

ОГЛЯДИ

УДК 581.138.1

НАДФН-ОКСИДАЗА РАСТЕНИЙ

© 2009 г. А. К. Глянько, А. А. Ищенко,
Н. Б. Митанова, Г. Г. Васильева

Сибирский институт физиологии и биохимии растений

Сибирского отделения Российской академии наук

(Иркутск, Россия)

На основе знаний о НАДФН-оксидазе (Nox) животных клеток обобщены сведения о структурных и функциональных особенностях НАДФН-оксидазы (Rboh) растений. Подчеркивается, что в растениях найдены гомологи фермента, идентичные субъединице gp91^{phox} ферментного комплекса животных клеток. Активация Rboh зависит от притока ионов Ca²⁺ в цитоплазму и фосфорилирования N-концевой области фермента при участии Ca²⁺-зависимой протеинкиназы. Обсуждается возможность участия в активации Rboh цитозольного компонента Rop ГТФ-азы. Констатируется локализация Rboh на плазматической мембране клеток растений. Усиление активности Rboh происходит под влиянием как биотических, так и абиотических факторов, что связывается с потоками Ca²⁺, активных форм кислорода и передачей информации в ядерный геном.

Ключевые слова: НАДФН-оксидаза животных (Nox), НАДФН-оксидаза растений (Rboh), субъединица gp91^{phox}, ионы Ca²⁺, кальций-зависимая протеинкиназа, цитозольный компонент Rop, ГТФ-аза, структура и активность Rboh, биотические и абиотические факторы, активные формы кислорода (АФК), активные формы азота (АФА)

Оксидазы – ферменты, катализирующие одноэлектронное восстановление кислорода с образованием активных форм кислорода (АФК). К ним относят НАДФН-оксидазу, оксалоаксидазу, связанную с клеточной стенкой пероксидазу, флавиносодержащие оксидазы (Neill et al., 2002). Многообразие действия АФК (O₂⁻, H₂O₂) и других производных кислорода на метаболизм организмов обуславливает интенсивное их изучение.

В последние десятилетия внимание исследователей привлекают также активные формы азота (АФА), биологическое действие которых тесно связано с АФК (Besson-Bard et al., 2008). Считают, что основным генератором АФК в животных и растительных клетках является НАДФН-оксидазная ферментная система, вовлеченная в защитные реакции растений и животных, рост и развитие организмов, био-

синтез гормонов, клеточную сигнальную трансдукцию и другие процессы (Babior et al., 2002; Lamb, Dixon, 1997; Sagi, Fluhr, 2006). В настоящем обзоре кратко суммированы сведения, касающиеся структурных, функциональных особенностей НАДФН-оксидазы животных и на основе этих знаний обобщены данные о растительной НАДФН-оксидазе.

НАДФН-оксидаза животных

Явление резкого поглощения кислорода фагоцитарными клетками с образованием O₂⁻ послужило основанием для интенсивного изучения источников генерации АФК и их роли в обменных процессах организмов (Babior et al., 1973; Baldrige, Gerard, 1982). Само явление получило название окислительного или дыхательного взрыва (oxidative or respiratory burst). В этом процессе около 90% поглощенного фагоцитарными клетками кислорода во время дыхательного взрыва расходуется на образование O₂⁻, а затем и других активированных АФК и АФА: пероксида водорода (H₂O₂), гидроксильного радикала (·OH), синглетного кислорода

НАДФН-ОКСИДАЗА РАСТЕНИЙ

($^1\text{O}_2$), оксида азота (NO), пероксинитрита (ONOO^-) и др.

НАДФН-оксидаза (НФ 1.6.99.6) или оксидаза дыхательного взрыва представляет собой ферментный комплекс и локализована на плазматической мембране. При соответствующей активации использует цитоплазматический НАДФН, электроны от которого через ФАД и гем переносятся через мембрану на наружную ее сторону к кислороду с образованием супероксид-радикала (O_2^-). Процесс осуществляется по следующей реакции:



НАДФН-оксидаза хорошо изучена на фагоцитарных клетках, где ее функция связана с уничтожением с помощью производимых ею АФК патогенных микроорганизмов (Babiog et al., 2002). Однако последующие исследования показали локализацию НАДФН-оксидазы во многих других типах клеток млекопитающих, где уровень генерируемых ею АФК гораздо ниже и сам процесс продолжителен по времени. В этом случае АФК могут использоваться как регуляторные и сигнальные молекулы для модуляции обменных процессов, приводящих к различным биологическим эффектам (Клюбин, Гамалей, 1997; Меньщикова, Зенков, 2006).

НАДФН-оксидаза фагоцитирующих клеток – это сложный ферментный комплекс, состоящий из нескольких белковых компонентов. Установлено, что два из них – $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (β -субъединица) и p22^{phox} (α -субъединица) – локализованы на мембране и образуют флавоцитохром b_{558} . Остальные четыре субъединицы – p47^{phox} , p40^{phox} , p67^{phox} и Rac1 или Rac2 (ГТФазы) – являются цитоплазматическими и при активации перемещаются к плазмалеме, образуя с флавоцитохромом b_{558} ферментный комплекс, генерирующий супероксидный анион-радикал. Установлено, что флавоцитохром b_{558} содержит все редокс-компоненты НАДФН-оксидазы, необходимые для трансмембранного переноса электронов на O_2 и образования супероксидного анион-радикала (Меньщикова, Зенков, 2006). Однако он не может функционировать автономно без участия цитозольных компонентов – субъединиц p47^{phox} , p40^{phox} , p67^{phox} и Rac1 или Rac2 . Их активация (фосфорилирование, конформационные изменения, транслокация) инициирует самосборку функционирующего НАДФН-ферментного комплекса. Генные мутации любого белкового компонента системы приводят к нарушению работы НАДФН-оксидазы и являются причиной разви-

тия у человека болезни – хронического гранулематоза, характеризующегося снижением или полным отсутствием ферментативной активности НАДФН-оксидазы в фагоцитирующих и других клетках (Меньщикова, Зенков, 2006).

Ферментная система, схожая с НАДФН-оксидазной системой фагоцитов, обнаружена и в других типах клеток млекопитающих: лимфоцитах, тромбоцитах, фибропластах и др. Однако генерируемый этими клетками в сравнительно небольших количествах O_2^- выполняет скорее регуляторную и сигнальную роль, чем антибактериальную и цитотоксическую (Меньщикова, Зенков, 2006). Есть данные, что активация НАДФН-оксидаз в нефагоцитирующих клетках (эндотелиальных и гладкомышечных клетках) сопровождается внутриклеточным образованием супероксида, который может служить цитоплазматическим регулятором (Gorlach et al., 2000).

