Jasmonska i salicilna kiselina - biosinteza i funkcija u biljaka

UVOD

Jasmonska i salicilna kiselina male su lipidne molekule koje vode biljku kroz dvije potpuno različite strategije. Jasmonska kiselina je hormon rane i obrane, dok je SA hormon pamćenja i otpornosti. Njihova biosinteza je međusobno nepovezana, ali se funkcije isprepliću.

JASMONSKA KISELINA

Jasmonska kiselina i jasmonati

Jasmonska kiselina (JA) i spojevi povezani s njom (najčešće njeni konjugati) zajedno se zovu **jasmonatima**. Prvobitno su bili izolirani kao **inhibitori rasta biljaka** (i to iz kulture gljiva *Botryodiplodi theobromae*), ali kasnije se otkrilo da imaju i mnoge druge uloge u biljnim tkivima. Od najznačajnijih jasmonata, osim JA, izdvajaju se **metil jasmonat** koji je induktor sencencije u mnogim biljnim tkivima, 12-O-β-glukozid od tuberonske kiseline koji je faktor iniciranja gomolja kod krumpira. JA i metil-jasmonat su najčešće forme kod izolacije ukupnih jasmonata iz biljnih tkiva. Oni se pojavljuju kao **stereoizomeri** (nestabilni oblik je (+)-7-jasmonska kiselina koja prelazi u (-)-JA zbog tautomerizacije enolne grupe na C6 položaju). Kad se JA podvrgne amidnoj **konjugaciji s izoleucinom (Ile)** ili drugim aminokiselinama, **nastaje jasmonil-izoleucin (JA-Ile)** odnosno drugi konjugati jasmonil-ak. **JA-Ile je aktivan hormon u signalnom putu** jasmonata (kasnije objašnjeno). Kad bi se uspoređivali sa animalnim organizmima, jasmonati su prema svojoj strukturi vrlo slični **prostaglandinima** (hormonima sisavca), a zajedničko im je da se sintetiziraju iz masnih kiselina.

Biosinteza

Svi jasmonati sintetiziraju se iz **α-linolenske kiseline** (C18 polinezasićena masna kiselina) iz **lipida na plastidnoj membrani**. Djelovanjem enzima *lipaze*, iz membrane se oslobađa α-linolenska kiselina koju odmah unutar istog plastida enzim *13-lipoksigenaza* pretvara u 13-hidroperoksilinolensku kiselinu (uvela je kisik). Slijedeći korak, neki autori ga nazivaju i ključnim (jer nepovratno usmjerava taj spoj isključivo prema sintezi jasmonata), je pretvorba 13-hidroperoksilinolenske kiseline u 12,13(S)-epoksilinolensku kiselinu. Ovdje je bitan enzim *alen-oksid sintaza (AOS)* koji je specifičan samo za plastide i za razliku od većine plastdnih enzima koji djeluju kao monooksigenaze AOS ne zahtjeva kisik (tako nije oksidaza), niti zahtjeva NADPH niti P450 reduktazu (dakle ušteda stanične energije i resursa i neovisnost o transportnom lancu elektrona). 12,13(S)-epoksilinolenska kiselina je nestabilna i odmah se ciklizira djelovanjem *alen-oksid ciklaze (AOC)* u 12-okso-fitodienoinsku kiselinu (**OPDA**). AOC je enzim lokaliziran u plastidu (nosi amino terminalnu plastidnu ciljnu sekvencu).
Druga faza sinteze jest u **peroksisonu**. Sintetizirana **OPDA** prvo se izvozi iz plastida (nije u potpunosti razjašnjen mehanizam), a zatim se uvozi u peroksisom (ovisno o transportnim proteinima) gdje se daljnje mahanički obrađuje (redukcije i skraćivanje lanaca). Kada OPDA uđe u peroksisom, prvo se odvija redukcija pomoću *OPDA reduktaze (OPR)* u međuprodukt OPC-8:0 (u 3-okso-2-(cis-2'-pentenil)ciklopentan-1-oktanska kiselina). Nakon toga OPC-8:0 se aktivira pomoću *karboksil-CoA ligaze* i slijede tri kruga **β-oksidacije** (u kojima se lanac masne kiseline skraćuje).
Treća faza sinteze jest u **citosolu**, gdje se događa konačno oblikovanje i aktivacija. Proizvod nakon tri ciklusa β-oksidacije jest (+)-7-izo-jasmonska kiselina. Tu spontano **izomerizira.** Prava **aktivacija signalna** dolazi tek kad se JA **konjugira** s Ile (djelovanjem enzima JAR1; jasmonil-aminokiselinska sintetaza). JA-Ile je molekula koja je sposobna ući u jezgru i pokrenuti ekspresiju obrambenih gena.

