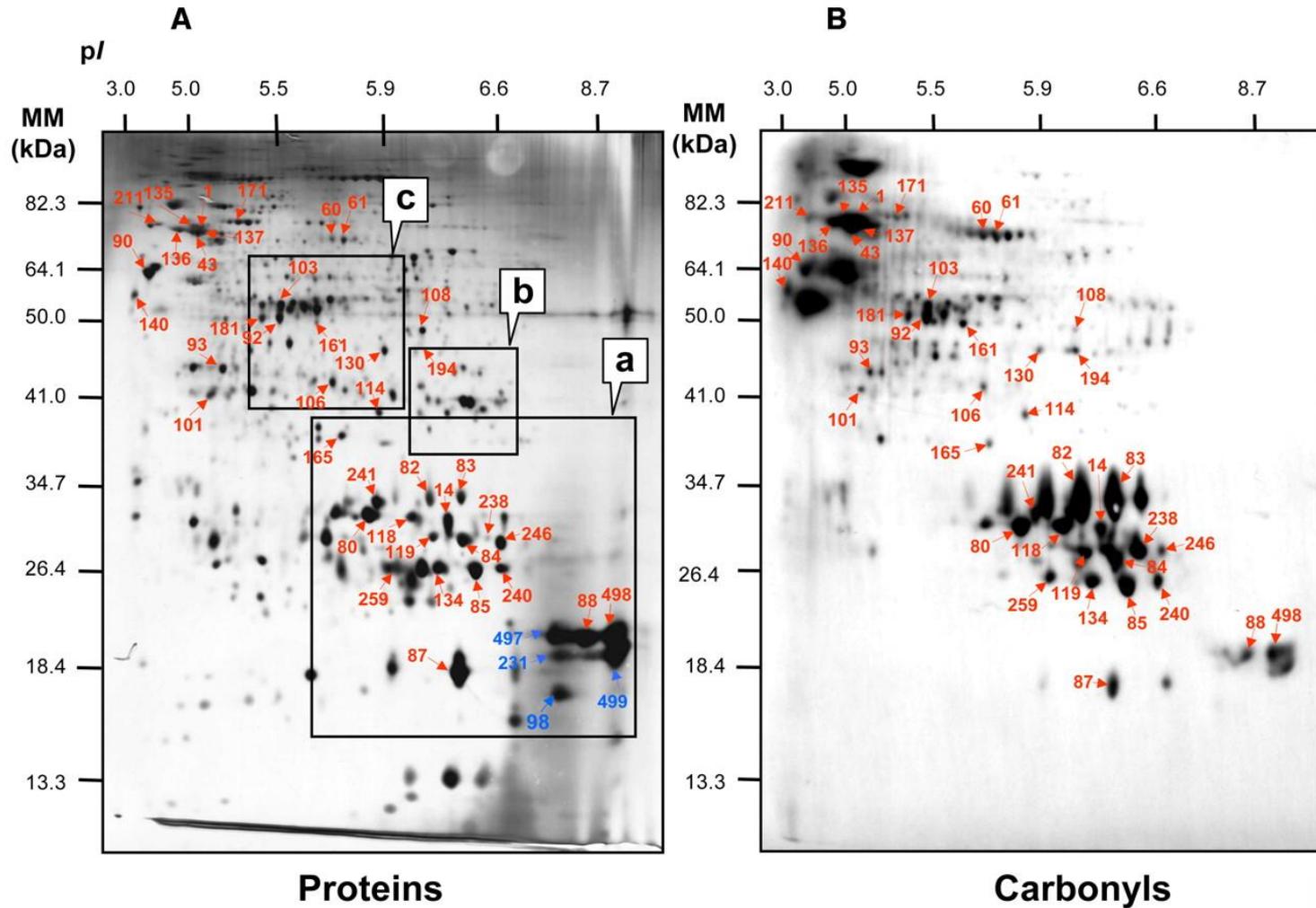
Карбонилирование приводит к образованию реактивных кетонов и альдегидов, детектируемых тестом Бради с 2,4-динитрофенилгидразином (в тесте образуются динитрофенилгидразон с яркой оранжево-красной или желтой окраской).

Большинство аминокислот карбонилируются в присутствии наиболее активных АФК. Но первичными мишенями карбонилирования считаются боковые цепи лизина, треонина, аргинина и пролина.