В настоящее время в животных клетках наряду с субъединицами полностью идентичными соответствующим компонентам НАДФН-оксидазной системы фагоцитов найдены их изоформы (гомологи). Наибольшим количеством изоформ представлен белок $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (glycoprotein of 91 kDa, phagocyte oxidase-specific), содержащим все необходимые элементы электрон-транспортной цепи и осуществляющим катализируемую реакцию восстановления O_2 до супероксида. Изомеры этой субъединицы получили обозначения Nox (NADPH oxidase). В настоящее время известны гомологи Nox1, Nox3, Nox4, Nox5 и Nox2. Последний представляет собственно $\text{gp91}^{\text{phox}}$. Все изоформы обладают разной степенью гомологичности к Nox2 и могут участвовать в НАДФН-оксидазных реакциях в соответствующих клетках млекопитающих. Представляет интерес гомолог Nox5, который активируется ионами Ca^{2+} и синтезирует O_2^- в относительно больших количествах, чем другие Nox по сравнению с фагоцитарным Nox2 (Меньщикова, Зенков, 2006). Особенностью структуры Nox5 является наличие N-концевой области, содержащей 4 мотива типа “EF-рука”, связывающих ионы кальция.

К семейству НАДФН-оксидаз животных клеток также относят так называемые “двойные оксидазы”: Duox1 и Duox2 (dual oxidase/thyroid oxidase), которые найдены в больших количествах в клетках щитовидной железы, а также на слизистой поверхности трахей и бронхов, в воздушных полостях эпителиальных клеток. Кроме супероксид-генерирующей способности,

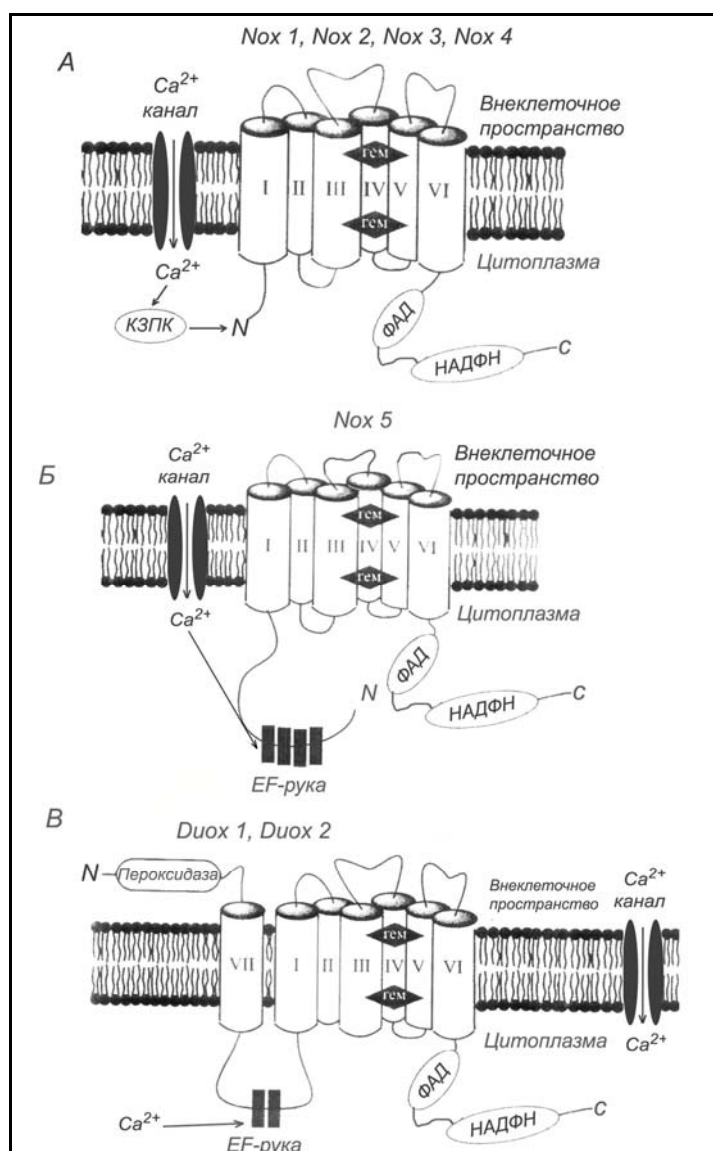


Рис. 1. Схема структуры субъединиц НАДФН-оксидазы клеток животных (по Меньщикова, Зенков, 2006 с дополнениями). Пояснения в тексте.

Duox обладают пероксидазной активностью и имеет (помимо субъединицы Nox2) специфический домен, обращенный во внеклеточное пространство (Ameziane-El-Hassani et al., 2005; Lambeth, 2004). Этот домен также имеет Ca^{2+} -связывающие мотивы (EF-рука) и активируется этим ионом (Ameziane-El-Hassani et al., 2005). Кроме $gp91^{phox}$, найдены изоформы и для других цитозольных субъединиц: $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ и $p40^{phox}$, играющих определенную роль в НАДФН-оксидазной активности клеток животных организмов (Меньщикова, Зенков, 2006). Нет данных об изоформах мембранной субъединицы $p22^{phox}$. По-видимому, эта субъединица является неизменным элементом НАДФН-оксидазного ферментного комплекса, по крайней мере, в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов (Ushio-Fukai et al., 1996).

Цитоплазматический белок Rac, относящийся к семейству Rho малых ГТФ-аз, имеет две изоформы: Rac 1 и Rac 2. Их присутствие в животных клетках абсолютно необходимо для функционирования ферментного комплекса (Vokoch, 1994).

Структура субъединиц НАДФН-оксидазы животных клеток по Меньщиковой, Зенкову (2006) представлена на рис. 1, на котором отображены гомологи Nox 1, Nox 2, Nox 3, Nox 4, Nox 5, Duox 1 и Duox 2.

В настоящее время четко доказано, что помимо антибактериальной защиты в нейтрофильных клетках, НАДФН-оксидаза выполняет в других типах клеток животных функции, связанные с иммунитетом, сигнальной трансдукцией и модификацией внутриклеточного матрикса (Jones et al., 2007; Lambeth, 2004).

НАДФН-ОКСИДАЗА РАСТЕНИЙ

Структурные особенности растительной НАДФН-оксидазы

На растительных объектах НАДФН-оксидаза начала изучаться гораздо позднее, чем на животных и этим исследованиям способствовали данные о ее сходстве с оксидазой дыхательного взрыва животных клеток (Doke, 1983; 1985; Doke et al., 1996). Для доказательства присутствия НАДФН-оксидазы в растительных клетках широко используется библиотека генов полностью отсеквенированного генома *Arabidopsis*, иммунохимический метод с применением антител, специфичных к животным субъединицам Nox, с целью определения взаимодействия животных белков с близкородственными белками растений (Sagi, Fluhr, 2006). Используются мутанты, особенно *Arabidopsis*, дефектные по генам, кодирующим синтез гомологов Rboh. Наличие НАДФН-оксидазы в растительных клетках в настоящее время подтверждено многими фактами (Sagi, Fluhr, 2006). В противоположность мультиферментному комплексу НАДФН-оксидазы фагоцитов в растениях найдены только гомологи β -субъединицы $gp91^{phox}$ (Nox2) и один цитозольный регулятор семейства малых ГТФ-аз (Ras-белки) (Torres et al., 2002; Torres, Dangel, 2005). Гомологи Nox $p22^{phox}$, $p67^{phox}$, $p47^{phox}$ и $p40^{phox}$ не найдены в геноме *Arabidopsis* (Dangel, Jones, 2002), хотя по данным Xing et al. (1997) в цитоплазме суспензионных клеток томата присутствуют белковые компоненты, подобные животным $p67^{phox}$, $p47^{phox}$, которые активируются при действии на клетки грибного элиситора, перемещаются к плазмалемме и встраиваются в цитоскелет мембраны. Рас-белки в растениях получили название Rop (Rho-related GTPases from plants).