Metabolizam

Kroz razne reakcije modifikacije JA u citosolu prelazi u različite produkte. Već je rečeno prethodno da je jedan od tih oblika **JA-Ile.** To je **signal (molekula koja prenosi informaciju)** te potiče **uključivanje gena za obranu koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u obrani** (kasnije objašnjeno). Uloga JA-Ile jest vezanje za *JAZ proteine* (koji djeluju kao *molekularne kočnice* kad nema napada ni JA-Ile signala za držanje gena u *OFF stanju*) negativne regulatore obrane. Kada JA-Ile **dođe** kao signal djeluje kao *molekularno ljepilo* koje **povezuje JAZ proteine sa COI1** što onda pokreće proces **ubikvitinacije JAZ proteina** u 26S proteasomu. Postavlja se pitanje zašto ovo ne radi sama JA ili neki drugi metabolit. Odgovor je u strukturi koju ima JA-Ile naspram ostalih jasmonata (ne može djelovati kao ljepilo).
Ostali konjugati koju nastaju su **hlapljivi metil-jasmonat** (pomoću SAM ovisne karboksilne metiltransferaze) koji djeluje kao **zračni signal u komunikaciji između biljaka** (oslobađa se kao odgovor na ozljede i druge abiotske stresove). **Tuberonska kiselina** inducira **tvorbu gomolja u krumpiru**, a transportira se u obliku glukozida.

Uz metabolizam, potrebno je spomenuti i spoj **koronatin (CO)** koji je bakterijski toksin (f**itotksin** kojeg proizvode patogene bakterije) koji **aktivira** signalizaciju jasmonata. **Strukturno je sličan s JA-Ile** pa se ponaša kao *molekularni mimik JA-Ile***. In vitro CO veže izravno kompleks COI1-JAZ** učinkovitije od JA-Ile pa samim time može i smanjivati učinkovitost obrambenog puta ovisnog o ovom metabolitu.

Uloge u biljkama

1. **Jasmonati inhibiraju procese rasta u mnogim biljnim tkivima**
   Egzogeno dodana JA inhibira klijanje sjemena i peluda, usporava rast korijena. Visoki sadržaj JA u vegetativnim tkivima koja su ponori (engl. *sinks,* spremišna tkiva koja nakupljaju rezerve proteina) regulira nakupljanje rezervnih proteina.
2. **Bitni su za reproduktivni razvoj**
   Mutanti *Arabidopsisa* koji imaju defektnu sintezu JA ili odgovor na JA su muški sterilni. Plodnost se može obnoviti dodatkom egzogene JA. Dodatno, ima ulogu u koordinaciji vremena rasta i razvoja cvjetnih organa (izduživanje prašnika iznad položaja njuške, pucanje prašnika u vrijeme otvaranja cvijeta, vitalnost peluda).
3. **Otpornost na patogene**
   Biljke nakupljaju JA i njegove derivate kada su ozlijeđene ili tretirane elicitorima podrijetlom od patogena (oligosaharidima). Egzogeni tretman JA aktivira ekspresiju stotina gena povezanih s obranom (npr. onih koji kodiraju za antifugalne proteine, tvari koji odbijaju hranjenje, fitoaleksine hlapljive spojevi koji privlače predatorske kukce), te smanjuje ekspresiju gena koji kodiraju enzime uključene u rast i primarni metabolizam (npr. fotosinteza – za iskorištavanje resursa za obranu).

Upotreba

Metil-jasmonat dobro je poznat u industriji parfema kao mirisna komponenta eteričnih ulja jasmina, dok je odobren kao i aroma u hrani. Često se nalazi u jasminu, paprenoj metvici i čaju. Na ostalim jasmonatima provode se istraživanja koja bi mogla koristiti ljudima, u eksperimentima pokazuju protuupalna i antitumorska svojstva kao i mogućnost obnavljanja epiderme što bi pomoglo smanjenju izgleda starenja.

SALICILNA KISELINA

S druge strane, salicilna kiselina daleko je poznatija po svojim ljekovitim svojstvima nego po regulatornim ulogama u biljkama. Najznačajnija regulatorna uloga SA u biljkama je u termogenezi i u odgovoru biljaka na patogene.