Ранее считалось, что карбонилирование необратимо. Сейчас показано, что некоторые факторы транскрипции карбонируются обратимо .



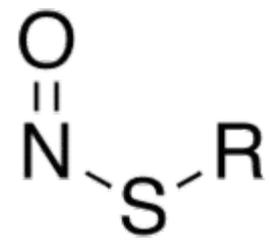
Two-dimensional profiles of protein abundance and oxidation in dry mature Arabidopsis seeds.



Job C et al. Plant Physiol. 2005;138:790-802



B – S-нитрозилирование.



нитротиол

Недавно открытое повреждение серусодержащих аминокислот белков под действием нитрозативного стресса.

Механизм:

NO• реагирует с O₂^{•-} и дает пероксинитрит, являющийся мощным окислителем, вызывающим нитрозилирование.

Оксидативное «повреждение» углеводов.

Моно- и дисахариды – важные АФК-связывающие агенты, проявляющие антиоксидантные свойства.

Это показывает, что они способны реагировать с АФК.

Например, по отношению к связыванию (детоксификации) $\cdot\text{OH}$ сахара можно расположить в следующем порядке: мальтоза > сахароза > фруктоза > глюкоза > деоксирибоза > сорбитол (*Morelli et al., 2003*). Есть факты, показывающие, что моносахара контролируют уровень оксидативного стресса у растений.

Тем не менее пока кроме формиатов не изучены продукты метаболизма окисления сахаров! Формиаты считаются основными продуктами оксидативного повреждения сахаров:

$\text{CH}_3(\text{HCOO})$: метилформиат (метиловый эфир муравьиной кислоты);

HCOONa : формиат натрия (натрий муравьинокислый);

$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{HCOO})$: этилформиат;

NH_4HCO_2 : формиат аммония;

$\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}_3$: триэтилортоформиат.

Оксидативное «повреждение» нуклеиновых кислот.

Для большинства однолетних культурных растений проблема рака не актуальна. Тем не менее сильное повреждение ДНК и РНК вызывает преждевременное старение семян и смерть растений.

Классически выделяют три типа повреждения ДНК/РНК, которые связаны с оксидативным стрессом у растений:

- 1 - ошибочное спаривание нуклеотидов
- 2 – разрыв обеих цепей
- 3 – химическая модификация оснований

Гидроксильные радикалы считаются главным повреждающим фактором для полинуклеиновых кислот при стрессах:

- присоединяются к двойным связям оснований нуклеотидов
- окисляют гуанин до 8-оксо-7,8-дигидрогуанина (8-охоG) и 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формаидопиримидина (FapyG) (Cooke et al., 2003; Wang et al., 2010)
- отнимают H⁺ связей C-H 2'-деоксирибозы и метильной группы Тимина

Основные антиоксидантные системы растений (см. также предыдущие лекции).

Ключевые ферментативные антиоксиданты (обычно отличающиеся высокой специфичностью к определенным АФК):

Цитоплазматическая Cu-Zn-SOD – (SOD – супероксиддисмутаза)

Митохондриальная Mn-SOD

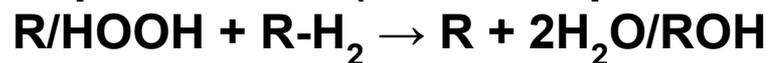
Хлоропластная Fe-SOD

Все SOD катализируют следующие реакции:



Каталазы (сейчас считается, что локализованы почти во всех органеллах, даже в ядрах) : $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Пероксидазы (во всех органеллах и снаружи клетки, много форм):



Пероксиредоксины: $\text{ROОН} \rightarrow \text{РОН}$

Тиоредоксины и глутаредоксины: $\text{R-S-S-R} \rightarrow 2\text{R-SH}$

Основные антиоксидантные системы растений (см. также предыдущие лекции).

Ключевые неферментативные антиоксиданты (обычно отличающиеся невысокой специфичностью к определенным АФК):

- аскорбиновая кислота
- восстановленный глутатион
- пролин
- полиамины (основные: путресцин, спермидин, спермин)
- бетаин
- каротены
- некоторые флавоноиды
- α -токоферол

Эти вещества часто рассматривают как основные регуляторы стрессовых реакций у растений.