Nox-гомологи в растениях обозначаются как Rboh (respiratory burst oxidase homologs). Rboh найдены у растений риса, арабидопсиса, табака, картофеля и у других видов (Doke, 2003; Groom et al., 1996; Kanafy et al., 2001; Sagi, Fluhr, 2001; Torres et al., 1998; Yoshioka et al., 2001; 2003). В отличие от животной субъединицы $gp91^{phox}$, растительная Rboh имеет N-концевой участок, который связывает ионы Ca^{2+} с помощью двух мотивов (EF-рука) (рис. 2). В животных клетках EF-сайты содержат гомологи Nox 5 и Duox (рис. 1). Это дает возможность предполагать о регулирующей роли Ca^{2+} в активности НАДФН-оксидазы. Растительные Nox-гомологи (Rboh) содержат также цитозольный ФАД- и НАДФН-связывающие домены и шесть трансмембранных спиралей с двумя

гемами (рис. 2). Гем-группы требуются для транспорта электронов через мембрану к внеклеточному акцептору O_2 и связаны с 3 и 5 трансмембранными спиральями через His-остатки.

Наибольшее количество тканеспецифичных генов (десять), ответственных за синтез растительных клетках гомологов $gp91^{phox}$, найдено у *Arabidopsis*. Их условное название *Atrboh* (A, B, C, D, E, F, G, H, J, L) (Sagi, Fluhr, 2001). Из листьев табака (*Nicotiana benthamiana*) изолированы два гомолога Rboh: NbrbohA и NbrbohB (Doke, 2003; Yoshioka et al., 2003). 2 гена (*StrbohA*, *StrbohB*), ответственных за синтез растительных гомологов $gp91^{phox}$, выделены из клубней картофеля (Yoshioka et al., 2001). Обнаружен белок, обладающий большой степенью подобия с животной $gp91^{phox}$, в корнях и побегах риса (Groom et al., 1996). Обнаружена тканеспецифичность распределения транскриптов *AtRboh*. Эти исследования проведены на арабидопсисе и в результате выявлены три группы распределения транскриптов: экспрессия генов по всему растению (*Atrboh D* и *F*), в корнях (*Atrboh A*, *B*, *C*, *E*, *G*, *I*), в пыльце (*Atrboh H*, *J*) (Sagi, Fluhr, 2006). Накопление транскриптов гомологов НАДФН-оксидазы происходит под влиянием различных абиотических и биотических факторов. Причем обнаружена специфичность экспрессии *Atrboh* к различным факторам. Так, *Atrboh F* экспрессируется под влиянием патогенной инфекции (Torres et al., 2002), *Atrboh C* участвует в росте корня и корневых волосков (Foreman et al., 2003). *Atrboh D* выявлен как основная конститутивная форма (Torres et al., 2002). Многообразный характер транскрипции генов Rboh свидетельствует о том, что растительная НАДФН-оксидаза может функционировать в широких границах физиологических реакций растения на экзогенные и эндогенные факторы.

Вопрос о локализации НАДФН-оксидазы у растений окончательно не решен, хотя имеется достаточно доказательств о ее локализации на плазматической мембране (Kobayashi et al., 2006; Sagi, Fluhr, 2006; Simon-Plas, 2002). Внутриклеточное распределение НАДФН-оксидазы (Nox2, Duox) показано для животных тканей (Ameziane-El-Hassani et al., 2005; Lambeth, 2004; Murillo, Henderson, 2005). По данным Васильевой и др. (2007), активность НАДФН-оксидазы, определяемой по окислению НАДФН, в 3-5 раз выше в микросомальной фракции корней проростков гороха, чем в цитоплазматической. Однако утверждать о цито-

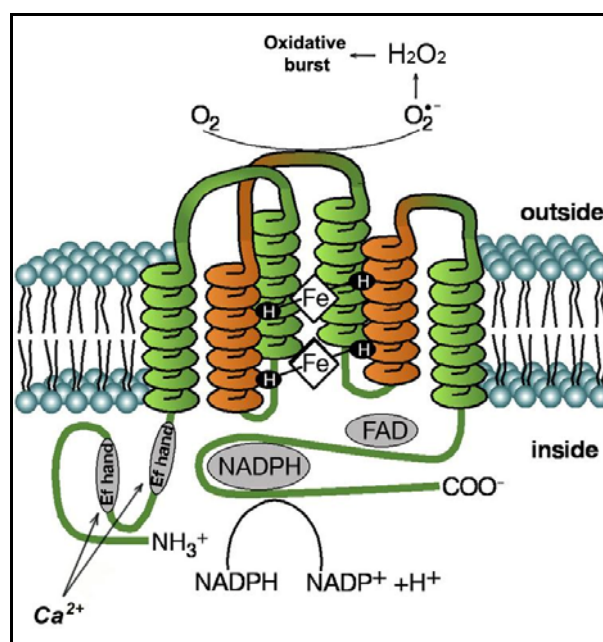


Рис. 2. Структура Rboh, локализованной на плазмалемме (по Sagi, Fluhr, 2006 с дополнениями).

Показано: транспорт электронов от клеточной НАДФН к электронной цепи кислорода через C-терминальный конец; N-терминальная область с EF-мотивами, связывающими Ca^{2+} .

плазматической локализации растительной НАДФН-оксидазы, вероятно, преждевременно. Эти данные должны быть подтверждены с помощью генетического и ингибиторного анализа.

Стоит вопрос о сопряженности активности растительной НАДФН-оксидазы с функционированием супероксиддисмутазы (СОД). Последняя, как известно, осуществляет дисмутацию O_2^- в H_2O_2 , являющийся межклеточной сигнальной молекулой. Данные о локализации растительной СОД на плазматической мембране и ее функционировании в электронно-транспортной цепи отсутствуют. В зависимости от pH только небольшая часть супероксида может протонировать (при pH 5,0), пересекать мембрану и быть доступной для СОД. Таким образом, внешний pH-статус может изменять компартиментацию супероксида и давать возможность цитоплазматической СОД катализировать образование пероксида водорода (Sagi, Fluhr, 2006). Как уже отмечалось, в животных клетках H_2O_2 может образовываться на наружной стороне мембраны одновременно с образованием супероксида с участием двойной оксидазы Duox, обладающей как супероксидгенерирующей, так и пероксидазной активностью (см. рис. 1). H_2O_2 , как известно, свободно проникает через мембраны. Однако данных о наличии гомологов Duox в растительных клетках нет. В то же время обращает на себя внимание

НАД(Ф)Н-оксидаза-пероксидаза, локализованная в клеточной стенке, которая может активироваться при подщелачивании апопласта в ответ на внедрение паразита и вносить вклад в генерацию H_2O_2 (Grant, Loake, 2000).

