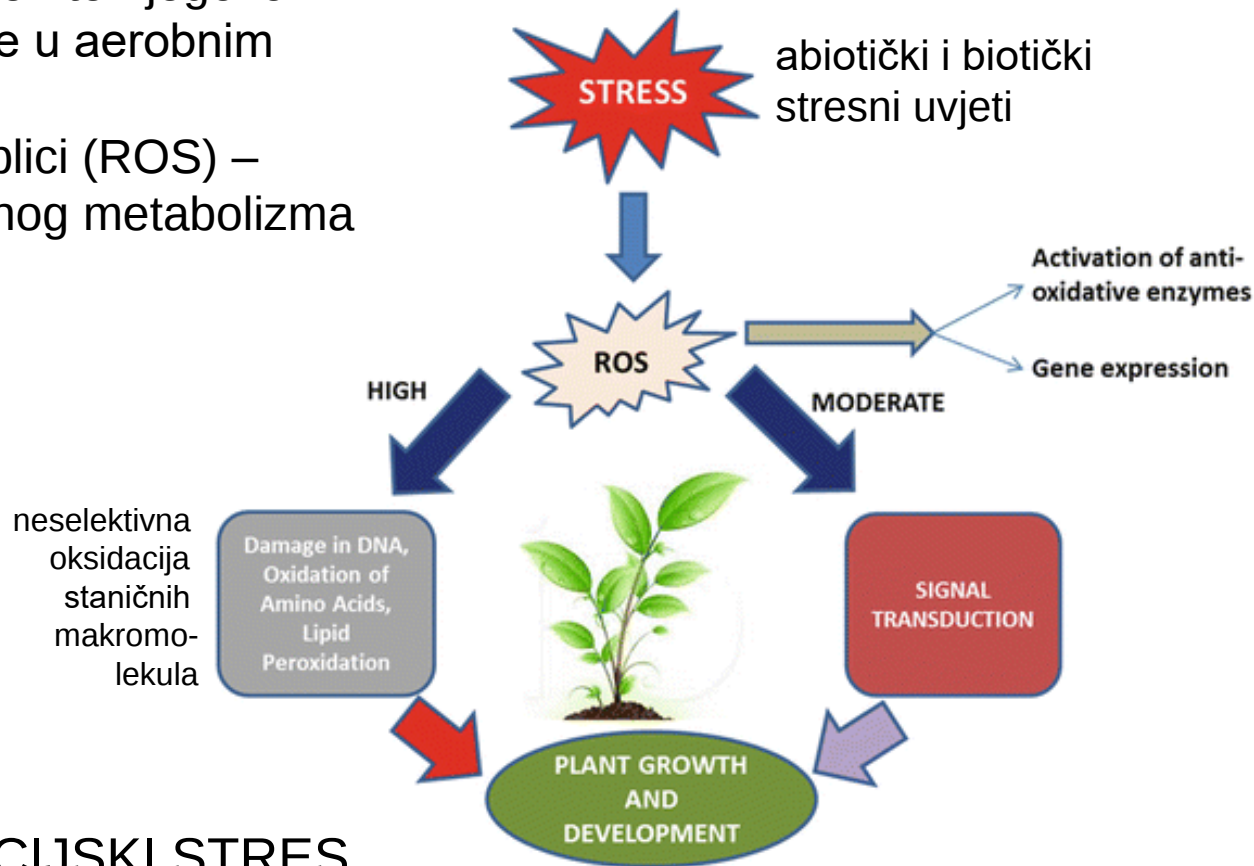


OKSIDACIJSKI STRES U BILJNIM STANICAMA

- prisutnost kisika u atmosferi te njegovo sudjelovanje i oslobađanje u aerobnim metaboličkim reakcijama
 - reaktivni kisikovi oblici (ROS) – nusprodukti aerobnog metabolizma

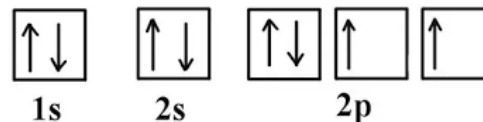
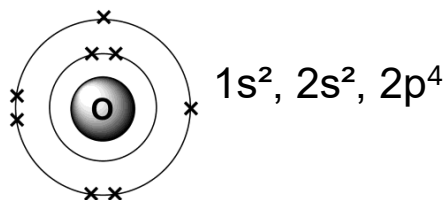
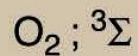


ROS uzrokuju OKSIDACIJSKI STRES

- oksidacija proteina, molekule DNA, lipidna peroksidacija, programirana smrt stanice....
- prisutan u stanicama tijekom djelovanja gotovo svakog stresnog čimbenika

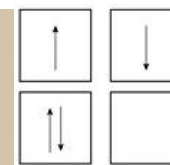
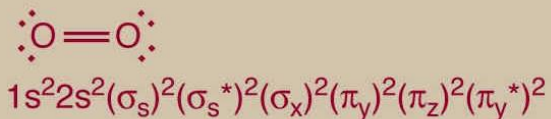
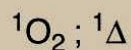
Preuzeto i prilagođeno iz: Sharma S., Kian U., Sopory S.K. (2017). Developing Stress-Tolerant Plants by Manipulating Components Involved in Oxidative Stress. In: Abdin M., Kiran U., Kamaluddin, Ali A. (eds) Plant Biotechnology: Principles and Applications. Springer, Singapore

Molekularni kisik
(osnovno stanje
- tripletno)



Reaktivni oblici kisika

singletni kisik



superoksidni anion



vodikov peroksid



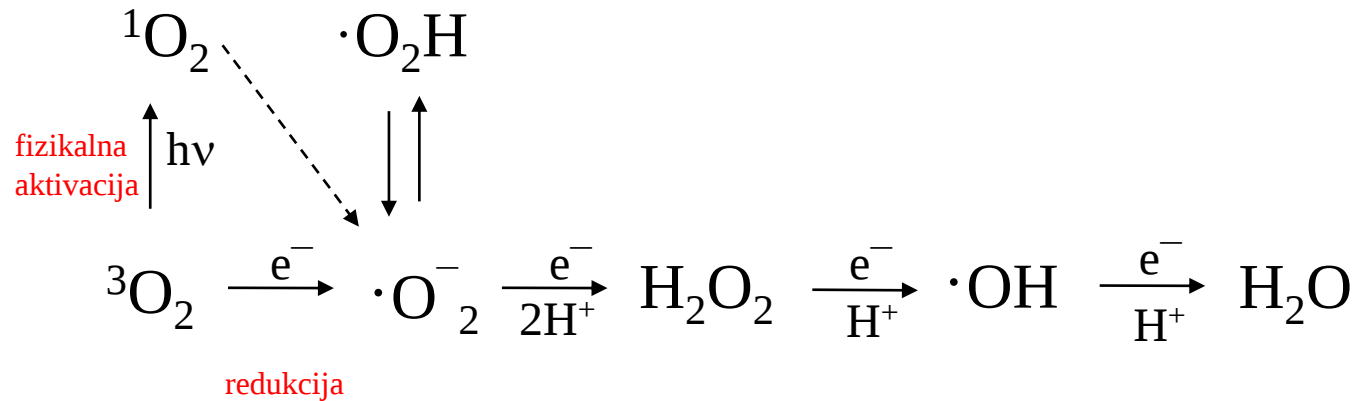
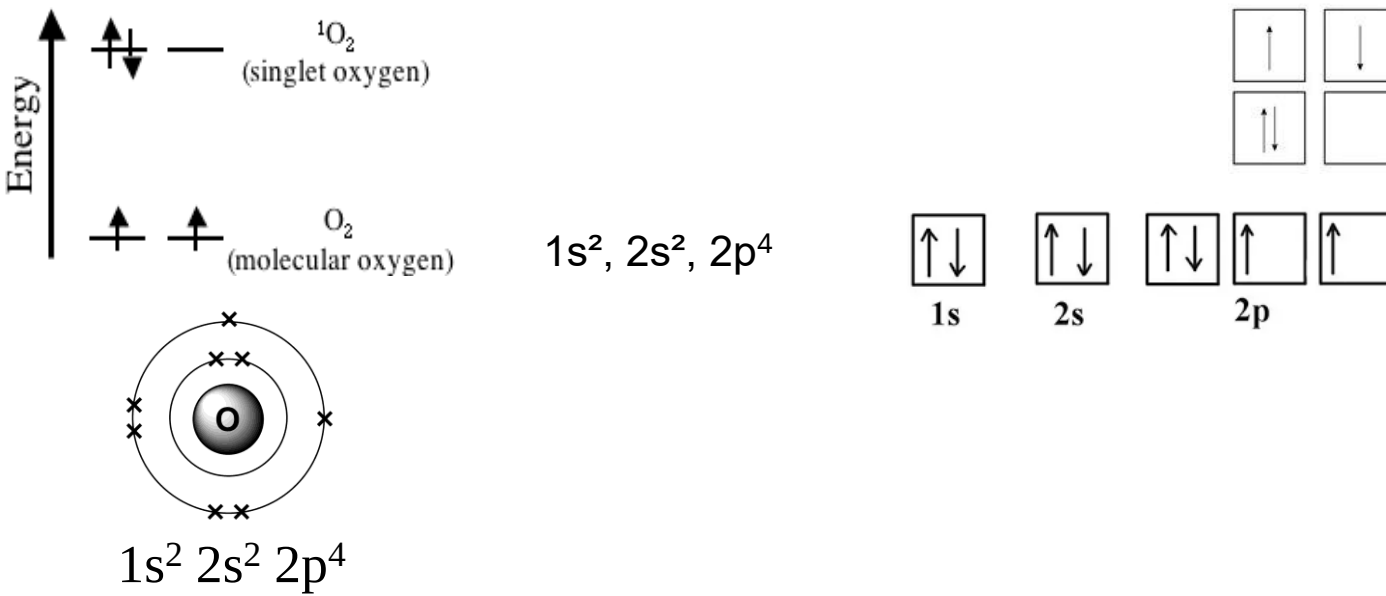
hidroksilni radikal



ozon



Nastajanje ROS



Svojstva ROS i stanične komponente koje modificiraju

Property	Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)	Superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Hydroxyl radical ($\text{HO}^\bullet$)
Half-life ^b	1 μs	1 μs	1 ms	1 ns
Distance traveled ^c	30 nm	30 nm	1 μm	1 nm
Cellular concentration	?	?	μM -mM ^f	?
Reacts with				
Lipids	PUFA	Hardly	Hardly	Rapidly
DNA	Mainly guanine	No	No	Rapidly
Carbohydrates ^d	No	No	No	Rapidly
Proteins	Trp, His, Tyr, Met Cys ^g	Fe-S centers	Cysteines	Rapidly ^h