Biosinteza

Biosinteza salicilne kiseline (SA) nije linearna kao što je bila biosinteza JA. Biljke su razvile **nekoliko različitih biosintetskih puteva**, od kojih su najznačajnija dva, za sintezu iste molekule. Prvi **put je ovisan o benzojevoj kiselini (BA put)**, dok je drugi **ovisan o korizmatu (ICS put).** Njihov relativni doprinos značajno varira među biljnim vrstama i ovisi o vrsti i jačini stresnog podražaja.

1. **Put (BA-ovisan put ili fenilpropanoidni put)**
   Započinje u **citosolu,** gdje se iz bočne grane općeg *fenilpropanoidnog metabolizma* generira **trans-cimetna kiselina**. Ona se zatim pretvara u **benzojevu kiselinu (BA).** U tom putu slijede ciklusi β-oksidacije (i prema novim spoznajama ključni korak koji ograničava brzinu reakcije jest pretvorba intermedijera cimeliol-CoA). Posljednji korak ovog puta je pretvorba BA u SA što katalizira enzim *BA 2-hidroksilaza* (BA2H). Za ovaj enzim koji je ponovno monooksigenaza ponovno vrijede neke iznimke – on je topiv protein (za razliku od tipičnih P450 koji su vezani za membranu).
2. **Put (put ovisan o izokorizmatu ICS put)**
   Ovaj put započinje u **plastidu** (najčešće kloroplastu) gdje se iz **korizmata** (koji je međuprodukt *šikimatskog puta*) pomoću enzima *izokorizmat sintaze (ICS)* u bakterijama (ali u biljkama se još uvijek ne zna analogan enzim) pretvara u **izokorizmat.** Sljedeći korak je pretvorba izokorizmata u **SA i piruvat** što u bakterijama katalizira enzim *izokorizmat piruvat lijaza (IPL)*.

Pitanje koji put prevladava – ovisi o biljci i stresu. Istraživanja su pokazala da nakon izlaganja *ozonu* kod duhana dominaciju ima BA-ovisni put, dok kod izlaganja istome kod *Arabidopsisa* ima put ovisan o korizmatu. Ova razlika može objasniti i zašto neke biljke mogu brže i učinkovitije odgovoriti na različite patogene i abiotske stresove.

Derivati

Najznačajnija modifikacija SA je nastanak **metil salicilata (MeSA)** koji nastaje metilacijom karboksilne skupine SA djelovanjem *karboksilne metiltransferaze* koja koristi SAM (S-adenozilmetionin) kao donora metila. Važan je jer je **hlapljiv i smatra se ključnim pokretnim signalom u sistemski stečenoj otpornosti (SAR)** obrambenog mehanizma koji će biti opisan nešto kasnije. Ključni enzim ovdje je i *MeSA esteraza* jer ona pretvara MeSA natrag u SA što je nužno za signalizaciju u listovima. Osim MeSa metaboliti su i SA 2-O-β-glukozid (SAG) i SA β-glukozil ester (SGE) čiji nastanak kataliziraju UDP-Glc-ovisne glukoziltransferaze.