Регуляция активности Rboh

Регуляторные механизмы Rboh остаются малоизвестными. Важнейшим элементом регуляции активности растительной НАДФН-оксидазы считают кальций (Sagi, Fluhr, 2006). Этим растительная НАДФН-оксидаза отличается от животной. Если у Nox2 N-терминальный конец не содержит Ca^{2+} -связывающие мотивы (EF-рука), то наличие их у Rboh по некоторым данным (Sagi, Fluhr, 2001) обеспечивает непосредственную стимуляцию активности фермента с помощью ионов Ca^{2+} , выход которых из внеклеточного пространства в цитоплазму инициируется экзо- и эндогенными факторами. Важную роль в регуляции генерации АФК, осуществляемой НАДФН-оксидазой, отводят кальцийзависимым протеинкиназам, которые осуществляют фосфорилирование N-терминального конца Rboh (Kobayashi et al., 2006).

На рис. 3 представлена предполагаемая модель регуляции активности НАДФН-оксидазы (Rboh) по Wong et al. (2007). В соответствии с ней на первой стадии "окислительного взрыва" приток Ca^{2+} в цитоплазму необхо-

НАДФН-ОКСИДАЗА РАСТЕНИЙ

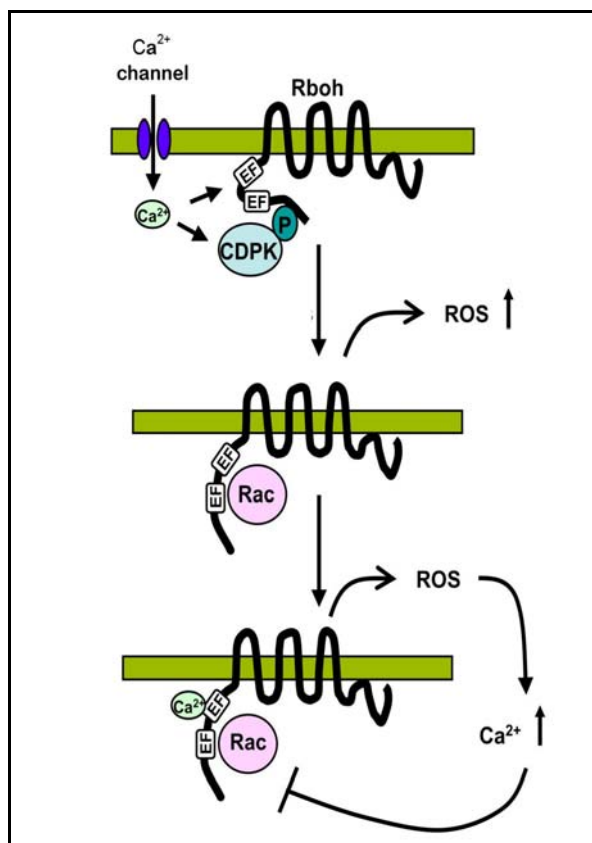


Рис. 3. Схема регуляции активности Rboh (по Wong et al., 2007 с дополнениями и изменениями). На первой стадии окислительного взрыва приток Ca^{2+} в цитоплазму вызывает активацию Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы (CDPK), которая фосфорилирует N-концевую область фермента, что облегчает взаимодействие фермента с Rop ГТФ-азы (Rac) и вызывает активацию Rboh. Усиление образования АФК (ROS) вызывает вторую фазу накопления Ca^{2+} в цитоплазме, что ингибирует взаимодействие ГТФ-азы с Rboh и ведет к снижению активности фермента.

дим для Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы, которая фосфорилирует N-терминальный участок и вызывает конформационные изменения в Rboh. Последнее облегчает связывание с Rboh цитозольного компонента Rop ГТФ-азы, ведущее к активации НАДФН-оксидазной активности и усилению образования АФК. По мнению указанных авторов, увеличение образования АФК вызывает вторую фазу накопления Ca^{2+} в цитоплазме путем стимулирования открытия кальциевых каналов на плазматической мембране. Накопление Ca^{2+} в цитоплазме может быть причиной ингибирования взаимодействия Rop ГТФ-азы – Rboh и снижения активности НАДФН-оксидазы. Таким образом, содержание кальция в цитоплазме, зависящее от АФК, может служить механизмом, регулирующим взаимодействие мембранной (Rboh) и цитозольной (Rop ГТФ-азы) субъединиц и определяющим активность НАДФН-оксидазы – генератора АФК. С другой стороны, длительная активация НАДФН-оксидазы может быть заторможена другими клеточными механизмами: быстрым удалением кальция из внутриклеточ-

ного пула, истощением субстрата (НАДФН) и O_2^- . В связи с последним необходимо отметить, что пул НАДФН в цитоплазме может пополняться за счет функционирования НАД-киназы, активность которой зависит от Ca^{2+} -зависимого кальмодулина. Таким образом, Ca^{2+} может регулировать НАДФН-оксидазный комплекс косвенно путем повышения концентрации цитозольной НАДФН через модуляцию НАД-киназной активности (Grant, Loake, 2000).

В противоположность рассмотренной схеме данные других авторов свидетельствуют о непосредственной стимуляции активности мембранной НАДФН-оксидазы из растений ионами Ca^{2+} , без участия цитозольного компонента (Rop ГТФ-азы). Так, в опытах Sagi, Fluhr (2001) добавление в реакционную среду с изолированными клеточными мембранами из томатов ионов кальция увеличивало в 2-3 раза продукцию O_2^- НАДФН-оксидазой, что сопоставимо с действием на растения вирусной инфекции. По мнению этих авторов, регуляция активности НАДФН-оксидазы происходит по принципу самоусиливающейся петли, в кото-

рую вовлечены Ca^{2+} и АФК. В животных тканях Nox5, содержащий в N-терминальном конце EF-мотивы, генерирует супероксид в ответ на внутриклеточное увеличение концентрации Ca^{2+} (Banfi et al., 2004). Хотя животная Nox2 не имеет EF-сайтов, ее стимуляция происходит при участии Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы (Cathcart, 2004). На основании этого делается вывод, что стимуляция активности под влиянием ионов Ca^{2+} является общей особенностью для Nox и Rboh – ферментов (Sagi, Fluhr, 2006). С другой стороны, показана активация Strboh не только Ca^{2+} -зависимой, но и Ca^{2+} -независимой протеинкиназой, инициирующей синтез Strboh *de novo* (Yoshioka et al., 2001).

Имеются и другие исследования, свидетельствующие об активации Rboh цитозольным компонентом (Jones et al., 2007; Moeder et al., 2005; Xing et al., 1997). В связи с этим Moeder et al. (2005) считают, что необходимо определить функционируют ли Ca^{2+} и Rop-белок совместно для активации НАДФН-оксидазы или Rop регулирует уровень АФК через отдельный механизм.