^aWhere no source is indicated the information is from Halliwell & Gutteridge (41).

^bIn biological systems (9, 85, 99).

^cDistance traveled in one half-life if the diffusion coefficient is assumed to be $10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$.

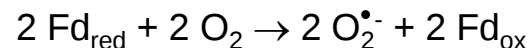
PUFAs – polyunsaturated fatty acids

Tablica preuzeta iz:

Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 459-481.

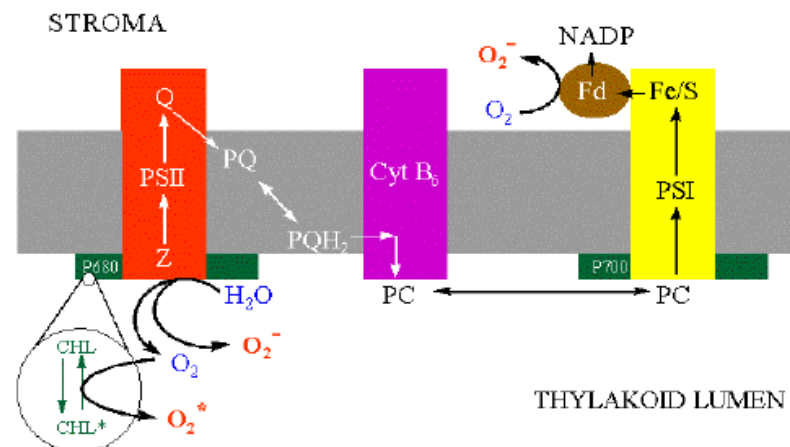
Nastanak ROS u stanici – mjesta i procesi

Mehlerova reakcija



Lanac prijenosa elektrona u kloroplastima

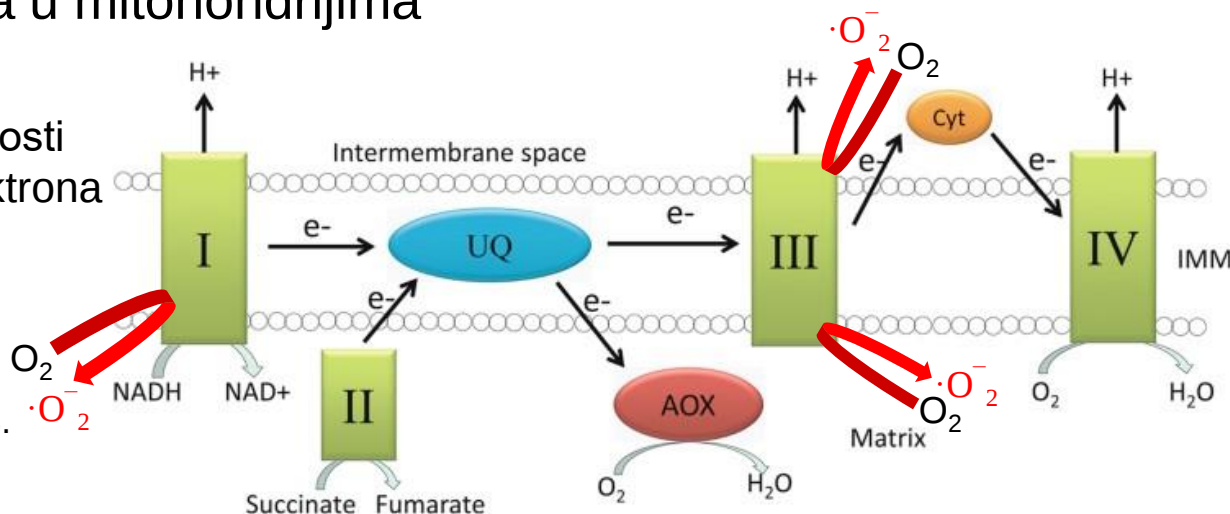
- glavni izvor ROS u biljaka; nekoliko mjesta na kojima nastaju ROS
- fotosistem II – sustav za oksidaciju vode i kompleksi antena
- Mehlerova reakcija – prijenos elektrona na kisik na reducirajućoj strani fotosistema I



Lanac prijenosa elektrona u mitohondrijima

Povećani nastanak ROS

- u uvjetima povećane reduciranosti sastavnica lanca prijenosa elektrona



Slike (preuzete i prilagođene):

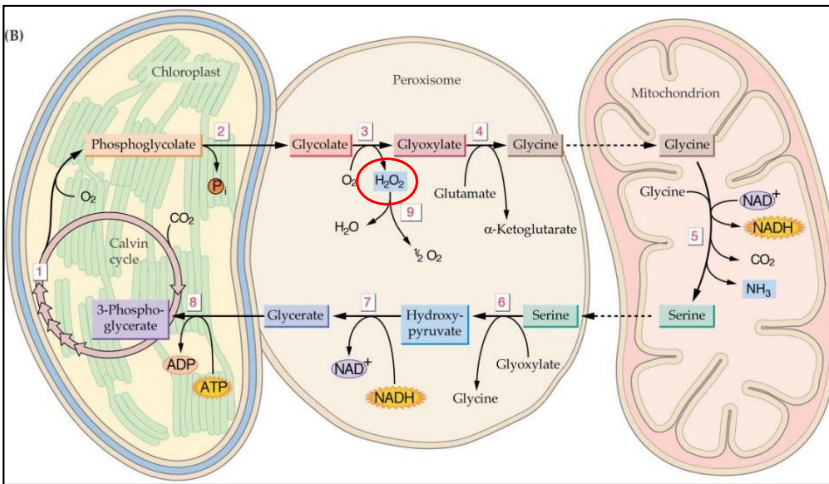
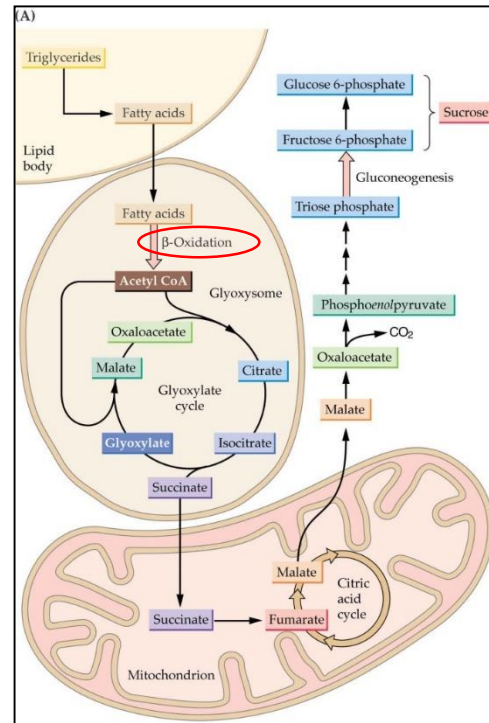
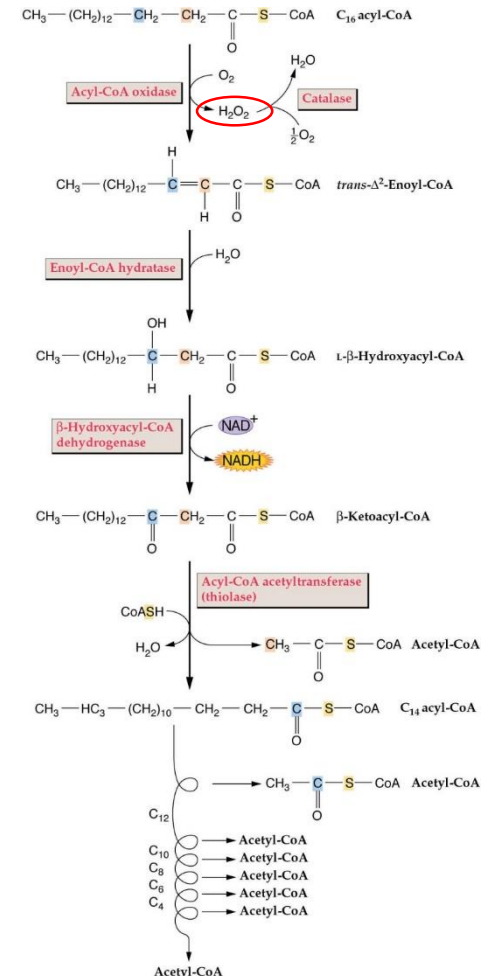
Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. (2002). Current Science 1227-1238.

