

BEATRYCZE NOWICKA, JERZY KRUK

*Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 7, 30-387 Kraków
E-mail: beatrycze.nowicka@uj.edu.pl*

REAKTYWNE FORMY TLENU W ROŚLINACH – WIĘCEJ NIŻ TRUCIZNA

WPROWADZENIE

Pojawienie się organizmów zdolnych do przeprowadzania fotosyntezy oksygenicznej (czyli takiej, w wyniku której powstaje O_2) okazało się przełomowym wydarzeniem dla ewolucji życia na Ziemi, doprowadziło bowiem do zmiany składu atmosfery. Jedną z jej z konsekwencji było upowszechnienie się wydajnego energetycznie metabolizmu tlenowego, który jednakże wiąże się z powstawaniem niepożądanych produktów ubocznych – reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) (HALLIWELL 2006). ROS mogą uszkadzać składniki komórek, a ich nadmierna produkcja prowadzi do śmierci komórek (AHMAD i współaut. 2008). W orga-

nizmach żywych ROS pełnią także pozytywne funkcje, bowiem uczestniczą w transdukcji sygnałów oraz w odpowiedzi na atak patogenu (BREUSEGEM i współaut. 2008). Ścisła regulacja stężenia ROS w zależności od warunków środowiska, etapu rozwoju, organu, tkanki i typu komórek jest kluczowa dla prawidłowego rozwoju roślin. Jak skomplikowanym problemem badawczym jest poznanie roli ROS w roślinach niech zaświadczy fakt, iż u *Arabidopsis thaliana* do tej pory odkryto 289 genów kodujących enzymy odpowiedzialne za generowanie i usuwanie ROS (GECHEV i współaut. 2006).

RODZAJE ROS I ICH REAKTYWNOŚĆ

Tlen cząsteczkowy w stanie podstawowym jest pierwiastkiem o nietypowej konfiguracji elektronowej, odpowiadającej za jego niską reaktywność. Jest on birodnikiem, posiada dwa niesparowane elektrony o równoległych spinach na dwóch antywiążących orbitalach π^*2p . W polu magnetycznym posiada trzy poziomy energetyczne, z tego względu nazywany jest także tlenem tripletowym (3O_2) (HALLIWELL 2006).

Tlen tripletowy może ulegać wzbudzeniu, które wiąże się z odwróceniem spinu jednego z elektronów na orbitalu π^*2p . W jego wyniku powstaje tzw. tlen singletowy, 1O_2 . Zniesienie zakazu spinowego powoduje

znaczna reaktywność 1O_2 (TRANTAPHYLIDES i HAVAUX 2009). Uważa się, iż 1O_2 jest główną reaktywną formą tlenu odpowiedzialną za uszkodzenie składników komórek liści oraz indukowaną światłem utratę aktywności fotosystemu II (PS II) (KRIEGER-LISZKAY i współaut. 2008, TRIANTAPHYLIDES i HAVAUX 2009).

Tlen cząsteczkowy może także ulegać redukcji. Pełna, czteroelektronowa redukcja tlenu prowadzi do powstania cząsteczki wody. W wyniku jednoelektronowej redukcji tlenu powstaje anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) oraz, po przyłączeniu kationu wodoru, rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^{\cdot}). Obydwie formy mogą ulegać reakcji dysmutacji prowadzącej

do powstawania nadtlenu wodoru (H_2O_2) i O_2 (GECHEV i współaut. 2006). Reakcja H_2O_2 z jonami metali przejściowych (np. Fe^{2+} , Cu^+), tzw. reakcja Fentona, prowadzi do powstawania rodnika hydroksylowego (OH). Jony metali mają tendencję do wiązania się na powierzchni białek oraz DNA i mogą stanowić tam „centra produkcji” OH. Z tego względu rośliny wytwarzają szereg białek, np. metalotioneiny i ferrytyny, które są zdolne do wiązania jonów metali, oraz związki chelatujące (KOHEN i NYSKA 2002, EDREVA 2005, BARTOSZ 2008) (Tabela 1).

Reaktywną formą tlenu jest także ozon (O_3), choć jego występowanie w troposferze wiąże się przede wszystkim z zanieczyszczeniem powietrza wywołanym przez człowieka (BARTOSZ 2008). Za ROS można także uważać związki powstające w wyniku reakcji którejs z wyżej wymienionych form z cząsteczkami organicznymi, np. rodnik alkoksyłowy ($RO\cdot$, gdzie R to reszta kwasu tłuszczowego), rodnik nadtlenny ($ROO\cdot$) czy wodoronadtlenek ($ROOH$) (BARTOSZ 2008).

Tabela 1. Najważniejsze reaktywne formy tlenu (wg DAVIES 2003, CADET i współaut. 2006, GECHEV i współaut. 2006, BARTOSZ 2008, TRIANTAPHYLIDES i HAVAUX 2009).

| Rodzaj ROS | Własności i reaktywność |
|---------------------------------------|--|
| Tlen singletowy 1O_2 | <ul style="list-style-type: none"> – czas życia na tyle długi (4 μs w wodzie), by mogła reagować z innymi cząsteczkami – indukuje peroksydację lipidów – uszkadza białka, reszty Trp, Tyr, His, Met i Cys są szczególnie podatne na utlenienie – utlenia DNA, głównie guaninę – utlenia chlorofil – utlenia inne związki zawierające wiązania nienasycone, tworząc cykloaddukty, wodoronadtlenki oraz endoperoksydy |
| Anionorodnik nadtlenny $O_2^{\cdot-}$ | <ul style="list-style-type: none"> – krótki czas życia – uszkadza centra żelazo-siarkowe (Fe-S) w enzymach – może redukować jony metali przejściowych np. Fe^{3+}, Cu^{2+} – reaguje z grupami tiolowymi Cys, może także utleniać His, Met, Trp – może reagować ze związkami zawierającymi wiązania nienasycone dając hydroksynadtlenki – reaguje z tlenkiem azotu, dając bardzo silnie utleniający i szkodliwy dla komórek nadtlenoazotyn |
| Rodnik wodoronadtlenkowy $HO_2\cdot$ | <ul style="list-style-type: none"> – uprotonowana forma $O_2^{\cdot-}$, występuje przede wszystkim w przedziałach o niskim pH – może przechodzić przez błony biologiczne – aktywność podobna do $O_2^{\cdot-}$, z uwagi na możliwość penetracji błon może inicjować peroksydację lipidów |
| Nadtlenek wodoru H_2O_2 | <ul style="list-style-type: none"> – mniej reaktywny, relatywnie stabilny, większy zasięg działania – elektrycznie obojętny, może dyfundować przez błony – wchodzi w reakcje z grupami tiolowymi, indolowymi, imidazolowymi, fenolowymi, tioestrowymi i metionylowymi – uszkadza klaster Mn w centrum rozkładającym wodę w PS II oraz grupy hemo-we |
| Rodnik hydroksylowy OH | <ul style="list-style-type: none"> – najbardziej reaktywna forma tlenu – reaguje z każdą napotkaną cząsteczką z szybkością ograniczoną jedynie przez dyfuzję – najmniej trwały, jego działanie ograniczone jest do miejsc jego powstawania |

MIEJSCA POWSTAWANIA ROS W KOMÓRCIE ROŚLINNEJ

Do najważniejszych miejsc, gdzie w komórce roślinnej powstają ROS należą chloroplasty, peroksyosomy i mitochondria (BREUSEGEM i współaut. 2001). Udział poszczególnych organelli w produkcji ROS przedstawiono w Tabeli 2. Oszacowano, że ok. 1% O_2 pochłanianego przez rośliny jest przekształcane w ROS (BHATTACHARJEE 2005).