Вспомогательные системы антиоксидатной защиты растений.

Служат для поддержания антиоксидантов в функциональном состоянии. Часто это восстановленное состояние.

А – восстановители аскорбата и глутатиона:

- монодегидроаскорбат-редуктаза
- дегидроаскорбат-редуктаза
- тиоредоксин-редуктаза
- глутатион-редуктаза
- глутатион-S-трансфераза

Б – вещества, связывающие переходные металлы:

- металлотионеины (короткие Цис-обогащенные пептиды)
- фитохелатины (олигомеры глутатиона)
- пектины
- ксилоглюканы

Данная группа также считается ключевыми регуляторами реакций стресса.

Пероксидазы растений:

Три «классических» типа: класс-I, класс-II and класс-III.

Пероксиредоксины сейчас часто относят с четвертому классу пероксидаз.

Все три класса имеют схожий гем в виде протопорфирина IX, трехвалентное железо и схожую 3D-структуру, однако между классами существует большое отличие по последовательности, механизму функционирования и физиологической значимости.

Класс I включает внутриклеточные пероксидазы, которые не существуют у животных, но присутствуют у бактерий. Считаются эволюционным «ориджином» для других типов пероксидаз.

Класс I детоксифицирует эндогенную H_2O_2 (восстанавливая ее до O_2 and H_2O) и подразделен на три группы: аскорбат-пероксидазы, каталазо-пероксидазы и цитохром-с-пероксидазы.

Пероксидазы растений:

Недавно найдены гибридные пероксидазы первого класса, совмещающие структуру каталазо-пероксидазы и цитохром-с-пероксидазы.

Аскорбат-пероксидаза (АРХ) – ключевой фермент доксификации H_2O_2 в хлоропластах, пероксисомах и цитозоли. Экспрессия АРХ усиливается при практически любом стрессовм воздействии. Сверх-экпрессия АРХ – один из немногих доказанных путей повышения стрессоустойчивости.

Цитохром-с-пероксидазы – водорастворимые ферменты митохондриального внутримембранного пространства, которые принимают электрон от цитохрома с и передают его H_2O_2 , восстанавливая последнюю.

Каталазо-пероксидаза – двухфункциональный фермент, работающий как каталаза и пероксидаза (с различным субстратом).

Пероксидазы растений:

Второй класс пероксидаз существует только у грибов – включает марганец-пероксидазы, лигнин-пероксидазы, и так-называемые версатильные пероксидазы – они отвечают за разложение древесины.

Класс III пероксидаз – обильный мультигенный класс (73 представителя у *Arabidopsis thaliana*).

В большинстве случаев ферменты секретируются во внеклеточное пространство и представлены свободно в апопласте или чаще связаны с клеточной стенкой.

2 типа реакций – первый цикл - “пероксидативный цикл” – восстанавливают H_2O_2 , забирая электроны от молекул лигнина, ауксина, полифенолов, др. вторичных метаболитов.)
Второй цикл - “гидроксилитический цикл”, в котором идет генерация супероксида и гидроксильных радикалов.