Liu, M., Guo, X. (2017). Scientific Reports 7(1), 1-10.

Reakcije u mikrotjelešcima

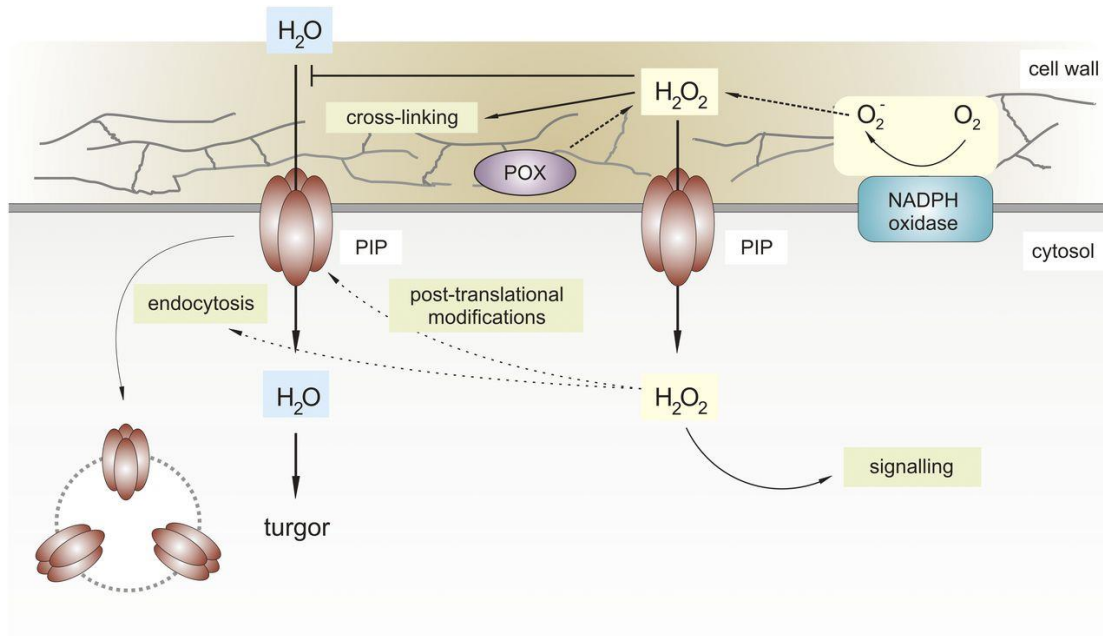
- reakcija glikolat-oksidge u procesu fotorespiracije
- β-oksidge masnih kiselina u glioksisomima u procesu mobilizacije masti

-β-oksidge masnih kiselina u glioksisomima



Buchanan, B., Grussem, W., Jones, R. L. (2002): **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.**

Područje stanične stijenke i apoplast



Preuzeto iz:

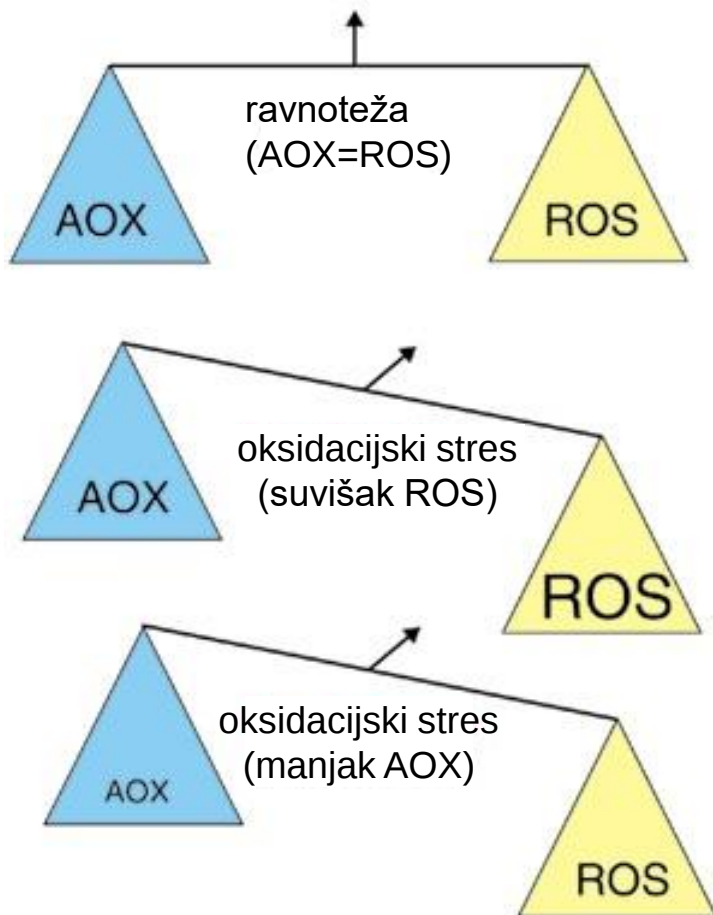
Schmidt, R., Kunkowska, A. B., Schippers, J. H. (2016). Role of reactive oxygen species during cell expansion in leaves. *Plant Physiology*, 172(4), 2098-2106.

POX – peroxidase

PIP – plasma membrane intrinsic protein (ubrajaju se u akvaporine)

Metabolizam u optimalnim uvjetima:

- ravnoteža nastanka i razgradnje ROS (uloga antioksidacijskog sustava)
- učinkovit popravak oštećenih staničnih sastojaka



Oksidacijski stres – poremećena ravnoteža nastanka ROS i njihove neutralizacije djelovanjem antioksidacijskog sustava

ROS – reaktivni oblici kisika
AOX – antioksidacijski sustav

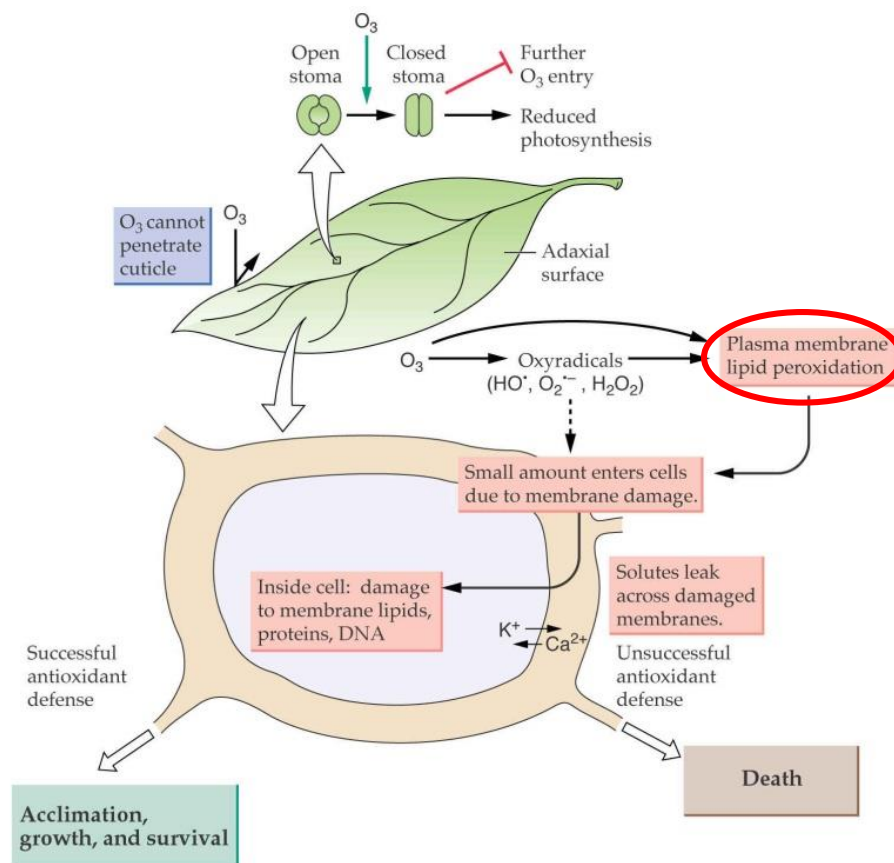
Uloga ROS u biljnoj stanici

- neselektivna oksidacija bioloških makromolekula
- signalne molekule
(u procesima rasta i razvoja, programirane stanične smrti, u odgovoru na abiotički stres, na napad patogena)
- reakcije učvršćivanja stanične stijenke

Nastajanje ROS u stresnim uvjetima

Primjeri:

1. učinak troposferskog ozona



Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2002): **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.**