АФК, продуцируемые НАДФН-оксидазой, имеют экстра- и внутриклеточную сеть. Фермент поставляет пространственно локализованные АФК и таким образом функционирует как внутриклеточный сигнал, создающий каскад реакций для индукции генов защиты в реакциях растения на различные стрессовые воздействия. Репрессия активности Rboh ведет к изменению метаболизма и, в частности, в гормон-сигнальных путях (Mori, Schroeder, 2004). Таким образом, ионы кальция и АФК являются основными компонентами НАДФН-оксидазной ферментной системы растений и могут выполнять локальную роль в ее активации или ингибировании, что оказывает влияние на интенсивность потоков сигнальных интермедиатов, каковыми являются Ca^{2+} и АФК (Колупаев, 2007; Медведев, 2005).

Представляет интерес возможность участия в регуляции активности НАДФН-оксидазы оксида азота (NO), синтез которого также связан с действием стрессовых факторов. Оксид азота существует в радикальной форме и играет важную роль в ключевых физиологических процессах как в животных, так и в растительных организмах (Besson-Bard et al., 2008). В связи с этим интересна гипотеза о возможном влиянии оксида азота на потоки экстра- и внутриклеточного Ca^{2+} , который, как уже обсуждалось выше, оказывает влияние на активность НАДФН-оксидазы. Суть гипотезы в том, что

NO может повышать или ингибировать индуцированный действием стрессовых факторов поток Ca^{2+} в цитоплазму путем изменения проницаемости кальциевых каналов с участием сигнальных белков, подвергшихся посттрансляционной модификации оксидом азота (Besson-Bard et al., 2008). Этот механизм регуляции потоков Ca^{2+} на плазматической мембране с участием NO может быть полезен для объяснения механизмов функциональной активности НАДФН-оксидазы, в частности, при симбиотических взаимодействиях организмов, когда чрезмерное накопление АФК может препятствовать установлению симбиоза (Shaw, Long, 2003).

Функциональные особенности растительной НАДФН-оксидазы при действии экстремальных факторов

НАДФН-оксидаза чувствительна к абиотическим и биотическим стрессорам. Как правило, фермент реагирует на их действие повышением своей активности. Первичным продуктом его функциональной активности является супероксид (O_2^-), превращаемый при дисмутации супероксиддисмутазой в пероксид водорода. В работе (Sagi, Fluhr, 2001) действие на изолированные листовые диски табака вируса табачной мозаики приводило к трехкратному увеличению активности НАДФН-оксидазы. В исследованиях Pourrut et al. (2008) первый этап окислительного взрыва в корнях бобов при действии свинца авторы связывают с активацией мембранной НАДФН-оксидазы. В то же время недостаток цинка в питании растений бобов также усиливает НАДФН-оксидазную генерацию супероксида мембранными везикулами корней (Pinton et al., 1994). Окислительный стресс, вызванный обработкой корней проростков пшеницы повышенными концентрациями никеля, сопровождается усилением активности мембранной НАДФН-оксидазы, увеличением уровня АФК (O_2^- , H_2O_2) (Hao et al., 2006). Обработка проростков кукурузы абсцизовой кислотой (АБК) или полиэтиленгликолем, вызывающими окислительный и водный стресс у растений, приводила к существенному увеличению в листьях активности мембранной НАДФН-оксидазы, активности антиоксидантных ферментов (СОД, каталазы, аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы) и увеличению содержания антиоксидантных соединений (аскорбата, восстановленного глутатиона) (Jiang, Zhang, 2002). Авторы делают вывод, что НАДФН-оксидаза из листьев кукурузы вовлечена в генерацию АФК, индуцируемую АБК и

НАДФН-ОКСИДАЗА РАСТЕНИЙ

водным стрессом, и накопление АБК при водном стрессе играет важную роль в регуляции активности НАДФН-оксидазы. Предполагается, что механизм влияния АБК на активность НАДФН-оксидазы связан с влиянием АБК на кальциевые каналы, что приводит к увеличению цитозольного уровня Ca^{2+} (Murata et al., 2001).

В работе Shen et al. (2000) показано активирование микросомальной НАДФН-оксидазы из листьев огурца под влиянием низкой положительной температуры (3°C). Активация фермента снималась действием на растения полиаминов (спермидина). Имеются данные об ингибировании полиаминами (спермидином и спермином) активности НАДФН-оксидазы в животных клетках (в микросомах печени крысы и нейтрофилах человека) (Kitada et al., 1979; Ogata et al., 1996). Предполагается, что спермин ингибирует НАДФН-оксидазу в нейтрофилах человека путем связывания с одним из цитозольных компонентов ферментного комплекса (Ogata et al., 1996).

Механизм подавляющего действия полиаминов на активность растительной НАДФН-оксидазы не известен, но предполагается, что они действуют на клеточные мембраны и защищают их от перекисного окисления липидов путем регуляции уровня АФК, зависящего от активности НАДФН-оксидазы (Shen et al., 2000).

В работе Глянько и др. (2008) показано усиление активности НАДФН-оксидазы в корнях проростков гороха под действием высокой дозы минерального азота. Это усиление активности фермента элиминировалось инфицированием проростков клубеньковыми бактериями (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*). При действии на проростки гороха других экстремальных факторов (условно-патогенной бактерии *Esherichia coli*, низкой положительной температуры, гербицида параквата, нитропруссиды натрия) ризобиальная инфекция не снимала активирующее влияние этих факторов на НАДФН-оксидазу корней гороха, а при совместном действии ризобиальной инфекции с инфекцией *E. coli* и ризобий с паракватом – усиливала активность НАДФН-оксидазы. Антагонистическое и синергическое действие клубеньковых бактерий на активность НАДФН-оксидазы в корнях гороха на фоне действия экстремальных биотических и абиотических факторов, по-видимому, связано с механизмами бобово-ризобиального взаимодействия, модулирующих обмен веществ растения-хозяина и способствующих ус-

пешному развитию бобово-ризобиального симбиоза. Способность ризобиальной инфекции изменять обмен веществ растения-хозяина с целью создания благоприятных условий для установления симбиоза подтверждается литературными данными (Глянько и др., 2005; Bueno et al., 2001; Martinez-Abarka et al., 1998). Показано влияние ризобиальной инфекции на поток АФК в корнях люцерны, что связывается с действием ризобиального Nod-фактора на активность НАДФН-оксидазы (Shaw, Long, 2003). В этой работе (Shaw, Long, 2003) воздействие патогенного элиситора приводило к повышению уровня H_2O_2 в корнях проростков люцерны на 200% по сравнению с контролем и к его снижению до 125% при совместном действии ризобиального Nod-фактора и элиситора. Авторы делают вывод, что ризобиальный Nod-фактор супрессирует генерирующую АФК систему, тем самым предотвращая экспрессию защитных систем растения-хозяина. Тем не менее, на основании литературных данных можно предполагать, что изменения в активности НАДФН-оксидазы являются одним из механизмов регуляции образования АФК на начальных этапах бобово-ризобиального симбиоза. Это подтверждается данными Lohar et al. (2007), которые показали, что накопление транскриптов НАДФН-оксидазы в корнях люцерны коррелирует с изменением содержания H_2O_2 в первые часы после инокуляции проростков ризобиями.