Uważa się, że u roślin na świetle głównym źródłem ROS są chloroplasty - funkcjonuje tam fotosyntetyczny łańcuch transportu elektronów, zaś stężenie O_2 jest wysokie (EDREVA 2005). ROS powstają podczas fotosyntezy przez cały czas, jednak ich wzmożona produkcja występuje w warunkach, w których reakcje fazy ciemnej „nie nadążają”

za fazą jasną i dochodzi do nadmiernej redukcji elementów łańcucha fotosyntetycznego. Taka sytuacja może mieć miejsce podczas stresu świetlnego lub termicznego (AHMAD i współaut. 2008, EDREVA 2005). Gdy reakcje przekazywania elektronów na dalsze akceptory są utrudnione, następuje wydłużenie czasu życia wzbudzonego chlorofilu w stanie singletowym w centrum reakcji PS II ($^1P680^*$), co sprzyja konwersji do stanu tripletowego ($^3P680^*$). Zachodzić może także rekombinacja ładunku pomiędzy feofityną a $P680^+$ powstającymi po przeniesieniu elektronu na pierwotny akceptor elektronu, co również prowadzi do powstawania $^3P680^*$. Wzbudzony chlorofil w stanie tripletowym może

Tabela 2. Powstawanie ROS w komórce roślinnej (wg CADENAS i DAVIES 2000, CORPAS i współaut. 2001, VRANOVA i współaut. 2002, KRIEGER-LISZKAY 2004, BHATTACHARJEE 2005, EDREVA 2005, YESBERGENOVA i współaut. 2005, GECHEV i współaut. 2006, KOTCHONI i GACHOMO 2006, RIO i współaut. 2006, AHMAD i współaut. 2008, SANG i współaut. 2010).

| Miejsce powstawania | Proces/enzym | Rodzaj ROS |
|-----------------------------|---|-----------------------------|
| Chloroplasty | PS II – przekaz energii wzbudzenia z $^3P680^*$ na tlen | 1O_2 |
| | „Wyciek” elektronów po stronie akceptorowej PS II | $O_2^{\cdot-}$ |
| | Anteny LHC II – przekaz energii wzbudzenia tripletowego stanu chlorofilu | 1O_2 |
| | Cyt <i>b_f</i> | 1O_2 |
| Chloroplasty | PS I – „wyciek” elektronów w centrach Fe-S | tzw. reakcja $O_2^{\cdot-}$ |
| | Redukcja O_2 przez zredukowaną ferredoksynę | Mehlera $O_2^{\cdot-}$ |
| Peroksyosomy i glioksyosomy | Utlenianie glikolanu przez oksydazę glikolanową | H_2O_2 |
| | β -oksydacja kwasów tłuszczowych | H_2O_2 |
| | Oksydaza ksantynowa | $O_2^{\cdot-}$ |
| | Przekształcanie kwasu moczowego do allantoiny | H_2O_2 |
| | PMPs (ang. peroxisomal membrane polypeptids) występujące w błonach peroksyosomów, utleniające NAD(P)H | $O_2^{\cdot-}$ |
| Mitochondria | Oksydazy flawinowe | H_2O_2 |
| | „Wyciek” elektronów w kompleksie I | $O_2^{\cdot-}$ |
| | Zredukowana pula ubichinolu w błonach | $O_2^{\cdot-}$ |
| | „Wyciek” elektronów w kompleksie III | $O_2^{\cdot-}$ |
| Retikulum endoplazmatyczne | Zewnętrzna błona mitochondrialna – oksydaza monoaminowa | H_2O_2 |
| | Reakcje detoksykujące przeprowadzane przez cytochromy, zwłaszcza cytochrom P_{450} | $O_2^{\cdot-}$ |
| Cytoplazma | Oksydaza aldehydowa | H_2O_2 |
| | Reakcje detoksykujące przeprowadzane przez cytochromy, zwłaszcza cytochrom P_{450} | $O_2^{\cdot-}$ |
| Błona komórkowa | Oksydaza NADPH | $O_2^{\cdot-}$ |
| Apoplast | Peroksydazy zależne od pH związane ze ścianą komórkową | H_2O_2 |
| | Oksydazy aminowe | H_2O_2 |
| | Oksydaza szczawianowa (podobna do germiny) | H_2O_2 |

z kolei przekazać energię na $^3\text{O}_2$, w wyniku czego powstaje $^1\text{O}_2$ (TRIANANTAPHYLIDES i HAVAUX 2009). Nadmierna redukcja elementów łańcucha fotosyntetycznego prowadzi także do zwiększonego „wyciekania” elektronów z łańcucha i powstawania $\text{O}_2^{\cdot-}$ (ASADA 2006, GECHEV i współaut. 2006). W trakcie ewolucji rośliny wytworzyły szereg mechanizmów osłabiających generowanie ROS w chloroplastach. Na poziomie molekularnym związane są one przede wszystkim z niefotochemicznym wygaszaniem stanu wzbudzonego chlorofilu (NPQ).

Znaczne ilości ROS powstają również w peroksysomach. Szczególnie dotyczy to roślin C_3 w warunkach niedoboru CO_2 , czyli wtedy, gdy nasila się fotooddychanie (FOYER i NOCTOR 2003).

Mitochondria, uważane za główne źródło ROS w komórkach zwierzęcych, u roślin odgrywają mniejszą rolę, choć sądzi się, iż ich udział w produkcji ROS może dominować w tkankach niefotosyntetyzujących lub w ciemności (RHOADS i współaut. 2006, NAVROT i współaut. 2007, NOCTOR i współaut. 2007). Za główne miejsca powstawania ROS w mitochondriach uważa się kompleks I i III (LENAZ i współaut. 2007). Podobnie, jak w przypadku fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów, do wzmożonego „wycieku” elektronów z oddechowego łańcucha transportu elektronów dochodzi w warunkach nadmiernej redukcji jego elementów

(RHOADS i współaut. 2006). Również w tym przypadku wykształciły się mechanizmy zapobiegające owej nadmiernej redukcji, m.in. obecność oksydazy alternatywnej (AOX), która przenosi elektrony bezpośrednio z ubichinolu (UQH_2) na tlen, a także obecność białka rozprzegającego UCP (ang. uncoupling protein), które pośrednio wpływa na regulację procesów oddechowych (HALLIWELL 2006, RHOADS i współaut. 2006).

Przypuszcza się, iż produkty pośrednie biosyntezy oraz produkty rozpadu chlorofilu i hemu mogą też generować $^1\text{O}_2$, choć efekt ten był obserwowany jedynie u mutantów akumulujących te produkty (NOCTOR i współaut. 2007, TRIANTAPHYLIDES i HAVAUX 2009). Rośliny wytwarzają specjalne białka ELIPs (ang. early light-induced proteins) i WSCPs (ang. water-soluble chlorophyll binding proteins) zdolne wiązać wolny chlorofil, na przykład uwalniany w warunkach stresu świetlnego, gdy dochodzi do degradacji fotosystemów. Niezwiązany z białkami chlorofil wykazuje aktywność fotocuczulającą, stąd wytwarzanie wspomnianych białek uważa się za mechanizm ochronny (KRIEGER-LISZKAY i współaut. 2008). Rośliny niektórych gatunków produkują także metabolity wtórne o właściwościach fotocuczulaczy, zdolne generować $^1\text{O}_2$, m.in. fitoaleksyny wytwarzane w odpowiedzi na atak patogenu (TRIANANTAPHYLIDES i HAVAUX 2009).

USZKODZENIA SKŁADNIKÓW KOMÓRKI POWODOWANE PRZEZ ROS

Najważniejszymi grupami cząsteczek uszkodzonych przez ROS są białka, DNA i lipidy. W przypadku białek, ROS mogą utleniać reszty aminokwasowe oraz kofaktory (np. barwniki) czy grupy prostetyczne (np. centra Fe-S, grupy hemowe). Uszkodzenia białek często powodują utratę aktywności enzymów. Może także dochodzić do zmian struktury trzeciorzędowej, a w konsekwencji agregacji lub degradacji białek (KOHEN i NYSKA 2002, SZYMAŃSKA i STRZAŁKA 2010). Z uwagi na znaczną ilość ROS powstających w chloroplastach, często utlenianiu ulegają białka uczestniczące w fotosyntetycznym transporcie elektronów; szczególnie intensywnie badana jest degradacja białka D1 w PS II (SZYMAŃSKA i STRZAŁKA 2010). Uszkodzenia DNA obejmują uszkodzenia zasad azotowych, reszt cukrowych oraz pęknięcie nici (BARTOSZ 2008).

Za uszkodzanie lipidów odpowiedzialny jest proces zwany peroksydacją lipidów. Podatne na niego są reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. polyunsaturated fatty acids, PUFA), które stanowią ok. 80% kwasów tłuszczowych występujących w liściach (TRIANANTAPHYLIDES i HAVAUX 2009). Peroksydacja lipidów prowadzi do zmian własności błony: zmniejsza jej płynność i zwiększa przepuszczalność. Wśród produktów peroksydacji znajdują się reaktywne związki odpowiedzialne za dalsze uszkodzenia biocząsteczek, np. aldehyd dimalonowy zdolny do sieciowania białek (KOHEN i NYSKA 2002, HALLIWELL 2006, BENTINGER i współaut. 2007, BARTOSZ 2008, NIKI 2009). Wyróżniono trzy mechanizmy peroksydacji lipidów: wolnorodnikowy, enzymatyczny oraz niezależny od wolnych rodników ani od enzymów (NIKI 2009).