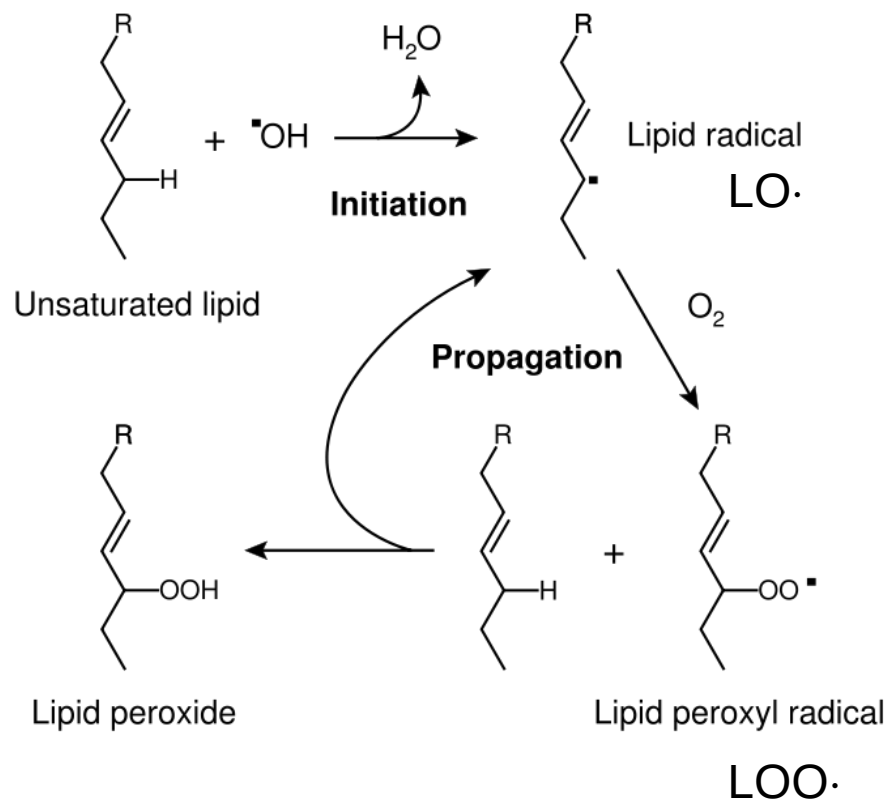
Lipidna peroksidacija (peroksidacija PUFA) – djelovanje $\cdot\text{OH}$ i $^1\text{O}_2$

-nastajanje slobodnih alkoksi ($\text{LO}\cdot$) ili peroksi radikala ($\text{LOO}\cdot$)

Odvija se u 3 stupnja:

- inicijacija
- propagacija
- terminacija

-peroksidacija PUFA narušava fluidnost membrana, povećava rizik za „prokapavanje” a membranski proteini mogu biti sekundarni cilj propagacije procesa lipidne peroksidacije



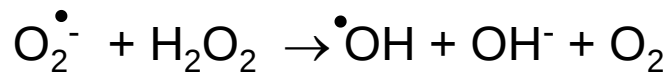
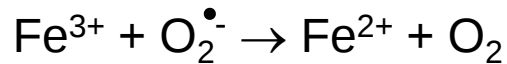
Peroksidacija PUFA uzrokovana metalima



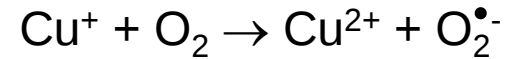
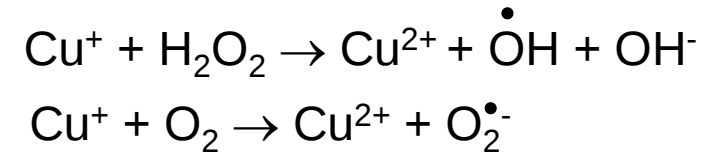
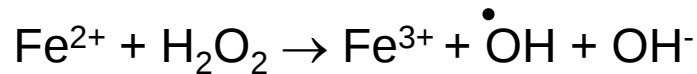
PUFA - polyunsaturated fatty acids
(višesruko nezasićene masne kiseline)

2. nastajanje ROS u prisutnosti suviška metala

Haber-Weissova reakcija

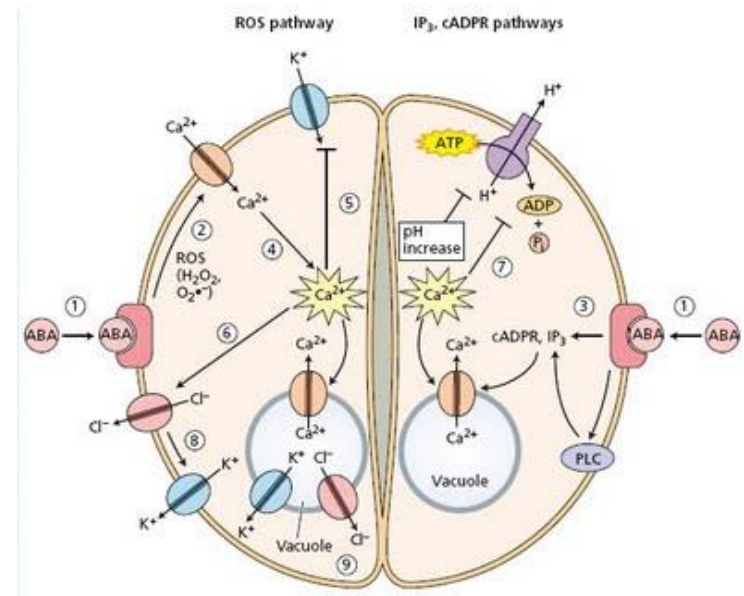


Fentonova reakcija



3. signalna uloga u uvjetima manjka vode

-zatvaranje puči
(prijenos signala u mehanizmu djelovanja hormona ABA)



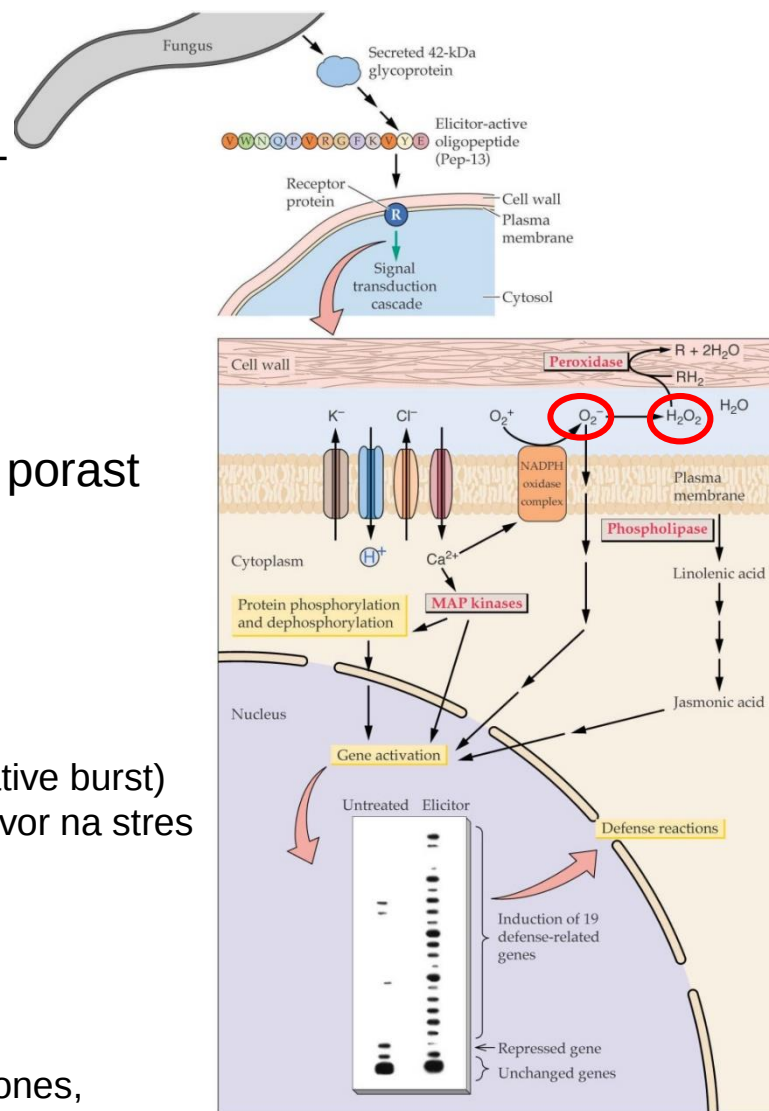
4. aktivacija obrambenog odgovora pri napadu patogena

-NADPH oksidaze i apoplastne peroksidaze – izvor ROS koji imaju signalnu ulogu te ulogu u učvršćivanju elemenata stanične stijenke

-”oxidative burst” (oksidacijski prasak) – nagli porast količine ROS pri napadu patogena

-enzimi RBOH - NADPH oxidase / respiratory burst oxidase homolog

-prisutni u biljnim i animalnim stanicama; uzrokuju lokalizirani oksidacijski prasak (oxidative burst) koji je bitan za procese rasta i razvoja te odgovor na stres



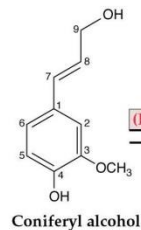
Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2002): **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.**

Indukcija odgovora na napad gljivice *Phytophthora sojae*

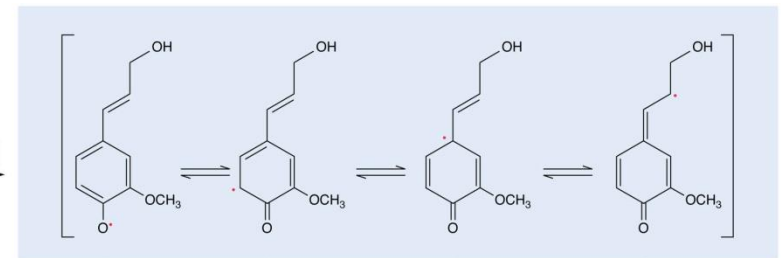
5. Učvršćivanje elemenata stanične stijenke