Исходя из приведенных данных, можно предположить, что влияние экстремальных факторов на функциональную активность НАДФН-оксидазы зависит от их природы и может усиливаться или ослабляться при их совместном действии на растительный организм. Механизмы такого влияния на данную ферментную систему не ясны и требуют изучения.

При исследовании НАДФН-оксидазной ферментной системы широко применяют ингибиторный анализ. Среди соединений, подавляющих активность животной и растительной НАДФН-оксидазы, следует отметить дифенилениодониум (ДФИ), *p*-хлоромеркурибензойную кислоту (*p*-ХМБК), α -нафтол. Полное ингибирование растительного фермента наблюдается при молярной концентрации ДФИ 200 мкМ, *p*-ХМБК – 60 мкМ (Gestelen et al., 1997). ДФИ взаимодействует с флавиновым кофактором фермента, *p*-ХМБК – реагирует с тиоловыми группами. Другие ингибиторы НАДФН-оксидазы – квинакрин, имидазол, пиридин, ин-

гибируют фермент при миллимолярных концентрациях (1-20 мМ).

Применение ингибиторов НАДФН-оксидазы животных клеток при изучении данного фермента на растительных объектах позволило получить доказательства участия НАДФН-оксидазы растений в окислительном стрессе (Dwyer et al., 1996). Так, по данным (Yoshioka et al., 2001), ДФИ ингибирует двухфазное накопление в тканях клубней картофеля H_2O_2 в реакции на грибной элиситор. Окислительный стресс, инициируемый действием на культивируемые клетки розы (*Rosa damascena*) элиситора из *Phytophthora infestans*, сопровождается генерацией АФК (O_2^- , H_2O_2), которая подавляется ингибиторами НАДФН-оксидазы: ДФИ, имидазолом, пиридином, квинакрином (Auh, Murphy, 1995). По другим данным, ингибиторы НАДФН-оксидазы снижают активность фермента из листьев проростков кукурузы и способность антиоксидантных ферментов противостоять окислительному стрессу, вызванному водным дефицитом и действием АБК (Jiang, Zhang, 2002). Имеются и другие сведения о связи НАДФН-оксидазы с окислительным стрессом и генерацией АФК у растений. Так, по данным Kwak et al. (2003), АБК-сигналинг тесно связан с экспрессией генов *AtrbohD* и *AtrbohF* НАДФН-оксидазы в устьичных клетках арабидопсиса. У двойного мутанта арабидопсиса *atrbohD/F* нарушен АБК-сигналинг, что выражается в уменьшении генерации АФК, ингибировании закрытия устьиц, выхода Ca^{2+} в цитозоль и проницаемости Ca^{2+} -каналов. Делается вывод, что гены *AtrbohD/F* НАДФН-оксидазы арабидопсиса задействованы в АБК-сигнальной трансдукции в устьичных клетках.

Заключение

Для животных организмов, в том числе и человека, НАДФН-оксидазная ферментная система является исключительно важным звеном метаболизма в защите от инфекций, а также в модуляции обменных процессов. Мутации в любом из белковых компонентов этого ферментного комплекса приводят к развитию у человека заболевания – гранулематоза. Растительная НАДФН-оксидаза (Rboh) также вовлечена в генерацию АФК при инфицировании растений патогенами, а также при действии неблагоприятных абиотических факторов. Это в первую очередь связано с уровнем кальция в цитоплазме, являющегося регулятором активности этого фермента на плазмалемме. Практически любые экзогенные воздействия приводят к резкому по-

вышению концентрации Ca^{2+} в цитоплазме (Ali et al., 2007) и соответственно активности Rboh.

Как показывают исследования, гомологи Rboh локализованы на плазматической мембране клеток и, очевидно, они одни из первых реагируют на действие экзогенных факторов, участвуя в передаче сигналов в генетическую систему растений (downstream) и реагируя на информацию исходящую от генома (upstream). Поэтому не исключена посттрансляционная регуляция активности Rboh. Возможно присутствие гомологов Rboh и на мембранах внутриклеточных органелл. В то же время если функция НАДФН-оксидазы исключительно связана с генерацией АФК, то возникает вопрос – может ли ее блокирование инициировать другие метаболические пути генерации АФК, необходимые растительным клеткам для отражения атаки патогенов и защиты организма от других неблагоприятных воздействий. Насколько важна для растений НАДФН-сигнальная система – вопрос на который в настоящее время ответить, вероятно, еще нельзя. По данным Kwak et al. (2003), у двойного мутанта *Arabidopsis atrbohD/F* наблюдается уменьшенная генерация АФК, но в его клетках имеется определенный уровень H_2O_2 , который повышается при обработке экзогенной АБК. Это свидетельствует о существовании иных путей генерации АФК.

Вносить вклад в образование АФК могут и другие ферменты, локализованные в клеточной стенке. Это оксалатоксидаза и пероксидаза, активность которых усиливается при сдвиге pH в щелочную сторону во внеклеточном пространстве при инфицировании растений патогенами или действии элиситоров (Wojtaszek, 1997). Отмечается роль G-белков и цАМФ как вторичных сигнальных молекул в подщелачивании экстраклеточного пространства и увеличении генерации H_2O_2 за счет внеклеточной пероксидазы (Bindschedler et al., 2001). Генерация АФК наблюдается во внутриклеточных компартментах: в митохондриальной дыхательной цепи, фотосинтетической электронной цепи, при β -окислении жирных кислот, в реакциях с участием аминоксидаз, гликолатоксидазы, ксантиноксидазы (Mittler, 2002).

НАДФН-оксидаза – ключевой фермент НАДФН-оксидазной сигнальной системы у растений, в которой, кроме АФК (H_2O_2 , O_2^-), в передаче сигналов в геном участвуют и другие соединения, например, салициловая кислота (Тарчевский, 2002). Последняя может влиять на приходный и расходный баланс H_2O_2 в клетках и таким образом косвенно участвовать в регу-

ляции функциональной активности Rboh. Одним из важных последствий функциональной активности НАДФН-оксидазы может быть реакция сверхчувствительности клеток, приводящая к апоптозу или программированной клеточной смерти как животных, так и растительных клеток (Самуилов и др., 2000). Участие H_2O_2 в этом генетически запрограммированном процессе является важным аргументом в необходимости присутствия НАДФН-оксидазы в апопластном пространстве растительных клеток. Нерешенным вопросом в этой проблеме являются также механизмы внутриклеточной передачи сигналов в ядерный геном от мембранной НАДФН-оксидазы, локализованной на плазмалемме и, возможно, на мембранах внутриклеточных органелл.