Peroksydacja wolnorodnikowa jest reakcją łańcuchową, w której wyróżnić możemy etap inicjacji, propagacji i terminacji. Reakcja inicjacji polega na oderwaniu atomu wodoru od cząsteczki nienasyconego lipidu (KOHEN i NYSKA 2002). Inicjatorami mogą być rodniki OH, HO₂·, ale też rodnik alkilowy (R·), RO·, ROO·, NO₂· czy rodnik nadtlenkowy (Fe³⁺-O₂⁻). Powstający R· ulega przegrupowaniu, w wyniku czego zwiększa się jego stabilność. Następnie, może się do niego przyłączyć cząsteczka O₂, dając ROO·. Reakcja ta rozpoczyna etap propagacji, gdyż ROO· odrywa atom wodoru od innej cząsteczki lipidu, prowadząc do powstania ROOH i R·. W ten sposób

reakcji ulegają kolejne cząsteczki lipidów. Reakcja terminacji zachodzi pomiędzy dwoma rodnikami. Rodniki lipidowe mogą reagować również z białkami błonowymi (JAMES i współaut. 2004, BENTINGER i współaut. 2007, BARTOSZ 2008). Mechanizm enzymatyczny jest zależny od aktywności lipooksygenazy i nie będzie tutaj omawiany. Reakcja niezależna od enzymów i rodników polega na utlenianiu lipidów przez ¹O₂ i O₃, w wyniku czego powstają ROOH oraz cykliczne nadtlenki (NIKI 2009). Wykazano, iż ¹O₂ jest odpowiedzialny za ponad 80% nieenzymatycznej peroksydacji lipidów w liściach (TRIANTAPHYLIDES i współaut. 2008).

DROBNOCZĄSTECZKOWE ANTYUTLENIACZE ORAZ ENZYMATYCZNE MECHANIZMY DEZAKTYWACJI ROS

System odpowiedzialny za usuwanie ROS w komórkach roślinnych jest niezwykle skomplikowany. Obejmuje on drobnocząsteczkowe związki antyutleniające i enzymy detoksykujące ROS. Każdy przedział komórkowy zawiera własną pulę antyutleniaczy i enzymów, a dla każdego z rodzajów ROS ist-

nieje po kilka sposobów jego dezaktywacji (GECHEV i współaut. 2006). Doświadczalnie wykazano także zdolność kompensacji pomiędzy różnymi mechanizmami antyutleniającymi (MITTLER 2002, MITTLER i współaut. 2004, FOYER i NOCTOR 2005a).

Tabela 3. Drobnocząsteczkowe antyutleniacze (wg KOHEN i NYSKA 2002, MUNNE-BOSCH i ALEGRE 2002, GECHEV i współaut. 2006, HALLIWELL 2006, WHITE i współaut. 2006, TRIANTAPHYLIDES i HAVVAUX 2009, MENE-SAFFRANE i DELLAPENNA 2010, NOWICKA i KRUK 2010).

| Rodzaj związku | Działanie antyutleniające | Lokalizacja |
|---|--|---|
| Karotenoidy | Wydajnie wygaszają ¹ O ₂ i zmiatają wolne rodniki | Plastydy – głównie chloroplasty i chromoplasty |
| Chromanole: tokoferole, tokotrienole oraz plastochromanol | Zmiatają wolne rodniki lipidowe, OH·, O ₂ ⁻ , Zmiatają i wygaszają ¹ O ₂ , γ-Toc może również zmiatać tlenki azotu | Plastydy, oleosomy (w nasionach) |
| Ubichinol | Zmiata wolne rodniki lipidowe oraz O ₂ ⁻ , Zmiata i wygasza ¹ O ₂ , | Mitochondria |
| Plastochinol | Zmiata wolne rodniki lipidowe oraz O ₂ ⁻ , Zmiata i wygasza ¹ O ₂ , | Plastydy |
| α-Tokoferylochinol | Zmiata wolne rodniki lipidowe oraz O ₂ ⁻ , Zmiata i wygasza ¹ O ₂ , | Plastydy |
| Askorbinian | Zmiata ¹ O ₂ , OH·, O ₂ ⁻ , rodniki nadtlenkowe i ONOOH, Regeneruje rodnik tokoferoksylowy Kofaktor enzymów detoksykujących ROS, | Chloroplasty, mitochondria, cytozol, peroksysomy, wakuole, apoplast |
| Glutation | Zmiata H ₂ O ₂ , OH·, O ₂ ⁻ i ONOOH, Detoksykuje wodoronadtlenki, rodniki nadtlenkowe i alkoksylowe | Chloroplasty, mitochondria, cytozol, peroksysomy, wakuole, apoplast |
| Witamina B ₆ | Zmiata ¹ O ₂ | Nieznana |
| Flawonoidy | Zmiatają H ₂ O ₂ , ¹ O ₂ , OH·, ONOOH | Wakuola, chloroplasty |

Drobnocząsteczkowe związki o charakterze antyutleniającym zostały przedstawione w Tabeli 3. Do związków o charakterze lipofilowym, a zatem działających w błonach, zalicza się karotenoidy, chromanole oraz chinole prenylowe, natomiast pozostałe wymienione związki są hydrofilowe.

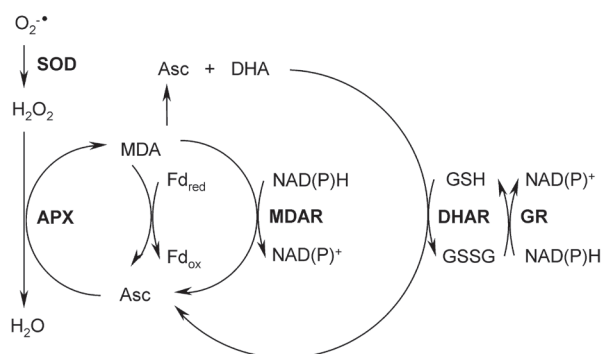
Spośród chromanoli, w liściach dominującym związkiem u większości gatunków jest α -tokoferol (α -Toc), podczas gdy inne formy, przede wszystkim γ -tokoferol (γ -Toc) oraz tokotrienole występują głównie w nasionach oleistych (MUNNE-BOSCH i ALEGRE 2002). α -Tokoferylochinon będący produktem utleniania α -tokoferolu, występuje w niewielkich ilościach i może ulegać redukcji do α -tokoferylochinolu (NOWICKA i KRUK 2010). Warto zaznaczyć, że również chinony prenylowe (np. ubichinon, plastochinon), a więc formy utlenione, mogą przejawiać

pewne własności antyutleniające (NOWICKA i KRUK 2010).

Askorbinian (Asc) jest związkiem występującym w roślinach w wysokim stężeniu (10–100 mM) (FOYER i NOCTOR 2003). W wyniku utleniania może on być przekształcany w monodehydroaskorbinian (MDA) i dehydroaskorbinian (DHA), przy czym MDA jest rodnikiem o krótkim czasie życia i może ulegać reakcji dysproporcjonowania, prowadzącej do powstania DHA i Asc. Uważa się, iż Asc nie tylko pełni funkcje antyutleniające, ale jest ważnym elementem systemów regulacji metabolizmu komórki zależnych od stanu redoks (ang. redox-regulation) (FOYER i NOCTOR 2003, FOYER i NOCTOR 2005b, NOCTOR 2006). Podobną, podwójną rolę przypisuje się także glutationowi (GSH – forma zredukowana), którego udział w transdukcji sygnału jest przedmiotem inten-

Tabela 4. Enzymy biorące udział w detoksykacji ROS (wg ASADA 2006, GECHEV i współaut. 2006, RIO i współaut. 2006, RHOADS i współaut. 2006, NOCTOR i współaut. 2007, AHMAD i współaut. 2008). W nawiasie podano liczbę genów kodujących dany typ enzymu u *A. thaliana*.

| Rodzaj enzymu | Działanie | Występowanie |
|--------------------------------|---|--|
| Dysmutazy ponadtlenkowe (8) | Dysmutacja $O_2^{\cdot-}$, w jej wyniku powstaje H_2O_2 i O_2 | Chloroplasty, mitochondria, peroksysomy, cytozol |
| Katalazy (3) | Rozkładają H_2O_2 bez udziału dodatkowego reduktora | Peroksysomy, glioksysomy, mitochondria, chloroplasty |
| Peroksydazy askorbinianowe (9) | Rozkładają H_2O_2 z wykorzystaniem Asc jako reduktora | Chloroplasty, mitochondria, peroksysomy, cytozol, apoplast |
| Reduktazy MDHA (5) | Uczestniczą w regeneracji Asc | Chloroplasty, mitochondria, peroksysomy, cytozol |
| Reduktazy DHA (5) | Uczestniczą w regeneracji Asc | Chloroplasty, mitochondria, peroksysomy, cytozol |
| Reduktazy glutationu (2) | Uczestniczą w regeneracji GSH | Chloroplasty, mitochondria, peroksysomy, cytozol |
| Peroksydazy glutationowe (8) | Detoksykują H_2O_2 i wodoronadtlenki lipidów z wykorzystaniem GSH jako reduktora | Chloroplasty, mitochondria, cytozol, retikulum endoplazmatyczne |
| Peroksyredoksyny (10) | Detoksykują H_2O_2 oraz inne nadtlenki np. wodoronadtlenki lipidów | Chloroplasty, mitochondria, cytozol, jądro |
| Peroksydazy klasy III (73) | Detoksykują H_2O_2 z wykorzystaniem rozmaitych reduktorów, choć mogą także generować ROS ($O_2^{\cdot-}$, OH \cdot), uczestniczą w różnych procesach | Mitochondria, cytozol, wakuole, ściana komórkowa |
| S-transferazy GSH (53) | Mogą m.in. detoksykować wodoronadtlenki lipidów a także uczestniczyć w regeneracji Asc | Chloroplasty, mitochondria, cytozol, jądro, apoplast |
| Tioredoksyny (46) | Donory elektronów dla peroksyredoksyn oraz DHA | Chloroplasty, mitochondria, cytozol, jądro |
| Glutaredoksyny (31) | M.in. donory elektronów dla peroksyredoksyn oraz DHA | Chloroplasty, mitochondria, cytozol, retikulum endoplazmatyczne, błona komórkowa |



Ryc. 1. Detoksykacja ROS w cyklu askorbiniano-glutationowym w chloroplastach.