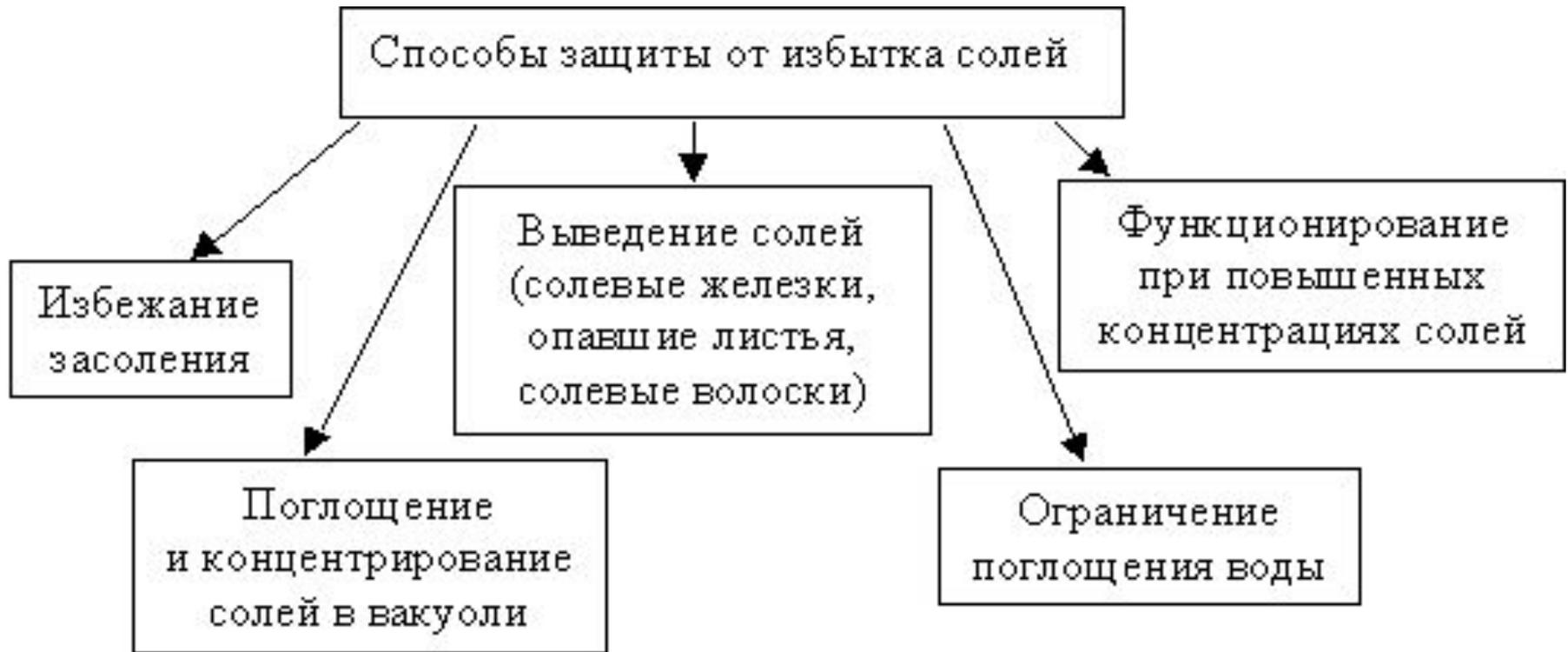
Общие защитные механизмы (против практически любого стрессового повреждения):

- усиление катаболических процессов для высвобождения энергии**
- активация ионных транспортеров**
- синтез осмопротекторов**
- синтез антиоксидантов всех типов и веществ, связывающий (хелатирующих) переходные металлы**
- перестройка факторов сигнальной трансдукции**
- перестройка систем репарации белков и др. компонентов клетки**
- адаптация на уровне генетических программ**

Способность культурных растений выдерживать засоление

Засоление	Содержание солей, в % от сухой массы почвы	Растения
Незначительное	Меньше 0,1	Все культуры
Слабое	0,1–0,4	Все зерновые, кроме кукурузы; вика, люцерна
Среднее	0,4–0,6	Хлопчатник, тимофеевка, ежа сборная, донник, пшеница
Среднесильное	0,6–0,8	Кормовая брюква, кормовая капуста, пырей, сорго
Сильное	0,8–1,0	Сахарная свекла, подсолнечник, пырей западный, райграс французский, костер безостый