ЛИТЕРАТУРА

- Васильева Г.Г., Глянько А.К., Ищенко А.А. и др. Активность НАДФН-оксидазы в зонах корня проростков гороха, различающихся по чувствительности к ризобияльной инфекции // *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія.* – 2007. – Вып. 2 (11). – С. 34-42.
- Глянько А.К., Васильева Г.Г., Ищенко А.А. и др. Активность НАДФН-оксидазы в корнях проростков гороха при ризобияльной инфекции в зависимости от действия неблагоприятных факторов // *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія.* – 2008. – Вып. 3 (15). – С. 6-14.
- Глянько А.К., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г., Мирнова Н.В. Возможное участие перекиси водорода и салициловой кислоты в бобово-ризобияльном симбиозе // *Известия РАН. Серия биол.* – 2005. – № 3. – С. 300-305.
- Клюбин И.В., Гамалей И.А. НАДФН-оксидаза – специализированный ферментный комплекс для образования активных метаболитов кислорода // *Цитология.* – 1997. – Т. 39, № 4/5. – С. 320-340.
- Колупаев Ю.Е. Кальций и стрессовые реакции растений // *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія.* – 2007. – Вып. 1 (10). – С. 24-41.
- Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Свойства и функции НАДФН-оксидаз клеток млекопитающих // *Успехи соврем. биологии.* – 2006. – Т. 126, № 1. – С. 97-112.
- Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система растений // *Физиология растений.* – 2005. – Т. 52, № 2. – С. 283-305.
- Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М. Программированная клеточная смерть // *Биохимия.* – 2000. – Т. 65, № 8. – С. 1029-1046.
- Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М., Наука, 2002. – 294 с.
- Ali R., Ma W., Lemtiri-Chlieh F. et al. Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* cyclic nucleotide gated channel2 and innate immunity // *Plant Cell.* – 2007. – V. 19, № 3. – P. 1081-1095.
- Ameziane-El-Hassani R., Morand S., Boucher J.L. et al. Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca^{2+} -dependent H_2O_2 -generating activity // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280, № 34. – P. 30046-30054.
- Auh C.-K., Murphy T.M. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 107, № 4. – P. 1241-1247.
- Babior B.M., Kipnes R.S., Curnutte J.T. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent // *J. Clin. Invest.* – 1973. – V. 52, № 3. – P. 741-744.
- Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – V. 397, № 2. – P. 342-344.
- Baldrige C.W., Gerard R.W. The extra respiration of phagocytosis // *Amer. J. Physiol.* – 1932. – V. 103, № 1. – P. 235-236.
- Banfi B., Tirone F., Durussel I. et al. Mechanism of Ca^{2+} activation of the NADPH oxidase 5 (Nox5) // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279, № 18. – P. 18583-18591.
- Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L. et al. Early signaling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca^{2+} // *New Phytol.* – 2001. – V. 151, № 1. – P. 185-194.
- Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D. New insights into nitric oxide signaling in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2008. – V. 59. – P. 21-39.
- Bokoch G.M. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1994. – V. 6, № 2. – P. 212-218.
- Bueno P., Soto M.J., Rodriguez-Rosales M.P. et al. Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H_2O_2 accumulation during the early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis // *New Phytol.* – 2001. – V. 152, № 1. – P. 91-96.
- Cathcart M.K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages-contributions to atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – V. 24, № 1. – P. 23-28.
- Dangl J.L., Jones J.D.G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection // *Nature.* – 2001. – V. 411, № 6839. – P. 826-833.
- 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. – V. 23, № 2. – P. 345-357.

- Doke N.* NADPH-dependent O_2^- generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans* // *Physiol. Plant Pathol.* – 1985. – V. 27, № 2. – P. 311-322.
- Doke N., Miura Y., Sanchez L.M. et al.* The oxidative burst protects plants against pathogen attack: Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence—a review // *Gene.* – 1996. – V. 179, № 1. – P. 45-51.
- Doke N.* *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H_2O_2 accumulation and resistance to *Phytophthora infestans* // *Plant Cell.* – 2003. – V. 15, № 3. – P. 706-718.
- Dwyer S.C., Legendre L., Low P.S., Leto T.L.* Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunologically related proteins // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1996. – V. 1289, № 2. – P. 231-237.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F. et al.* Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth // *Nature.* – 2003. – V. 422, № 6930. – P. 442-446.
- Gestelen P., Asard H., Caubergs R.J.* Solubilization and separation of a plant plasma membrane NADPH- O_2^- syntase from other NAD(P)H oxidoreductases // *Plant Physiol.* – 1997. – V. 115, № 2. – P. 543-550.
- Gorlach A., Brandes R.P., Nguyen K. et al.* A gp91^{phox} containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall // *Circ. Res.* – 2000. – V. 87, № 1. – P. 26-32.
- Grant J.J., Loake G.J.* Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 124, № 1. – P. 21-30.
- Groom Q.J., Torres M.A., Fordham-Skelton A.P. et al.* rbohA, a rice homologue of the mammalian gp91^{phox} respiratory burst oxidase gene // *Plant J.* – 1996. – V. 10, № 3. – P. 515-522.
- Hao F., Wang X., Chen J.* Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings // *Plant Sci.* – 2006. – V. 170, № 1. – P. 151-158.
- Jiang M., Zhang J.* Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings // *Planta.* – 2002. – V. 215, № 6. – P. 1022-1030.
- Jones M.A., Raymond M.J., Yang Z., Smirnov N.* NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase // *J. Exp. Bot.* – 2007. – V. 58, № 6. – P. 1261-1270.
- Kanafy K.A., Krumenacker J.S., Murad F.* NO, nitrotyrosine and cyclic GMP in signal transduction // *Med. Sci. Monit.* – 2001. – V. 7, № 4. – P. 801-819.
- Keller T., Damude H.G., Werner D. et al.* A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca^{2+} binding motifs // *Plant Cell.* – 1998. – V. 10, № 2. – P. 255-266.
- Kitada M., Igarashi K., Hirose S., Kitagawa H.* Inhibition by polyamines of lipid peroxide formation in rat liver microsomes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1979. – V. 87, № 2. – P. 388-394.
- Kobayashi M., Kawakita K., Maeshima M. et al.* Subcellular localization of Strboh proteins and NADPH-dependent O_2^- - generating activity in potato tuber tissues // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57, № 6. – P. 1373-1379.
- Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K. et al.* Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase // *Plant Cell.* – 2007. – V. 19, № 3. – P. 1065-1080.
- Kwak J.M., Mori I.C., Zhen-Ming P. et al.* NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis* // *EMBO J.* – 2003. – V. 22, № 11. – P. 2623-2633.
- Lambeth J.D.* Nox enzymes and the biology of reactive oxygen // *Nature Rev. Immunol.* – 2004. – V. 4, № 3. – P. 181-189.
- Lamb C., Dixon R.A.* The oxidative burst in plant disease resistance // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1997. – V. 48. – P. 251-275.
- Lohar D.P., Haridas S., Gantt J.S., Vanden Bosch K.A.* A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobium symbiosis // *New Phytol.* – 2007. – V. 173, № 1. – P. 39-54.
- Martinez-Abarka F., Herrera-Cervera J.A., Bueno P. et al.* Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 1998. – V. 11, № 2. – P. 153-155.
- Mittler R.* Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* – 2002. – V. 7, № 9. – P. 405-410.
- Moeder W., Yoshioka K., Klessig D.F.* Involvement of the small GTPase Rac in the defense responses of tobacco to pathogens // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2005. – V. 18, № 2. – P. 116-124.
- Mori I.C., Schroeder J.I.* Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels: a signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetical mechanotransduction // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 135, № 2. – P. 702-708.
- Murillo I., Henderson L.M.* Expression of gp91(phox)/Nox2 in Cos-7 cells: cellular localization of the protein and the detection of outward pro-