Redukcja MDA przez Fd zachodzi tylko w chloroplastach, natomiast pozostałe reakcje zaznaczone na schemacie mogą przebiegać także w innych przedziałach komórkowych (zob. Tabela 3). Asc, askorbinian; APX, peroksydaza askorbinianowa; DHA, dehydroaskorbinian; DHAR, reduktaza DHA; Fd, ferredoksyna; GR, reduktaza GSH; GSH, glutation; MDA, monodehydroaskorbinian; MDAR, reduktaza monodehydroaskorbinianu; SOD, dysmutaza ponadtlenkowa (wg MITTLER 2002, ASADA 2006).

sywnych badań (FOYER i NOCTOR 2003, FOYER i NOCTOR 2005b, NOCTOR 2006).

Enzymy uczestniczące w detoksykacji ROS zostały przedstawione w Tabeli 4. Warto zauważyć, że w przypadku większości z nich w roślinach nie tylko występuje po kilka enzymów danego rodzaju, ale też liczne ich izoformy (GECHEV i współaut. 2006). Ważnym mechanizmem usuwania ROS jest cykl askorbiniano-glutationowy (Ryc. 1).

Dysmutazy ponadtlenkowe (SOD) są jedy-nymi enzymami roślinnymi, które mogą rozkładać $O_2^{\cdot-}$ (HALLIWELL 2006, ASADA 2006). Istnieje kilka rodzajów SOD, zawierających różne metale przejściowe: Cu/ZnSOD, MnSOD, oraz FeSOD (HALLIWELL 2006). Różnią się one lokalizacją: Cu/Zn SOD występują w chloroplastach i cytozolu, MnSOD w mitochondriach i peroksysomach, a FeSOD w chloroplastach (HALLIWELL 2006, AHMAD i współaut. 2008).

Kilka grup enzymów uczestniczy w detoksykacji H_2O_2 . Spośród nich katalazy nie wymagają reduktora, lecz mają stosunkowo niskie powinowactwo do H_2O_2 . Enzymy te zawierają przeważnie grupę hemową. Katalazy występują w największych ilościach w peroksysomach, w pozostałych przedziałach komórki ważniejszą rolę w usuwaniu H_2O_2 odgrywają peroksydazy (HALLIWELL 2006, BREUSEGEM i współaut. 2001).

ROLA SYGNAŁOWA ROS W ROŚLINACH

Sygnałową funkcję ROS odkryto stosunkowo niedawno. Badania wykazały udział ROS w regulacji wszystkich kluczowych dla roślin procesów: wzrostu, rozwoju, starzenia, programowanej śmierci komórki (ang. programmed cell death, PCD) czy odpowiedzi na stres, zarówno abiotyczny, jak i biotyczny (BREUSEGEM i DAT 2006, GECHEV i współaut. 2006). Specyfikę biologicznej odpowiedzi na ROS warunkuje nie tylko rodzaj ROS, intensywność sygnału, jego czas trwania oraz miejsce produkcji, ale też oddziaływanie z innymi szlakami transdukcji sygnału i cząsteczkami sygnałowymi, które w nich uczestniczą (np. NO, Ca^{2+} , związki lipidowe, fitohormony), etap rozwoju rośliny czy warunki poprzedzające wystąpienie bodźca związanego z produkcją ROS (GECHEV i współaut. 2006, KWAK i współaut. 2006). Auksyny, kwas abscysynowy (ABA) oraz kwas jasmonowy (JA), razem z ROS regulują tak różnorodne procesy jak wzrost, zamykanie aparatów szparkowych oraz odpowiedź na zranienie. Podob-

nie, ROS i JA współdziałają także z etylenem i kwasem salicylowym (SA), podczas odpowiedzi na stres i atak patogenu (GECHEV i współaut. 2006, KOTCHONI i GACHOMO 2006).

W wielu przypadkach, zwłaszcza w odpowiedzi na różnego rodzaju czynniki stresowe, do wzmożonej produkcji ROS dochodzi na skutek zaburzeń metabolizmu. Akumulację ROS obserwowano po zadziałaniu takich czynników jak: światło o wysokim natężeniu, chłód, wysoka temperatura, susza, czy metale ciężkie. Mechanizmy usuwające ROS okazują się w takim przypadku niewystarczające i równowaga zostaje zaburzona. Dochodzi wtedy do uruchomienia kaskad sygnałowych, których celem jest aktywacja mechanizmów pozwalających na przywrócenie homeostazy i odpowiadających za inicjację odpowiedzi związanej z aklimatyzacją do zmienionych warunków (GECHEV i współaut. 2006).

Nie jest to jednak mechanizm jedyny, w komórkach roślinnych może bowiem dochodzić do miejscowo specyficznej produkcji ROS

przez wyspecjalizowane enzymy. Głównym enzymem tego rodzaju jest wytwarzająca $O_2^{\cdot-}$ błonowa oksydaza NADPH, nazywana także Rboh (ang. respiratory burst NADPH oxidase homolog), wykazująca homologię z enzymami zwierzęcymi, odpowiedzialnymi za wybuch tlenowy na powierzchni komórek fagocytycznych. U *A. thaliana* odkryto 10 genów należących do rodziny Rboh, oznaczanych kolejnymi literami alfabetu AtrbohA-J. Oksydazy D i F ulegają ekspresji we wszystkich organach: A-C, E, G, I w korzeniach, natomiast H i J w łagiewce pyłkowej (SAGI i FLUHR 2006). Oksydazy NADPH są białkami błonowymi, zawierają sześć helis transmembranowych, w obrębie których związane są dwie grupy hemowe, oraz domeny cytozolowe, wiążące FAD i NADPH, a także dwa motywy dłoni EF odpowiedzialne za wiązanie Ca^{2+} . Grupy hemowe są niezbędne dla transferu elektronów poprzez błonę, gdyż redukcja tlenu następuje po stronie apoplastu (SAGI i FLUHR 2006). Produkowany przez Rboh $O_2^{\cdot-}$ pełni funkcję sygnałową. Tego rodzaju mechanizm związany jest przede wszystkim z regulacją procesów rozwojowych oraz odpowiedzią na atak patogenu (GECHEV i współaut. 2006). Niedawno okazało się jednak, że oksydaza RbohD jest konieczna do wystąpienia zależnej od ROS systemowej propagacji sygnału w warunkach stresu abiotycznego (światło o wysokim natężeniu, wysoka lub niska temperatura, zasolenie) oraz w odpowiedzi na zranienie (SUZUKI i współaut. 2012).

Najwcześniej postulowano sygnałową funkcję H_2O_2 z uwagi na względną trwałość

i zdolność przenikania przez błony. Odkryto nawet wyspecjalizowane akwaporyny, zwane peroksyporynami, które ułatwiają transport H_2O_2 (GECHEV i współaut. 2006). Później udział w systemach transdukcji sygnału zaobserwowano także dla $O_2^{\cdot-}$ i 1O_2 (GECHEV i współaut. 2006, ŚLESIAK i współaut. 2007). Porównawcze analizy ekspresji genów, z wykorzystaniem mikromacierzy, u roślin akumulujących różne rodzaje ROS w różnych przedziałach komórkowych, ujawniły istnienie specyficznych odpowiedzi na $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 i H_2O_2 , wyrażających się różnicami „wzorów” zmian ekspresji genów (GADJEV i współaut. 2006). Do genów, w których regulacji uczestniczą ROS, należą geny kodujące enzymy zaangażowane w detoksykację ROS, np. peroksydaza askorbinianowa (APX) czy peroksydaza glutationowa, białka związane z odpowiedzią na stres (np. dehydryny, białka szoku cieplnego), białka uczestniczące w odpowiedzi na patogen, białka związane z transdukcją sygnału oraz enzymy przeprowadzające biosyntezę różnych metabolitów wtórnych (VRANOVA i współaut. 2002, KOTCHONI i GACHOMO 2006, MILLER i współaut. 2008).