-povezivanje staničnih proteina te biosinteza drugih elemenata stanične stijenke

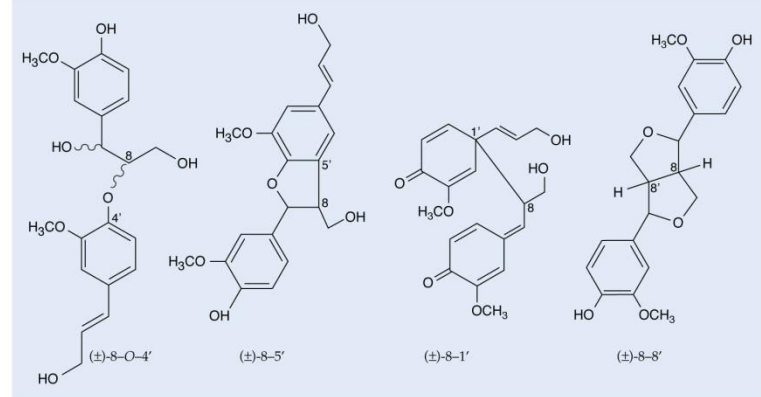
-biosinteza lignina
(mekhanizam reakcije
u uvjetima *in vitro*)



(Per)Oxidase



Coupling with neighboring free radical by way of a nonenzymatic process, followed by either intramolecular cyclization or reaction with H₂O



Repetition of process (enzymatic oxidation followed by nonenzymatic coupling)

"Lignin" polymer formation *in vitro*

Uklanjanje reaktivnih oblika kisika **antioksidacijskim sustavom**

a) Enzimi

- superoksid-dismutaza
- katalaza
- askorbat peroksidaza
- gvajakol peroksidaza
- glutation reduktaza
- glutation-S-transferaza

b) Neenzimski antioksidansi

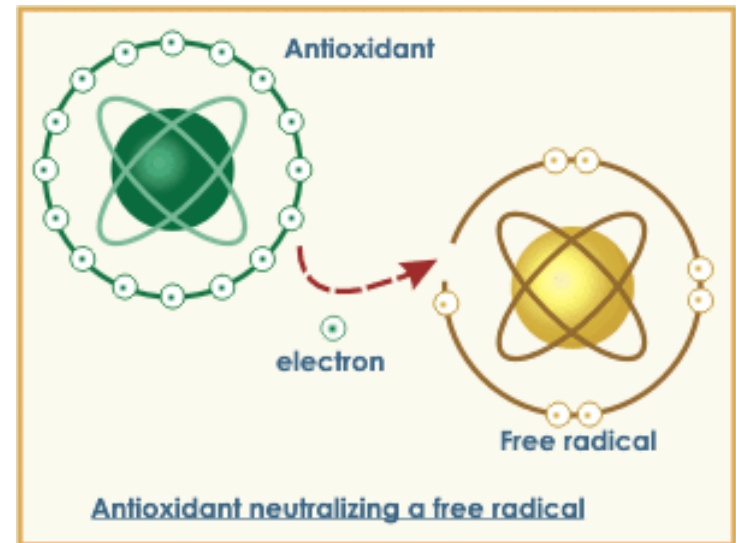
- askorbat
- glutation
- tokoferol
- karotenoidi
- fenoli
- flavonoidi
- prolin

ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV

- enzimi
 - neenzimski antioksidansi
- } prekidaju kaskadu nekontroliranih reakcija

ANTIOKSIDANS

- svaka molekula koja inaktivira ROS, a **sama se ne pretvara u destruktivni oblik**



- važnost raspodjele antioksidacijskih metabolita i enzima u stanične odjeljke → različiti antioksidacijski enzimi mogu djelovati na isti ROS (npr. H_2O_2 - u citosolu, glioksisomima i peroksisomima se cijepa katalazom, a u citosolu i plastidima askorbat peroksidazom)

ANTIOKSIDACIJSKI ENZIMI

-kataliziraju redoks-reakcije, neki koriste elektrone koji potječu od reducensa niske M_r (npr. askorbat, glutation, feredoksin)

ENZIM

superoksid dismutaza

askorbat peroksidaza

monodehidroaskorbat reduktaza

dehidroaskorbat reduktaza

glutation reduktaza

katalaza

glutation-peroksidaza

gvajakol-peroksidaza

glutation S-transferaza

KRATICA

SOD

APX

MDHAR

DHAR

GR

CAT

GPX

POD

GST

EC

1.15.1.1

1.11.1.11

1.6.5.4

1.8.5.1

1.6.4.2

1.11.1.6

1.11.1.9

1.11.1.7

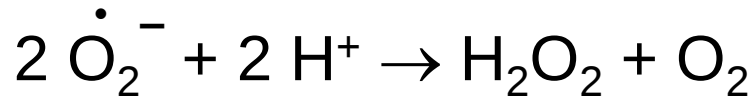
2.5.1.18

ANTIOKSIDACIJSKI ENZIMI – raspodjela u stanične odjeljke

Antioxidant enzyme	Abbreviation	Subcellular location
Ascorbate peroxidase	APX	Cytosol, plastid stroma, plastid membrane, root nodules
Catalase	CAT	Cytosol, glyoxysome, peroxisome
Dehydroascorbate reductase	DHAR	Cytosol, plastid stroma, root nodules
Glutathione reductase	GR	Cytosol, mitochondrion, plastid stroma, root nodules
Monodehydroascorbate reductase	MDHAR	Plastid stroma, root nodules
Superoxide dismutase (grouped by metal cofactor)	Cu/ZnSOD	Cytosol, peroxisome, plastid, root nodules
	MnSOD	Mitochondrion
	FeSOD	Plastid

SUPEROKSID DISMUTAZA (SOD)

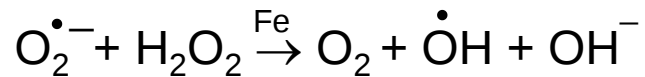
-uklanja superoksidne radikale



-nastaje drugi ROS (H_2O_2)

-aktivnost SOD umanjuje mogućnost nastanka

•OH Haber-Weissovom reakcijom



SOD

-metaloenzimi

-izoenzimi - u pojedinim kompartmentima

tri izoenzima – vežu različite metalne ione (kofaktore)

Dismutacija – reakcija u kojoj se jedan reaktant prevodi u dva različita produkta

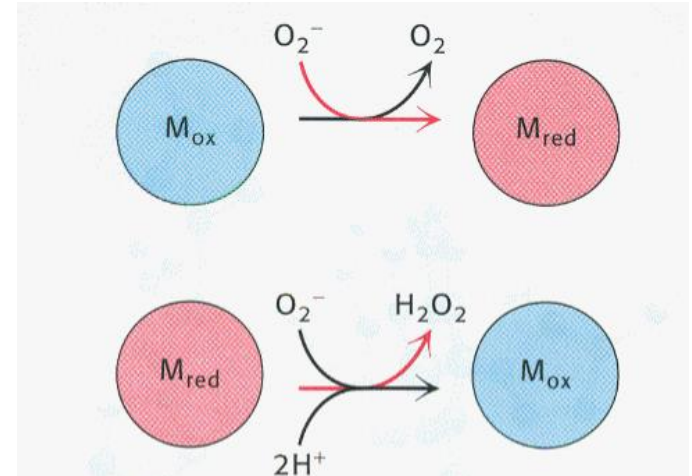
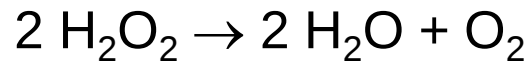


FIGURE 18.22 Superoxide dismutase mechanism. The oxidized form of superoxide dismutase (M_{ox}) reacts with one superoxide ion to form O_2 and generate the reduced form of the enzyme (M_{red}). The reduced form then reacts with a second superoxide and two protons to form hydrogen peroxide and regenerate the oxidized form of the enzyme.