НАДФН-ОКСИДАЗА РАСТЕНИЙ

- ton currents // *Biochem. J.* – 2005. – V. 385, № 3. – P. 649-657.
- Murata Y., Pei Z.M., Mori I.C., Schroeder J.I.* Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants // *Plant Cell.* – 2001. – V. 13, № 11. – P. 2513-2523.
- Neill S., Desikan R., Hancock J.* Hydrogen peroxide signalling // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2002. – V. 5, № 5. – P. 388-395.
- Ogata K., Nishimoto N., Uhlinger D.J. et al.* Spermine suppresses the activation of human neutrophil NADPH oxidase in cell-free and semi-recombinant systems // *Biochem J.* – 1996. – V. 313, № 2. – P. 549-554.
- Pourrut B., Perchet G., Silvestre J. et al.* Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots // *J. Plant Physiol.* – 2008. – V. 165, № 6. – P. 571-579.
- Pinton R., Cakmak I., Marschner H.* Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxide radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants // *J. Exp. Bot.* – 1994. – V. 45, № 1. – P. 45-50.
- Shaw S.L., Long S.R.* Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132, № 4. – P. 2196-2204.
- Sagi M., Fluhr R.* Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase: modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 126, № 2. – P. 1281-1290.
- Sagi M., Fluhr R.* Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141, № 2. – P. 336-340.
- Simon-Plas F., Elmayan T., Blein J.P.* The plasma membrane oxidase Ntrboh D is responsible for AOS production in elicited tobacco cells // *Plant J.* – 2002. – V. 31, № 2. – P. 137-147.
- Shen W., Nada K., Tachibana S.* Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 124, № 1. – P. 431-440.
- Torres M.A., Onouchi H., Hamada S. et al.* Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox) // *Plant J.* – 1998. – V. 14, № 3. – P. 365-370.
- Torres M.A., Dangl J.L., Jones J.D.S.* *Arabidopsis* gp91(phox) homologues Atrboh D and Atrboh F are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99, № 1. – P. 517-522.
- Torres M.A., Jones J.D.G., Dangl J.L.* Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana* // *Nature Genetics.* – 2005. – V. 37, № 10. – P. 1130-1134.
- Torres M.A., Dangl J.L.* Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2005. – V. 8, № 4. – P. 397-403.
- Ushio-Fukai M., Zafari A.M., Fukui T. et al.* p22^{phox} is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulate angiotensin II induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271, № 38. – P. 23317-23321.
- Wojtaszek P.* Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection // *Biochem. J.* – 1997. – V. 322, № 3. – P. 681-692.
- Wong H.L., Pinontoan R., Hayashi K. et al.* Regulation of rice NADPH oxidase by Rac GTPase to its N-terminal extension // *Plant Cell.* – 2007. – V. 19, № 12. – P. 4022-4034.
- Xing T., Higgins V.S., Blumwald E.* Race specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane to tomato cells // *Plant Cell.* – 1997. – V. 9, № 2. – P. 249-259.
- Yoshioka H., Sugie K., Park H.J. et al.* Induction of plant gp91phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2001. – V. 14, № 6. – P. 725-736.
- Yoshioka H., Numata N., Nakajima K. et al.* *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans* // *Plant Cell.* – 2003. – V. 15, № 3. – P. 706-718.

Поступила в редакцию
25.02.2009 г.

ГЛЯНЬКО и др.

PLANTS NADPH-OXIDASE

A. K. Glyan'ko, O. O. Ischenko, N. B. Mitanova, G. G. Vasil'eva

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
Siberian Division of Russian Academy Sciences
(Irkutsk, Russia)*

On the basis of knowledge about NADPH oxidase animal cells (Nox) data are generalized about structural and functional features plants NADPH oxidase (Rboh). It is emphasized, that in plants are found homologs enzyme identical subunit gp91^{phox} multi-subunit complex of animal cells. Activation Rboh depends on inflow of ions Ca²⁺ in cytoplasm and phosphorylation N-terminal area of enzyme at participation Ca²⁺-dependent protein kinase. The opportunity of participation in activation Rboh cytosolic component Rop GTP-ase is discussed. Localization Rboh on a plasma membrane of cells plants is ascertained. Increase of activity Rboh occurs under influence both biotic and abiotic factors that in connection with streams Ca²⁺, reactive oxygen species and transfer of the information on nuclear.

Key words: *animal NADPH oxidase (Nox), plants NADPH oxidase (Rboh), subunit gp91^{phox}, ions Ca²⁺, Ca²⁺-dependent protein kinase, cytosolic component Rop GTP-ase, structure and activity Rboh, biotic and abiotic factors, reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS)*

НАДФН-ОКСИДАЗА РОСЛИН

А. К. Глянько, О. О. Ищенко, Н. Б. Митанова, Г. Г. Васильева

*Сибірський інститут фізіології і біохімії рослин
Сибірського відділення Російської академії наук
(Іркутськ, Росія)*

На основі знань про НАДФН-оксидазу (Nox) тваринних клітин узагальнені відомості про структурні і функціональні особливості НАДФН-оксидази (Rboh) рослин. Підкреслюється, що у рослин знайдено гомологи ферменту, ідентичні субодиниці gp91^{phox} ферментного комплексу тваринних клітин. Активація Rboh залежить від надходження іонів Ca²⁺ в цитоплазму і фосфорилування N-кінцевої області ферменту за участі Ca²⁺-залежної протеїнкінази. Обговорюється можлива участь в активації Rboh цитозольного компонента Rop ГТФ-ази. Констатується локалізація Rboh на плазматичній мембрані клітин рослин. Посилення активності Rboh відбувається під впливом як біотичних, так і абіотичних факторів, що пов'язується з потоками Ca²⁺, активних форм кисню і передачею інформації в ядерний геном.

Ключові слова: *НАДФН-оксидаза тварин (Nox), НАДФН-оксидаза рослин (Rboh), субодиниця gp91^{phox}, іони Ca²⁺, кальцій-залежна протеїнкіназа, цитозольний компонент Rop, ГТФ-аза, структура и активність Rboh, біотичні и абіотичні фактори, активні форми кисню (АФК), активні форми азоту (АФА)*