ROS uczestniczą także w szlakach transdukcji sygnału związanych z detekcją wewnątrzkomórkowego stanu redoks. Mogą one bezpośrednio utleniać białka lub też modulować stan redoks puli GSH, Asc, tioredoksyny czy plastochinonu (NOCTOR 2006, VRANOVA i współaut. 2002).

UDZIAŁ ROS W ODPOWIEDZI NA CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE

Udział ROS w reakcji na czynniki stresowe jest bardzo ważny, co zostało do tej pory szeroko udokumentowane. Wykazano go w przypadku aklimatyzacji roślin w warunkach stresu termicznego, świetlnego czy osmotycznego, przy czym odpowiedź rośliny okazywała się systemowa, a więc nie ograniczona tylko do miejsca produkcji ROS (BHATTACHARJEE 2005, GECHEV i współaut. 2006). Uważa się, że nieznaczne zwiększenie stężenia ROS indukuje mechanizmy obronne, większa ilość ROS prowadzi do PCD, natomiast bardzo wysokie ich stężenie powoduje śmierć na drodze nekrozy w wyniku uszkodzenia komórek (BREUSEGEM i DAT 2006, GECHEV i współaut. 2006).

Już wiele lat temu wykazano udział H_2O_2 w regulacji odpowiedzi roślin na stres świetl-

ny (KARPINSKI i współaut 1999). Preinkubacja liści *A. thaliana* w obecności H_2O_2 sprawiała, że były one bardziej odporne na światło o wysokim natężeniu. Ponadto, u *A. thaliana* w reakcji na światło o wysokim natężeniu obserwowano wzrost poziomu ekspresji genu kodującego peroksydazę APX2, przy czym odpowiedź ta występowała systemowo, a nie tylko w naświetlanych liściach. Wykazano, iż cząsteczką sygnałową jest w tym przypadku właśnie H_2O_2 (KARPINSKI i współaut 1999). W warunkach stresu świetlnego u *A. thaliana* obserwowano wzmożoną produkcję H_2O_2 w komórkach pochwy okołowiązkowej, co ma związek z systemowym przekazem sygnału (MULLINEAUX i współaut. 2006). Uważa się, że H_2O_2 jest niezbędny dla powstawania

tw. nabytej aklimatyzacji systemowej (ang. systemic acquired acclimation, SAA) (ŚLESIAK i współaut. 2007). Preinkubacja siewek kukurydzy w obecności H_2O_2 sprawiała, że były one bardziej odporne na stres chłodu. Inne eksperymenty z wstępnym traktowaniem roślin należących do różnych gatunków, H_2O_2 wykazały podobny efekt również dla stresu solnego czy wysokiej temperatury. Zaobserwowano gromadzenie się H_2O_2 w roślinach po zadziałaniu wysoką lub niską temperaturą, herbicydem parakwatem, podaniu ABA lub SA (GECHEV i współaut. 2006).

Okazuje się, że również 1O_2 może indukować mechanizmy ochronne. Dodanie do kultury *Chlamydomonas reinhardtii* niewielkich ilości fotouczulacza (rózu bengalskiego), a następnie ekspozycja na światło, doprowadziły do uodpornienia się komórek

glonu na uprzednio letalne dawki 1O_2 . Aklimatyzacji towarzyszył wzrost ekspresji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za detoksykację ROS: peroksydazy glutationowej i S-transferazy glutationu. Konstytutywna nadekspresja tych genów powoduje wzmoczoną odporność na 1O_2 (TRIANTAPHYLIDES i HAVAUX 2009).

Innym znanym przykładem funkcji sygnałowej pełnionej przez ROS jest udział H_2O_2 w regulacji ruchów aparatów szparkowych. W procesie tym uczestniczą także fitohormony (głównie ABA, ale też JA), NO oraz Ca^{2+} . Wykazano, że ABA indukuje wzrost stężenia H_2O_2 w komórkach szparkowych, natomiast na dalszych etapach następuje aktywacja błonowych kanałów wapniowych (BHATTACHARJEE 2005, PITZSCHKE i HIRT 2006).

UDZIAŁ ROS W REGULACJI ROZWOJU ROŚLIN

W ostatnich latach odkryto bardzo wiele procesów rozwojowych, w regulacji których uczestniczą ROS. Współdziałanie ROS i Ca^{2+} obserwowano podczas regulacji wzrostu włósników korzeni, gdzie zlokalizowana produkcja $O_2^{\cdot-}$ przez oksydazę NADPH korelowała ze zmianami stężenia Ca^{2+} (PITZSCHKE i HIRT 2006, SAGI i FLUHR 2006). Mutant *A. thaliana atrbohC* wykazywał zaburzenia w aktywacji kanałów wapniowych, odpowiedzialnych za tworzenie gradientu Ca^{2+} niezbędnego do wzrostu włósników (GECHEV i współaut. 2006). Korzenie tego mutantu były również o ok. 20% krótsze od korzeni roślin typu dzikiego, co wskazuje na udział oksydazy NADPH i ROS w regulacji wzrostu elongacyjnego korzeni (GAPPER i DOLAN 2006). W doświadczeniach na kukurydzy wykazano, iż ROS zaangażowane są także w regulację grawitropizmu korzeni oraz wzrostu blaszki liściowej (GECHEV i współaut. 2006). W tym drugim przypadku obserwowano akumulację ROS w strefie wzrostu elongacyjnego komórek (GAPPER i DOLAN 2006). Rośliny, w których gen oksydazy NADPH podlegał wyciszeniu, wykazywały ograniczony wzrost wierzchołkowy prowadzący do rozgałęziania się, a także zmiany morfologii liści (inny kształt, zwijanie się blaszek) (SZYMAŃSKA i STRZAŁKA 2010).

ROS mogą regulować także wzrost elongacyjny pędu i rozwój bulw ziemniaka, a także tworzenie brodawek u roślin motylkowych (RODRIGUEZ i współaut. 2002, GAPPER

i DOLAN 2006, KWAK i współaut. 2006, KIM i współaut. 2007). Zlokalizowana produkcja ROS ma miejsce podczas wzrostu łagiewki pyłkowej. Oksydazy NADPH pełnią również funkcję regulacyjną w procesie różnicowania naczyń (BREUSEGEM i współaut. 2008, GAPPER i DOLAN 2006). Postulowano, iż ROS odgrywają ważną rolę w fizjologii nasion, m.in. uczestnicząc w kaskadach sygnałowych odpowiadających za przełamywanie spoczynku (KRASUSKA i współaut. 2011). Podwójny mutant *atrrbohD atrbohF* cechował się obniżoną zdolnością kiełkowania nasion (KWAK i współaut. 2003).

Podczas określonych procesów rozwojowych może dochodzić do PCD. Jest to proces ściśle regulowany, w czasie którego dochodzi do specyficznej ekspresji niektórych genów. Przebiega on w sposób zbliżony do apoptozy w komórkach zwierzęcych; podczas PCD dochodzi do zwiększania przepuszczalności błony, kondensacji chromatyny i fragmentacji DNA (VRANOVA i współaut. 2002). Do związanych z ROS procesów, w których dochodzi do PCD należą: starzenie się organów, śmierć komórek warstwy aleuronowej ziarniaków zbóż, powstawanie miększu przewietrzającego w odpowiedzi na hipoksję, a nawet oddziaływania allelopatyczne (BREUSEGEM i DAT 2006, KWAK i współaut. 2006, BREUSEGEM i współaut. 2008). ROS odgrywają istotną rolę zarówno w indukcji, regulacji, jak i realizacji PCD (BREUSEGEM i DAT 2006). Przypuszcza się, że ROS wraz

z etylenem regulują starzenie organów poprzez sygnały pochodzące z chloroplastów oraz peroksyosomów. Za śmierć komórek warstwy aleuronowej odpowiada z kolei H_2O_2 , powstający w dużych ilościach w glioksyosomach podczas zużywania rezerw lipidów przez nasiona (GECHEV i współaut. 2006). Jeżeli zaś chodzi o oddziaływania allelopatyczne, niedawno odkryto, że wytwarzane przez korzenie *Centaurea maculosa* fitotoksyczne katechiny powodują akumulację ROS w me-

systemach korzeni roślin sąsiednich, prowadzącą do zależnej od Ca^{2+} śmierci komórek (BAIS i współaut. 2003).

Przy okazji omawiania rozwoju roślin warto wspomnieć, że ROS pełnią też funkcję efektorową. Podczas różnicowania się komórek H_2O_2 uczestniczy w usztywnianiu ściany komórkowej, zwiększając usieciowanie tworzących ją polimerów (GAPPER i DOLAN 2006).