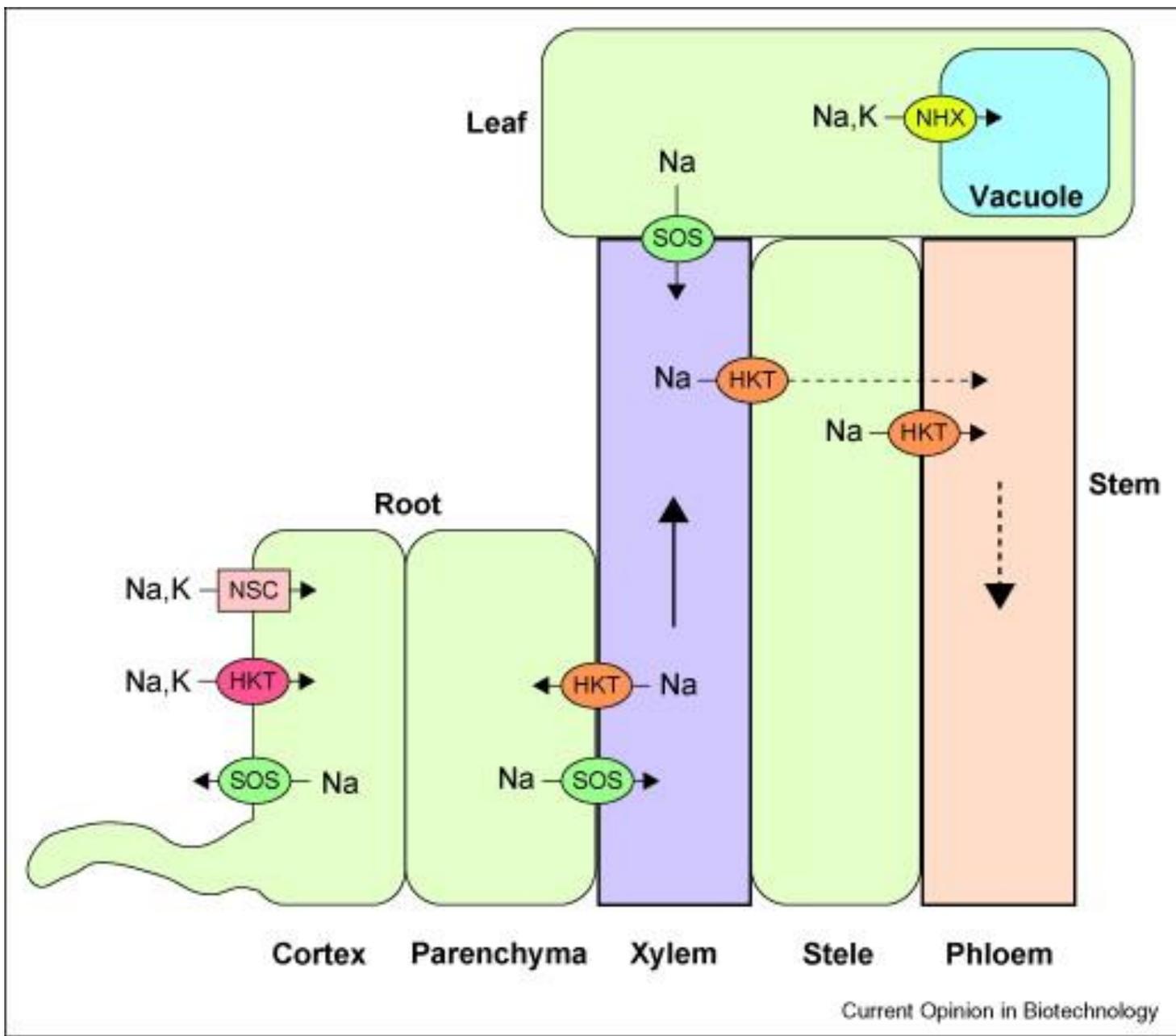
Способы защиты растений от избытка солей



Галофиты: — растения, способные жить при высоких уровнях засоления (солянки, ежовники, полыни, бессмертники, тамариск и др.).

Распространены на морских побережьях, пустынях, полупустынях, степях на солонцах и солончаках (замоленные почвы). Нередко имеют толстые суккулентные стебли и листья, что способствует сохранению влаги. Обычно характеризуются высоким осмотическим давлением клеточного сока в клетках и тканях, что позволяет им поглощать воду из концентрированных растворов.