Mn-SOD u mitohondrijima,
Fe-SOD u kloroplastima,
Cu/Zn-SOD u plastidima, citosolu,
peroksisomima te u korijenovim nodulima

KATALAZA (CAT)

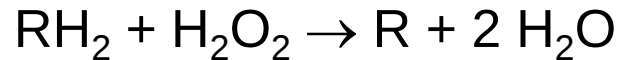
- hem-protein, tetramer
- katalizira dismutaciju H_2O_2 u vodu i kisik



- u mikrotjelešcima, citosolu, kloroplastima, mitohondrijima
- visoki afinitet za H_2O_2 ali manja specifičnost za organske perokside (R-O-O-R)
- u usporedbi s peroksidazom niži afinitet za supstrat (reakcija zahtijeva simultano vezanje dviju molekula H_2O_2 na aktivno mjesto)
- nema donora elektrona
- alternativni način za uklanjanje $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ peroksidaze

PEROKSIDAZE (POD)

-prevode H_2O_2 u vodu uz pomoć reducirajućeg supstrata



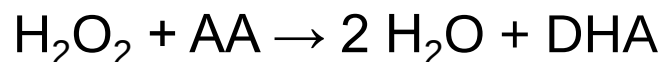
-klasificiraju se prema supstratnoj specifičnosti

-imaju puno veći afinitet za H_2O_2 od katalaze

ASKORBAT PEROKSIDAZA (APX)

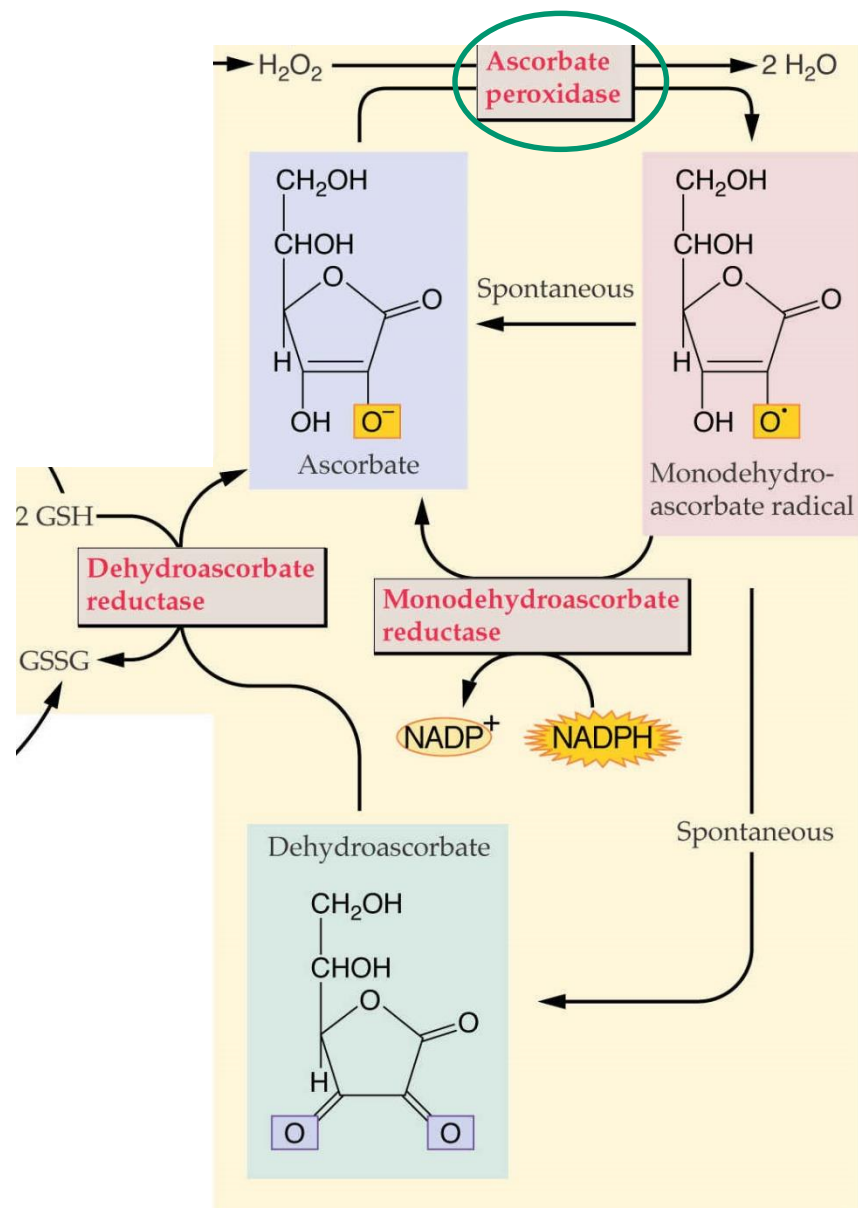
- najvažnija uloga u detoksikaciji H_2O_2 u biljaka
- u citosolu te stromi i tilakoidima kloroplasta, mitohondrijima, peroksisomima

- integralni dio askorbat-glutationskog ciklusa u kloroplastu



AA – askorbat

DHA – dehidroaskorbat



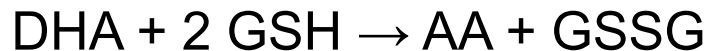
MONODEHIDROASKORBAT REDUKTAZA (MDHAR) I DEHIDROASKORBAT REDUKTAZA (DHA)

-regeneriraju askorbat

MDHAR regenerira AA iz kratkotrajnog MDHA, koristeći NADPH kao reducens



DHAR – regenerira AA redukcijom DHA
-donor elektrona: reducirani glutation



AA – askorbat

MDHA – monodehidroaskorbat

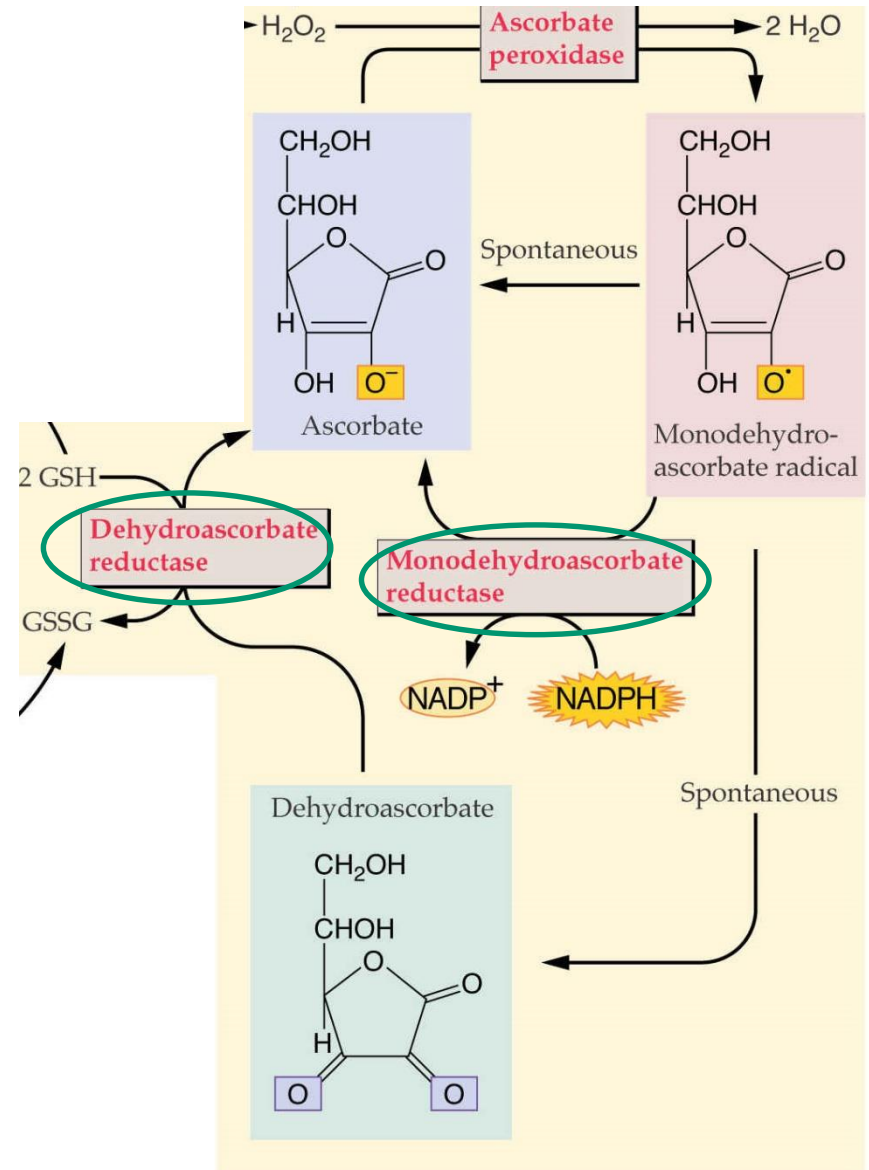
MDHAR – monodehidroaskorbat reduktaza

DHAR – dehidroaskorbat reduktaza

DHA – dehidroaskorbat

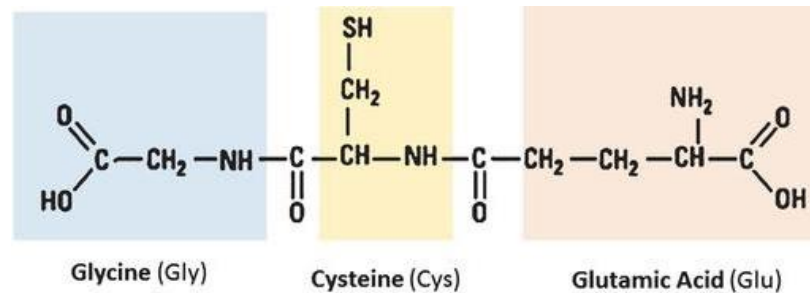
GSH – glutation (reducirani)

GSSG – glutation (oksidirani)



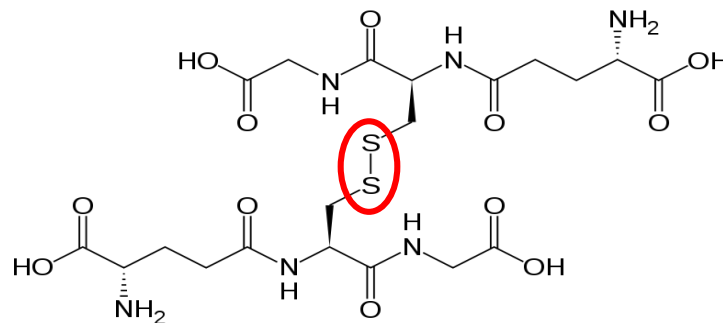
GLUTATION

GSH



reducirani glutation (tripeptid, γ -glutamil cisteinil glicin)
sa slobodnom sulfhidrilnom grupom