UDZIAŁ ROS W ODPOWIEDZI NA ATAK PATOGENU I ZRANIENIE

Bardzo ważną rolą ROS jest udział w odpowiedzi na atak patogenu. Produkcja ROS jest pierwszą obserwowaną odpowiedzią na rozpoznanie patogenu. Obserwuje się dwufazowy wzrost stężenia ROS. Pierwszy, niewielki i przejściowy obserwowany jest po kilku minutach od zakażenia, natomiast drugi pojawia się po kilku godzinach, jest znacznie większy i trwa dłużej (GARA i współaut. 2003). Głównym źródłem ROS podczas odpowiedzi na patogen jest błonowa oksydaza NADPH. Postulowano także udział innych enzymów, np. peroksydaz i oksydaz występujących w ścianie komórkowej. Elementem odpowiedzi na patogen jest także obniżenie ekspresji enzymów detoksykujących ROS w komórkach, np. APX czy katalazy (GARA i współaut. 2003, TORRES i współaut. 2006). Podczas odpowiedzi na atak patogenu ROS mogą działać zarówno bezpośrednio, uszkadzając komórki patogenu oraz inicjując powstawanie wiązań pomiędzy glikoproteinami ściany komórkowej czy prekursorami lignin, co powoduje wzmacnianie ściany, jak i pośrednio, uczestnicząc w szlakach sygnałowych, np. prowadzących do indukcji ekspresji genów białek PR (ang. pathogen related) (BREUSEGEM i współaut. 2001, KOTCHONI i GACHOMO 2006). Transgeniczne rośliny bądź mutanty, w których zawartość H_2O_2 była podwyższona w porównaniu z typem dzikim, zwykle z powodu obniżonej aktywności katalazy, były bardziej odporne na ataki patogenów, wykazywały też ekspresję białek PR i podwyższoną zawartość SA (VRANOVA i współaut. 2002). Chociaż za główną cząsteczkę sygnałową podczas odpowiedzi na atak patogenu uważa się H_2O_2 , potwierdzono także udział $O_2^{\cdot-}$ w tym procesie, m.in. wykazano, że to właśnie $O_2^{\cdot-}$, a nie H_2O_2 jest odpowiedzialny za indukcję syntezy fitoaleksyn w komórkach soi w odpowiedzi na patogen

lub dodatek elicytora (VRANOVA i współaut. 2002).

Ważnym elementem reakcji rośliny na patogen jest tzw. odpowiedź nadwrażliwa (ang. hypersensitive response, HR), w której dochodzi do PCD komórek w miejscu infekcji, co ma zapobiec rozprzestrzenianiu się patogenu (CHOJNACKA i SOBIESZCZUK-NOWICKA 2009). Wykazano udział $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , NO oraz SA w regulacji HR (GARA i współaut. 2003, TORRES i współaut. 2006, ZANINOTTO i współaut. 2006). Podanie egzogennej H_2O_2 indukowało występowanie HR w zawiesinach komórek *A. thaliana*. Z kolei, u roślin transgenicznych z obniżoną aktywnością enzymów usuwających H_2O_2 lub nadekspresją enzymów produkujących tę ROS obserwowano spontaniczną lub wywoływaną bardzo niewielkim stresem śmierć komórek (VRANOVA i współaut. 2002).

Wykazano, że ROS oraz SA są także potrzebne do powstawania nabytej odporności systemowej (ang. systemic acquired resistance, SAR) i uczestniczą w odpowiedzi na zranienie (BREUSEGEM i współaut. 2001, KOTCHONI i GACHOMO 2006, ŚLESIAK i ŚLESIAK 2011). Po uszkodzeniu tkanki obserwuje się wzmożoną produkcję ROS ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) i powstawanie odpowiedzi systemowej. Do cząsteczek sygnałowych związanych z odpowiedzią na zranienie należą peptydy sygnałowe, takie jak systemina czy niedawno odkryty peptyd At-Pep1 (pełniący również ważną rolę w odpowiedzi na atak patogenu), JA oraz kwas oligogalakuronowy, uwalniany z uszkodzonej ściany komórkowej. Mogą one indukować wzrost stężenia H_2O_2 w tkankach i ekspresję genów związanych z odpowiedzią obronną, w tym inhibitorów proteinaz oraz oksydaz polifenoli (VRANOVA i współaut. 2002, GECHHEV i współaut. 2006, HUFFAKER i współaut. 2006, ŚLESIAK i ŚLESIAK 2011).

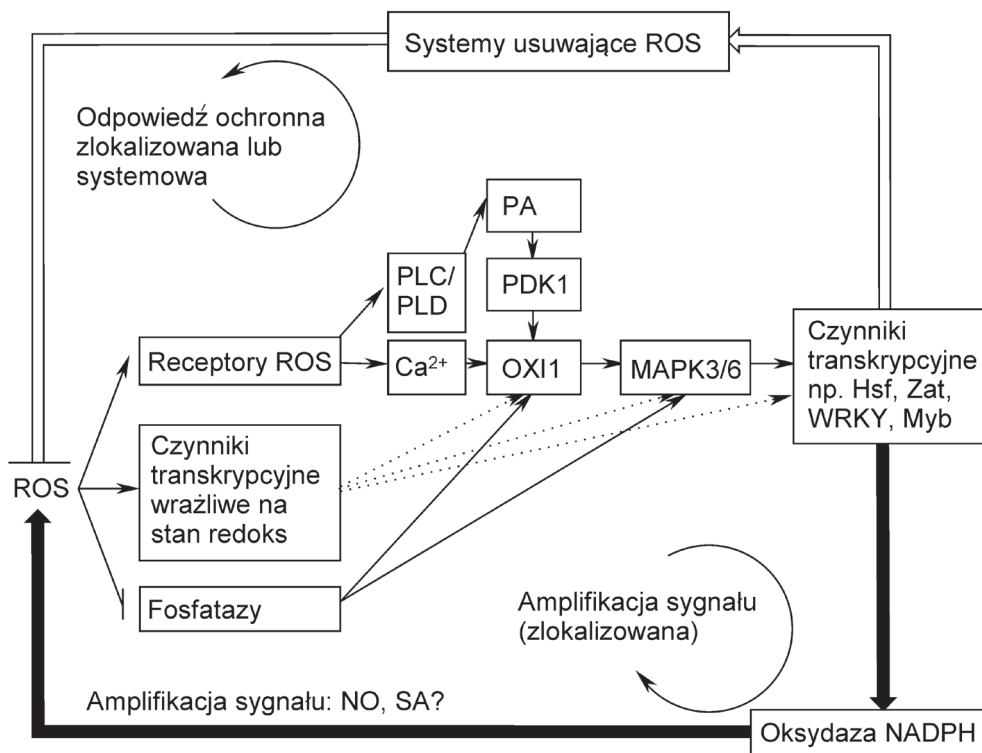
SYSTEMY TRANSDUKCJI SYGNAŁU – POZIOM MOLEKULARNY

Dokładny molekularny mechanizm działania ROS jak na razie nie został poznany (VRANOVA i współaut. 2002, AHMAD i współaut 2008). Dotychczas nie zidentyfikowano białkowego receptora związanego z odpowiedzią na ROS (MITTLER i współaut. 2004). Wiele argumentów przemawia za wpływem ROS poprzez systemy oparte na białkach zawierających grupy tiolowe, mogące ulegać odwracalnemu utlenianiu (VRANOVA i współaut. 2002). Na Ryc. 2 przedstawiono proponowany schemat szlaków transdukcji sygnału ROS.

Potwierdzono udział systemu kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (MAPK) w transdukcji sygnału związanego z ROS. Liczne kinazy uczestniczą w szlakach sygnałowych zależnych od H_2O_2 . U *A. thaliana* w odpowiedzi tej uczestniczą kinazy ANP1, MEKK1, AtMPK3, AtMPK4, AtMPK6, OXI1 (ang. oxidative stress inducible) i PTI-2. Innymi istotnymi kinazami związanymi z odpowiedzią na H_2O_2 są AtNDPK2 oraz AtNDK1 (GECHEV i współaut. 2006, PITSCHKE i HIRT 2006, BREUSEGEM i współaut. 2008). Trans-

geniczne rośliny *A. thaliana* z nadekspresją ANP1 wykazywały zwiększoną odporność na wysoką temperaturę, mróz i stres solny. Z kolei, mutant pozbawiony OXI1 wykazywał wzmogoną podatność na infekcje. Nadekspresja AtNDPK2 prowadziła do obniżania stężenia H_2O_2 i zwiększenia odporności na chłód i zasolenie, natomiast nadekspresja AtNDK1 zwiększała odporność na parakwat (GECHEV i współaut. 2006). U lucerny (*Medicago sativa*) odkryto kinazę MAPKKK OMTK1, uczestniczącą w inicjacji PCD w odpowiedzi na H_2O_2 (PITSCHKE i HIRT 2006). Z kolei, u *Chorispóra bungeana* odkryto kinazę CbMAPK3, której ekspresja wzrastała w odpowiedzi na chłód i zasolenie (AHMAD i współaut. 2008).