Механизм поступления натрия и борьбы с засолением



Механизм поступления натрия и борьбы с засолением

1. Вход Na^+

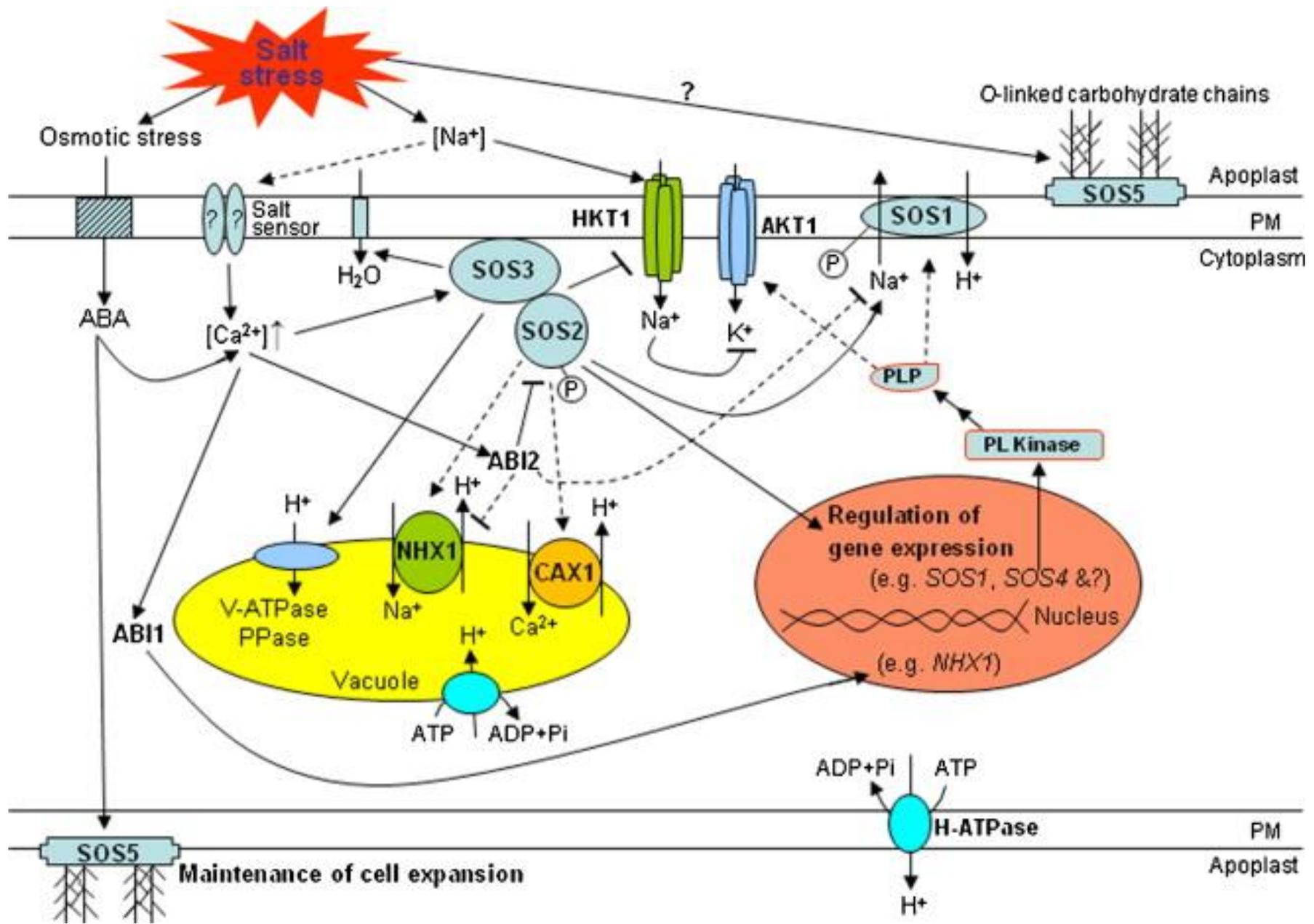
2. Активация сигнала засоления через АФК - Ca^{2+}

3. Активация кальцием SOS3 – Ca^{2+} -связывающего белка

4. Активации SOS2 (протеин-киназы) – напрямую под действием прямого физического взаимодействия с SOS3

5. Фосфорилирование и активация SOS1, которая является Na^+/H^+ -антипортером.

Механизм поступления натрия и борьбы с засолением



**Минимальные температуры роста вегетативных
и генеративных органов различных растений, °С**

Степень устойчивости к холоду	Всходы и вегетативные органы	Генеративные органы
<i>Устойчивые:</i> яровая пшеница, ячмень, овес, горох, чина, сахарная свекла	4–5	8–10
<i>Среднеустойчивые:</i> люпин однолетний, бобы, лен, подсолнечник, гречиха	5–6	10–12
<i>Малоустойчивые:</i> просо, кукуруза, соя, сорго, фасоль	11–13	15–18
<i>Неустойчивые:</i> рис, хлопчатник, бахчевые, арахис	14–15	18–20

Пути приспособления растений к засухе