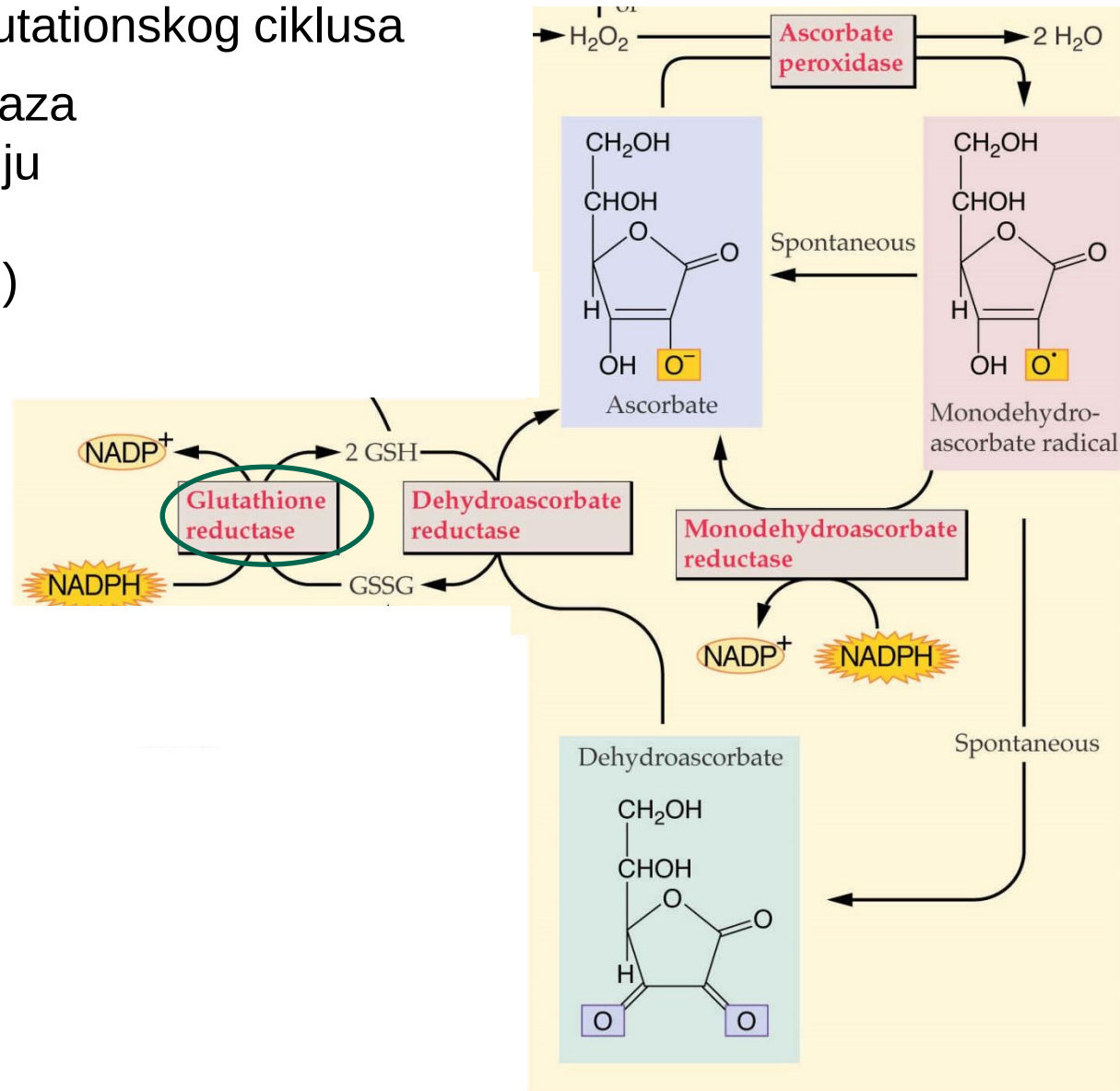
GSSG



oksidirani oblik glutationa

GLUTATION REDUKTAZA (GR)

- ključni enzim askorbat-glutationskog ciklusa
- flavoprotein oksidoreduktaza
- koristi NADPH za redukciju GSSH u GSH
- reducirani glutation (GSH) se koristi za regeneraciju AA iz MDHA i pri tome se prevodi u oksidirani oblik GSSH

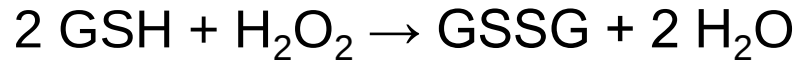


GSH – reducirani glutation
GSSH – oksidirani glutation

GLUTATION PEROKSIDAZA (GPX)

-koristi reducirani glutation (GSH) i tioredoksin kao donor elektrona

-prevodi H_2O_2 u H_2O (uz nastajanje GSSG)



te organske hidropersokside u H_2O i odgovarajuće alkohole



-u citosolu, mitohondrijima, kloroplastima i ER

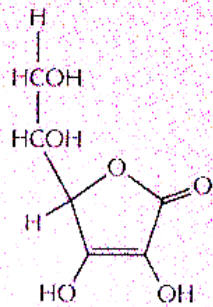
GVAJAKOL PEROKSIDAZA (G-POD)

- monomer, 40-50 kDa, sadrži hem
- citosol, vakuola, područje stanične stijenke, apoplast
- eliminira suvišak H_2O_2 i tijekom normalnog metabolizma i u stresnim uvjetima
- uloga: biosinteza lignina i odgovor na biotički stres (procesi u kojima se koristi H_2O_2) te u razgradnji IAA
- elektron-donori su aromatski spojevi poput gvajakola i pirogalola

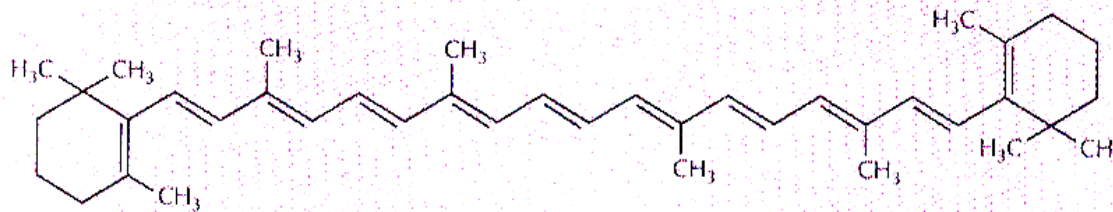
Antioxidant

Structure

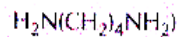
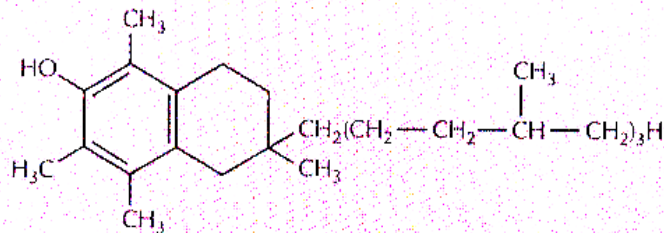
Subcellular location

Ascorbate
(vitamin C)

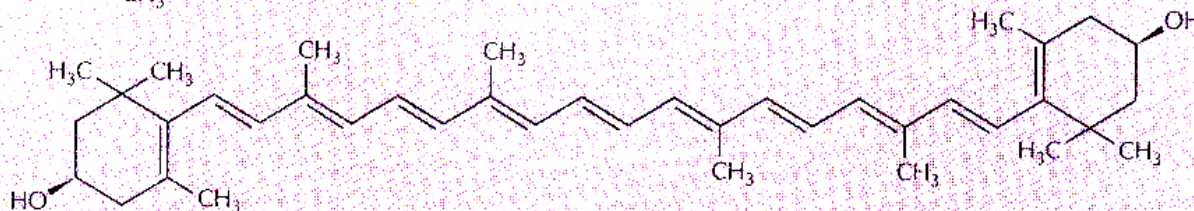
NEENZIMSKI ANTIOKSIDANSI

Apoplast, cytosol,
plastid, vacuole β -Carotene

Plastid

Glutathione,
reduced (GSH)Cytosol,
mitochondrion,
plastidPolyamines (e.g.,
putrescene,
shown here)Cytosol,
mitochondrion,
nucleus, plastid α -Tocopherol
(vitamin E)Cell membranes
(including
membranes of plastid)