Ponadto, ROS wpływają także na aktywność niektórych fosfataz związanych z transdukcją sygnału, np. fosfatę tyrozynową AtPTP1, fosfatę AtMKP2 dezaktywującą kinazy AtMPK3 i 6, czy fosfatazy ABI1 i ABI2, będące elementami szlaku transdukcji sygnału indukowanego przez ABA (PITSCHKE i HIRT 2006, BREUSEGEM i współaut. 2008, KRASUSKA i współaut. 2011). Wykazano również udział trimerycznego biał-



Ryc. 2. Uproszczony model szlaków sygnałowych uruchamianych przez ROS.

Ca^{2+} , jony wapnia; MAPK3/6, kinazy MAPK 3 i MAPK 6; NO, tlenek azotu; PA, kwas fosfatydowy; PDK1, kinaza, której aktywacja jest zależna od kwasu fosfatydowego, OXI 1, kinaza OXI1, PLC fosfolipaza C; PLD, fosfolipaza D; SA, kwas salicylowy (wg MITTLER i współaut. 2004).

ka G, kanału wapniowego HACc oraz kalmoduliny w szlakach sygnałowych związanych z ROS (MITTLER i współaut. 2004, GAPPER i DOLAN 2006, BREUSEGEM i współaut. 2008). W szlaku przekazywania sygnałów z chloroplastów do jądra komórkowego uczestniczą natomiast chloroplastowe białko GUN1 i jądrowe ABI4 (SUZUKI i współaut. 2012).

Doświadczenia nad mutantem *flu*, gromadzącym wolny protochlorofilid, u którego dochodzi do produkcji znacznych ilości 1O_2 , wykazały obecność systemu transdukcji sygnału specyficznego względem tej formy ROS. Postulowano udział białek EXECUTER1 i EXECUTER2, które uczestniczą w kaskadzie sygnałowej prowadzącej do śmierci komórek indukowanej przez 1O_2 (TRIANAPHYLIDES i HAVAUX 2009). Nadekspresja związanej z błoną tylakoidów peroksydazy APX u mutantu *flu* prowadziła do nasilenia odpowiedzi na 1O_2 , co wskazuje na interakcję pomiędzy szlakami sygnałowymi związanymi z 1O_2 i H_2O_2 (GECHEV i współaut. 2006).

Zidentyfikowano także czynniki transkrypcyjne związane z odpowiedzią na ROS. U *A. thaliana* czynniki LSD1 oraz LOL1, zawierające palce cynkowe, stanowią, odpowiednio, negatywny i pozytywny regulator śmierci komórek w odpowiedzi na $O_2^{\cdot-}$ (GECHEV i współaut. 2006). Niektóre czynniki z rodzin ERF i Myb związane są specyficznie

z odpowiedzią na 1O_2 (GECHEV i współaut. 2006). Natomiast czynniki transkrypcyjne z rodzin WRKY oraz Zat stanowią element odpowiedzi na $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 i H_2O_2 (MILLER i współaut. 2008). W odpowiedzi na ROS biorą też udział czynniki transkrypcyjne szoku cieplnego (Hsfs). Uważa się, że związane są one ze specyficzną odpowiedzią na H_2O_2 (GECHEV i współaut. 2006, MILLER i współaut. 2008).

ROS mogą inicjować powstawanie oksylipin, będących produktami utleniania lipidów, które pełnią też funkcję sygnałową (GECHEV i współaut. 2006). Ważnymi grupami oksylipin są fitoprostany, związki zbliżone w budowie do prostaglandyn czy JA. Są one konstytutywnie produkowane w zdrowych komórkach, jednak ich ilość znacząco wzrasta w warunkach stresowych. Wiadomo, iż fitoprostan B1 uczestniczy w odpowiedziach związanych z aktywacją mechanizmów obronnych oraz detoksykujących (GECHEV i współaut. 2006). Ponadto, oksylipiny uczestniczą w inicjacji PCD (BREUSEGEM i DAT 2006). U roślin odkryto także szlaki sygnałowe związane ze sfingolipidami i fosfolipidami. Zaburzenia metabolizmu sfingolipidów prowadzą do akumulacji H_2O_2 i śmierci komórek (GECHEV i współaut. 2006). Z kolei, fosfolipaza D stymulowana oleinianem oraz kwas fosfatydowy mogą hamować śmierć komórek u *A. thaliana* indukowaną za pomocą H_2O_2 (GECHEV i współaut. 2006).

WNIOSKI

Rola ROS w transdukcji sygnałów jest bardzo istotna, lecz wciąż w niewielkim stopniu poznana. W roślinach występuje skomplikowana sieć informacyjna związana z przetwarzaniem i integracją sygnałów pochodzących od ROS. Uczestniczy ona zarówno w procesach rozwojowych, jak i w regulacji odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne. Z tego względu zachowanie stanu równo-

wagi pomiędzy produkcją i zmiataniem ROS jest niezwykle ważne. Rośliny posiadają również bardzo skomplikowany, a przy tym elastyczny system generowania i usuwania ROS. Obecnie poznano już wiele genów, których produkty uczestniczą w odpowiedzi na ROS, czy elementy kaskad sygnałowych, jednak jesteśmy jeszcze daleko od dokładnego poznania kompletnej sieci sygnałowej.

REAKTYWNE FORMY TLENU W ROŚLINACH - WIĘCEJ NIŻ TRUCIZNA

Streszczenie

Reaktywne formy tlenu (ROS) odgrywają istotną rolę w roślinach, nie tylko jako toksyczne produkty uboczne, powstające podczas metabolizmu tlenowego, ale też związki uczestniczące w regulacji rozwoju i odpowiedzi na stres. W niniejszej pracy przeglądowej przedstawiono rodzaje ROS, powodowane przez nie uszkodzenia, miejsca ich powstawania i detoksykacji w komórce roślinnej. Sygnałowa funkcja ROS w ostatnich latach stała się przedmiotem intensywnych

badania. Wykazano, iż ROS uczestniczą w regulacji odpowiedzi na rozmaite rodzaje stresu abiotycznego, m.in. światło o wysokim natężeniu, wysoką lub niską temperaturę, czy zasolenie. Ponadto, są one ważnym elementem odpowiedzi na atak patogenu, pełniąc zarówno funkcję sygnałową, jak i efektorową. Wiadomo, że ROS odgrywają rolę w regulacji rozwoju roślin, w tym wzrostu korzeni, blaszki liściowej, czy łagiewki pyłkowej. Molekularny mechanizm działania

ROS wciąż jest słabo poznany. Do tej pory poznano niektóre elementy kaskad sygnałowych, w tym regulowane przez ROS kinazy, fosfatazy oraz szereg czyn-

ników transkrypcyjnych. W niniejszej pracy omówiono wyżej wymienione zagadnienia w oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe.

REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PLANTS – FAR MORE THAN JUST A POISON

Summary

Reactive oxygen species (ROS) play a number of important roles in plants, not only as a toxic byproducts of oxygen metabolism, but also as regulators of development and stress responses. In the present review, types of ROS, their chemical reactivity, sites of their generation and detoxification in plant cells are described. Recently, signaling function of ROS has been intensively examined. It was shown, that ROS participate in the regulation of responses to various types of abiotic stress, like high light, high or low temperature or salt stress. Moreover, ROS

are important in response to pathogen attack, acting as signaling molecules, but also as toxic agents to pathogens. It is also known, that ROS participate in the regulation of development processes, such as growth of roots, leaves and pollen tubes. Molecular mechanism of ROS action is still poorly known. Up to date, some elements of signaling cascades were identified, like kinases, phosphatases and transcription factors. In this paper, signaling functions of ROS been described in the light of recent literature data.

LITERATURA

- AHMAD P., SARWAT M., SHARMA S., 2008. *Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants*. J Plant Biol. 51, 167-173.
- ASADA K., 2006. *Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions*. Plant Physiol. 141, 391-396.
- BAIS H. P., VEPACHEDU R., GILROY S., CALLAWAY R. M., VIVANCO J. M., 2003. *Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions*. Science 301, 1377-1380.
- BARTOSZ G., 2008. *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. PWN, Warszawa.
- BENTINGER M., BRISMAR K., DALLNER G., 2007. *The antioxidant role of coenzyme Q*. Mitochondrion 7, 41-50.
- BHATTACHARJEE S., 2005. *Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants*. Curr. Sci. 89, 1113-1121.
- BREUSEGEM VAN F., DAT J.F., 2006. *Reactive oxygen species in plant cell death*. Plant Physiol. 141, 384-390.
- BREUSEGEM VAN F., VRANOVA E., DAT J.F., INZE D., 2001. *The role of active oxygen species in plant signal transduction*. Plant Sci. 161, 405-414.
- BREUSEGEM VAN F., BAILEY-SERRES J., MITTLER R., 2008. *Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants*. Plant Physiol. 147, 978-984.
- CADENAS E., DAVIES K. J. A., 2000. *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging*. Free Radic. Biol. Med. 29, 222-230.
- CADET J., RAVANAT J.-L., MARTINEZ G. R., MEDEIROS M. H. G., DI MASCIO P., 2006. *Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: Product formation and mechanistic insights*. Photochem. Photobiol. 82, 1219-1225.
- CHOJNACKA A., SOBIESZCZUK-NOWICKA E., 2009. *Poliaminy w programowanej śmierci komórki*. Post. Biol. Kom. 36, 161-169.
- CORPAS F. J., BARROSO J. B., DEL RÍO L. A., 2001. *Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells*. Trends Plant Sci. 6, 145-150.
- DAVIES M. J., 2003. *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 305, 761-770.
- EDREVA A., 2005. *Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach*. Agric. Ecosyst. Environ. 106, 119-133.
- FOYER C. H., NOCTOR G., 2003. *Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria*. Physiol. Plant. 119, 355-364.
- FOYER C. H., NOCTOR G., 2005a. *Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses*. Plant Cell 17, 1866-1875.
- FOYER C. H., NOCTOR G., 2005b. *Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context*. Plant Cell Environ. 28, 1056-1071.
- GADJEV I., VANDERAUWERA S., GECHEV T., LALOI C., MINKOV I., SHULAEV V., APEL K., INZE D., MITTLER R., VAN BREUSEGEM F., 2006. *Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis*. Plant Physiol. 141, 436-445.
- GAPPER C., DOLAN L., 2006. *Control of plant development by reactive oxygen species*. Plant Physiol. 141, 341-345.
- GARA DE L., DE PINTO M. C., TOMMASI F., 2003. *The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction*. Plant Physiol. Biochem. 41, 863-870.
- GECHEV T. S., VAN BREUSEGEM F., STONE J. M., DENEV I., LALOI C., 2006. *Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death*. BioEssays 28, 1091-1101.
- HALLIWELL B., 2006. *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. Plant Physiol. 141, 312-322.
- HUFFAKER A., PEARCE G., RYAN C. A., 2006. *An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 10098-10103.
- JAMES A. M., SMITH R. A. J., MURPHY M. P., 2004. *Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial coenzyme Q*. Arch. Biochem. Biophys. 423, 47-56.
- KIM M.-S., KIM H.-S., KIM Y.-S., BAEK K.-H., OH H.-W., HAHN K.-W., BAE R.-N., LEE I.-J., JOUNG H., JEON

- J.-H., 2007. *Superoxide anion regulates plant growth and tuber development of potato*. Plant Cell Rep. 26, 1717-1725.
- KARPINSKI S., REYNOLDS H., KARPINSKA B., WINGSLE G., CREISSEN G., MULLINEAUX P., 1999. *Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis*. Science 284, 654-657.
- KOHN R., NYSKA A., 2002. *Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicol. Pathol. 30, 620-650.
- KOTCHONI S. O., GACHOMO E. W., 2006. *The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants*. J. Biosci. 31, 389-404.
- KRASUSKA U., GNIAZDOWSKA A., BOGATEK R., 2011. *Rola ROS w fizjologii nasion*. Kosmos 290-291, 113-128.
- KRIEGER-LISZKAY A., 2004. *Singlet oxygen production in photosynthesis*. J. Exp. Botany, 56, 337-346.
- KRIEGER-LISZKAY A., FUFUZAN C., TREBST A., 2008. *Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism*. Photosynth. Res. 98, 551-564.
- KWAK J. M., MORI I. C., PEI Z. M., LEONHARDT N., TORRES M. A., DANGL J. L., BLOOM R. E., BODDE S., JONES J. D. G., SCHROEDER J. I., 2003. *NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis*. EMBO J 22, 2623-2633.
- KWAK J. M., NGUYEN V., SCHROEDER J. I., 2006. *The role of reactive oxygen species in hormonal responses*. Plant Physiol. 141, 323-329.
- LENAZ G., FATO R., FORMIGGINI G., GENOVA M. L., 2007. *The role of coenzyme Q in mitochondrial electron transport*. Mitochondrion 7, 8-33.
- MENE-SAFFRANE L., DELLA PENNA D., 2010. *Biosynthesis, regulation and functions of tocopherols in plants*. Plant Physiol. Biochem. 48, 301-309.
- MILLER G., SHULAEV V., MITTLER R., 2008. *Reactive oxygen signaling and abiotic stress*. Physiol. Plant. 133, 481-489.
- MITTLER R., 2002. *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. Trends Plant Sci. 7, 405-410.
- MITTLER R., VANDERAUWERA S., GOLLERY M., VAN BREUSEGEM F., 2004. *Reactive oxygen gene network of plants*. Trends Plant Sci. 9, 490-498.
- MULLINEAUX P. M., KARPINSKI S., BAKER N. R., 2006. *Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants*. Plant Physiol. 141, 346-350.
- MUNNE-BOSCH S., ALEGRE L., 2002. *The function of tocopherols and tocotrienols in plants*. Crit. Rev. Plant Sci. 21, 31-57.
- NAVROT N., ROUHIER N., GELHAYE E., JACQUOT J.-P., 2007. *Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria*. Physiol. Plantar. 129, 185-195.
- NIKI E., 2009. *Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects*. Free Radic. Biol. Med. 47, 469-484.
- NOCTOR G., 2006. *Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples*. Plant Cell Environ. 29, 409-425.
- NOCTOR G., DE PAEPE R., FOYER C. H., 2007. *Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants*. Trends Plant Sci. 12, 125-134.
- NOWICKA B., KRUK J., 2010. *Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones*. Biochim. Biophys. Acta 1797, 1587-1605.
- PITZSCHKE A., HIRT H., 2006. *Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants*. Plant Physiol. 141, 351-356.
- RHOADS D. M., UMBACH A. L., SUBBAIAH C. C., SIEDOW J. N., 2006. *Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and inter-organellar signaling*. Plant Physiol. 141, 357-366.
- RIO DEL L. A., SANDALIO L. M., CORPAS F. J., PALMA J. M., BARROSO J. B., 2006. *Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling*. Plant Physiol. 141, 330-335.
- RODRIGUEZ A. A., GRUNBERG K. A., TALEISNIK E. L., 2002. *Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension*. Plant Physiol. 129, 1627-1632.
- SAGI M., FLUHR R., 2006. *Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases*. Plant Physiol. 141, 336-340.
- SANG M., MA F., XIE J., CHEN X.-B., WANG K.-B., QIN X.-C., WANG W.-D., ZHAO J.-Q., LI L.-B., ZHANG J.-P., KUANG T.-Y., 2010. *High-light induced singlet oxygen formation in cytochrome b_f complex from Bryopsis corticulans as detected by EPR spectroscopy*. Biophys. Chem. 146, 7-12.
- SUZUKI N., KOUSSEVITZKY S., MITTLER R., MILLER G., 2012. *ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress*. Plant Cell Environ. 35, 259-270.
- SZYMAŃSKA R., STRZAŁKA K., 2010. *Reaktywne formy tlenu w roślinach – powstawanie, dezaktywacja i rola w przekazywaniu sygnału*. Post. Biochem. 56, 182-190.
- ŚLESIAK H., ŚLESIAK I., 2011. *Odpowiedź roślin na zranienie*. Kosmos 3-4, 445-457.
- TORRES M. A., JONES J. D. G., DANGL J. L., 2006. *Reactive oxygen species signaling in response to pathogens*. Plant Physiol. 141, 373-378.
- ŚLESIAK I., LIBIK M., KARPINSKA B., KARPINSKI S., MISZAŁSKI Z., 2007. *The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses*. Acta Biochim. Pol. 54, 39-50.
- TRIANTAPHYLIDES C., HAVAUX M., 2009. *Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling*. Trends Plant Sci. 14, 219-228.
- TRIANTAPHYLIDES C., KRISCHKE M., HOEBERICHTS F. A., KSAS B., GRESSER G., HAVAUX M., VAN BREUSEGEM F., MUELLER M. J., 2008. *Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants*. Plant Physiol. 148, 960-968.
- VRANOVA E., INZE D., VAN BREUSEGEM F., 2002. *Signal transduction during oxidative stress*. J. Exp. Bot. 53, 1227-1236.
- WHITE D. A., FISK I. D., GRAY D. A., 2006. *Characterisation of oat (Avena sativa L.) oil bodies and intrinsically associated E-vitamins*. J. Cer. Sci. 43, 244-249.
- YESBERGENOVA Z., YANG G., ORON E., SOFFER D., FLUHR R., SAGI M., 2005. *The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid*. Plant J 42, 862-876.
- ZANINOTTO F., LA CAMERA S., POLVERARI A., DELLEDONNE M., 2006. *Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response*. Plant Physiol. 141, 379-383.