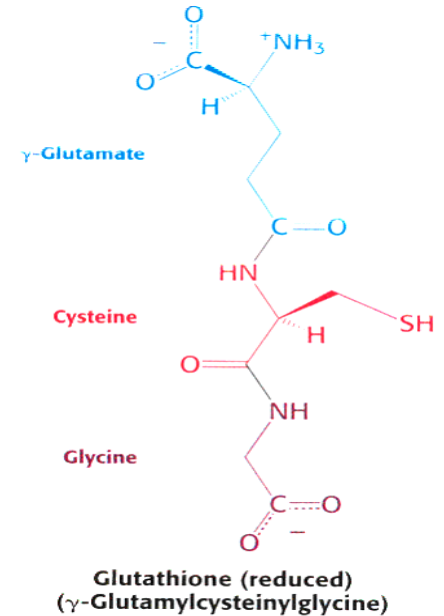
Zeaxanthin



Chloroplast

GLUTATION

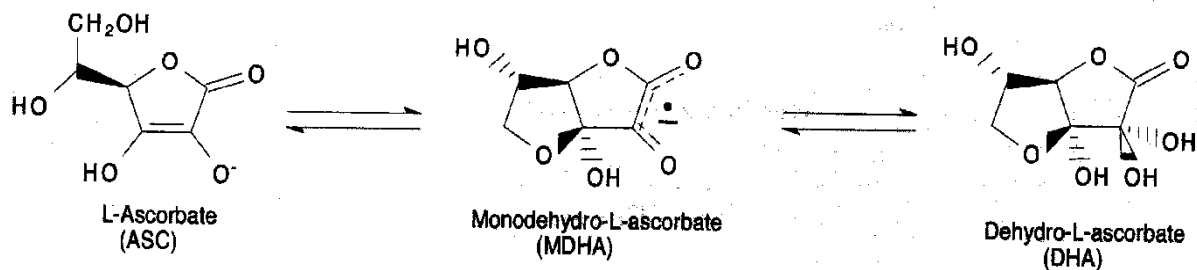
- u gotovo svim dijelovima stanice –
citosol, kloroplasti, mitohondriji, ER,
vakuola, peroksisomi, apoplast
- GSH reagira s H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$
- veže se uz mnoge biomolekule i na taj
način ih štiti
- uloga u regeneraciji AA pri čemu prelazi
u GSSG
- GSSG se reducira u GSH uz glutathion reduktazu
- reakcija GSH s H_2O_2 i organskim hidroperoksidima
(RO-OH) uz glutathion peroksidazu
- uloga GSH u procesu asimilacije sumpora, prijenosu sumpora kroz biljku,
biosintezi fitohelatina i uklanjanju ksenobiotika



ASKORBAT (VITAMIN C)

- u citosolu, kloroplastu, vakuoli, mitohondrijima i apoplastu
- kvantitativno dominantan antioksidans u biljnim stanicama (u zelenim tkivima obuhvaća 10% topivih ugljikohidrata)
- uloga u stanici: elektron-donor u enzimskim i neenzimskim reakcijama
- djeluje kao antioksidans neposredno ili posredstvom enzima APX
- neposredno (kemijski) reagira s H_2O_2 , $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ i ozonom,
- regenerira α -tokoferol iz njegovog radikala

Različiti redoks-oblici askorbata



TOKOFEROL (VITAMIN E)

- topiv u lipidima
- sintetiziraju ga samo fotosintetski organizmi
- grupa uključuje četiri izomera tokoferola (α , β , γ i δ)
- α -tokoferol - najčešći oblik i ima najvišu antioksidacijsku aktivnost

uloga: uklanjanje ROS i radikala nezasićenih masnih kiselina (nastalih lipidnom peroksidacijom)

KAROTENOIDI

- reakcija s produktima lipidne peroksidacije
- reakcija sa singletnim kisikom
- reakcija s tripletnim klorofilom (sprečava nastajanje $^1\text{O}_2$)
- rasipanje suviška energije u ksantofilskom ciklusu

FLAVONOIDI

- specijalizirani metaboliti – više uloga u biljci (obojenost cvjetova i plodova, obrana od patogena, uklanjanje ROS...)
- umanjuju učinak $^1\text{O}_2$ na fotosintetski aparat

PROLIN

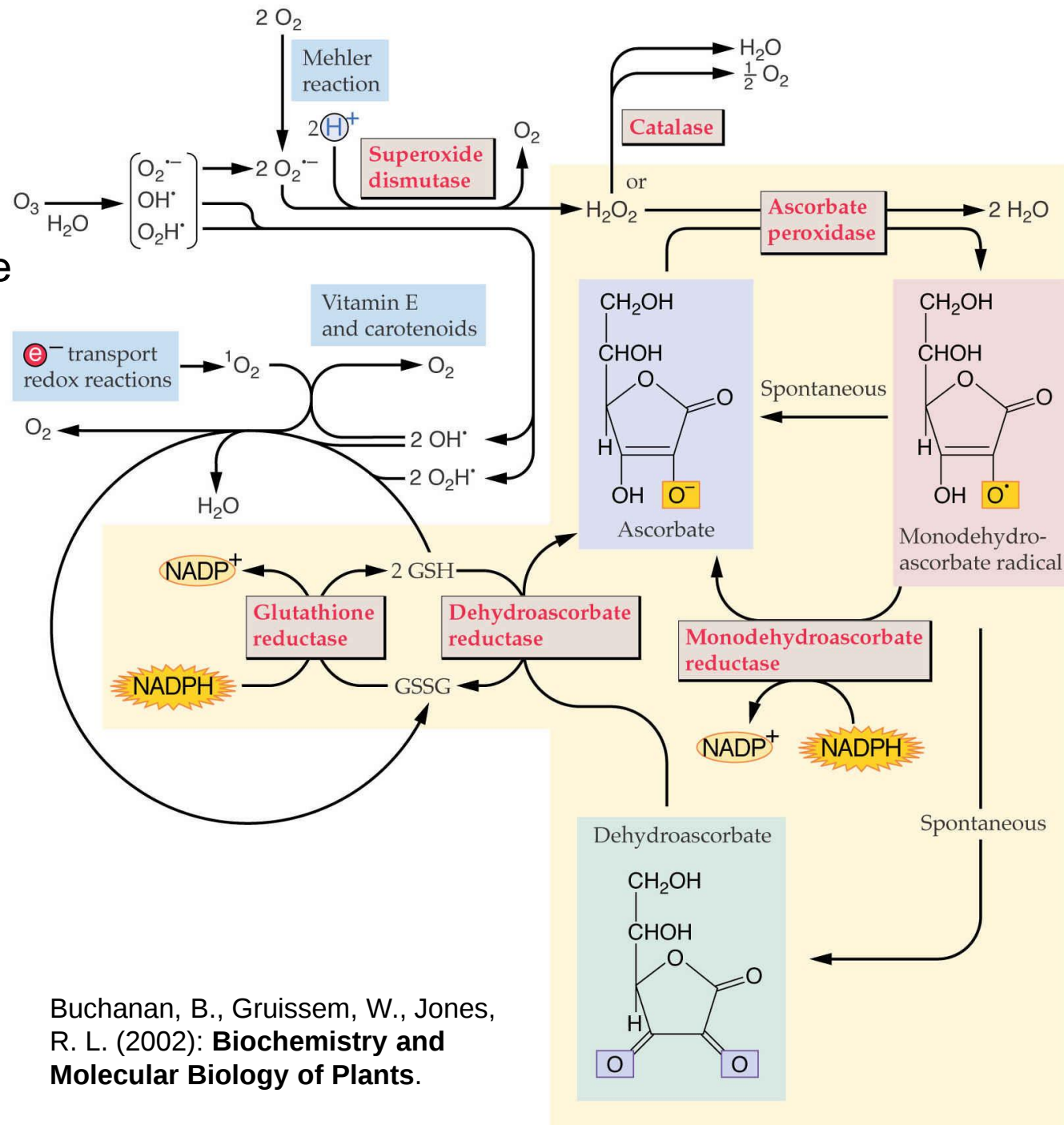
- učinkovito uklanja $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ i umanjuje oštećenja nastala djelovanjem lipidnih peroksida

PRIMJERI ROS I NAČIN UKLANJANJA

ROS	ENZIMSKI ANTIOKSIDANS	NEENZIMSKI ANTIOKSIDANS
$^1\text{O}_2$		β -karoten, tokoferol, prolin
H_2O_2	katalaza, MDHAR, DHAR, GPX, G-POD	GSH, askorbinska kiselina
$\text{O}_2^{\bullet-}$	SOD	
$\text{HO}^{\bullet}$		prolin, askorbinska kiselina, tokoferol

Antioksidacijski sustav u biljaka

-raspodjela u stanične kompartimente



Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2002): **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.**

TOLERANCIJA OKSIDACIJSKOG STRESA

- povećana sinteza antioksidansa i pojačana aktivnost antioksidacijskih enzima u uvjetima oksidacijskog stresa
- inicijalni signal su ROS
- slijedi porast konc. Ca u citosolu (sekundarni glasnik), djeluje putem Ca-vezujućih proteina poput kalmodulina
- aktivnost fosfolipaza koje produciraju fosfatidnu kiselinu (PA)
- Ca i PA aktiviraju protein-kinaze i kaskadu MAPK, što rezultira u modulaciji djelovanja transkripcijskih faktora
- promjena ekspresije gena za enzime uključene u sintezu antioksidansa te antioksidacijske enzime
- kontrola koncentracije iona Fe, Cu i Mn provodi se njihovim vezanjem uz helatore (npr. citrat) i uz metalošaperone
- smanjanje nastanka HO• koji nastaje Fentonovom reakcijom



Procjena (mjerjenje) oksidacijskog stresa u biljaka:

- mjerjenje količine ROS – direktnim i indirektnim metodama
- mjerjenje nastajanja oksidiranih staničnih sastojaka, molekula koje se sintetiziraju kao odgovor na stres...
- mjerjenje antioksidacijskog odgovora