Uloge

1. **Usporava starenje latica**
   Topive tablete aspirina u vodi sadrže acetilsalicilnu kiselinu se pretvara u SA, tako da se dodavanjem aspirina u vazu s vodom u kojoj se nalazi rezano cvijeće usporava starenje latica i produljuje trajanje cvijeća. To je vjerojatno posljedica smanjene brzine biosinteze etilena, s obzirom na izvješća da SA blokira pretvorbu ACC-a u etilen.
2. **Potiče cvatnju**
   SA također potiče cvatnju u vodenim lećama kada se te biljke dugog dana uzgajaju pod neinduktivnim fotoperiodom kratkog dana (taj učinak nije specifičan, jer i srodni fenolni spojevi mogu potaknuti cvatnju u tih i drugih vrsta).
3. **Regulira termogenezu kod ljiljana**
   Prvi jasni dokaz da endogena SA ima regulatornu ulogu je termogeneza kod vudu ljiljana (*Sauromatum guttatum*). Umjesto uobičajenog citokromskog prijenosa elektrona, mitohondriji preusmjeravaju elektorne na alternativni put uz pomoć alternativnih oksidaza. Energija se pritom ne pohranjuje kao ATP nego se oslobađa kao toplina. No, aktiviraju se i glikoliza i Krebsov ciklus kako bi se osigurali supstrati ostali. Na dan otvaranja cvijeta gornji spadiks proizvodi toplinu koja se diže za 14℃ u odnosu na okolinu te ispušta mirise koji privlače kukce (prijepodne). Navečer kreće drugi val u donjem spadiksu gdje se temperatura diže za 10℃. Puno godina se nije znalo koja je tvar koja pokreće lanac prijenosa topline. Prvo se je pretpostavljalo da je to kalorigen, dok se nije otkrilo da je to SA kiselina čija endogena razina se poveća prije oba vala termogeneze. SA aktivira alternativne oksidaze u mitohondrijima (inhibicijom kompleksa u elektronskom lancu ili indukcijom AOX gena na razini transkripta).
4. **Proizvodnja salicilne kiseline povezana je s otpornošću na bolesti**
   Hipersenzitivni odgovor (HR) je lokalizirani obrambeni mehanizam koji biljka aktivira na mjestu prodora patogena tako da žrtvuje nekoliko vlastitih stanica oko točke infekcije (dolazi do *programirane stanične smrti* čime nastaju *nektrotične lezije*). Te lezije su fizička barijera koja sprječava daljnje širenje patogena. Iako je reakcija lokalizirana pokreće signalizaciju prema ostatku biljke. Ta signalizacija će nakraju biti objašnjena u kontekstu SAR. PR proteini su proteini koje biljka sintetizira kao izravan odgovor na infekciju, najpoznatije su β-1,3-glukanaze i hitinaze. SA ima ključnu ulogu u prijenosu signala koja dovodi do aktivacije *gena za PR* te do uspostavljanja prvo HR, a zatim i SAR. Dokazano je u eksperimentima gdje su listovi tretirani sa SA nakupljali PR proteine. Važno je napomenuti da SA nije primarni signal koji putuje na velike udaljenosti. Lokalna infekcija pokreće proizvodnju neidentificiranog pokretnog signala koji u distalnim tkivima potiče nakupljanje SA za SAR.

Upotreba

1. **Priča o aspirinu**

Već u 4. st. pr. Kr. Ljudi su otkrili da kora vrbe, mirte i topole može ublažiti bolove (kod groznica i upala). U 19. stoljeću tvar koja ima taj djelotvorni učinak je otkrivena i izolirana – salicilna kiselina. Ubrzo je uslijedila i kemijska sinteza iste u Njemačkoj što je ušlo u komercijalnu proizvodnju. No, zbog gorkog okusa i izazivanja želučanih smetnji, farmaceutska tvrtka Bayer sintetizirala je njen acetilat*, acetilsalicilnu kiselinu* koja je dobila i komercijalno ime aspirin, a nema navedene nuspojave. Danas se koristi za ublažavanje prehlade, glavobolje, groznice i

reumatoidnog artritisa, ali pripisuje se i za prevenciju srčanih udara i cerebralne tromboze jer aspirin usporava proizvodnju prostaglandina, tvari koja potiče zgrušavanje krvi. Važno je napomenuti da aspirin ipak nije siguran za primjenu kod djece, pogotovo tijekom virusnih infekcija zbog rizika od razvoja Reyeovog sindroma koji uzrokuje oticanje mozga i zatajenje jetre (aspirin oštećuje mitohondrije što blokira ciklus uree i β-oksidaciju masnih kiselina dovodeći do nakupljanja toksičnih tvari u tijelu).

2. Priča o aknama

Akne vulgaris (AV) jedan su od najčešćih dermatoloških problema, a nastaju zbog međudjelovanja nekoliko čimbenika: prekomjerne proizvodnje sebuma, folikularne hiperkeratinizacije (zadebljanje i začepljenje pora), mikrobne kolonizacije i upale. SA je našla svoje mjesto u liječenju akni zato što djeluje na više uzroka istovremeno. Zahvaljujući svojoj lipofilnosti prodire u folikule ispunjene sebumom gdje *otapa keratinizarane naslage* i *smanjuje komedogenu aktivnost* (nastanak mitesera). Na molekularnoj razini SA djeluje tako da izvlači dezmosome (koji drže mrtve stanice kože zajedno) čime potiče ljuštenje (što može biti problem kod suhe kože pa se zato SA često kombinira u obliku gela). Istovremeno, *inhibira signalni put za proizvodnju lipida* u stanicama lojnicama (smanjuje proizvodnju sebuma u izovru) te *inhibira upalni signalni put* (može objasniti protuupalna svojstva).

„Imunosni sustav“ biljaka

Za kraj, nekoliko riječi o načinima kojima biljka sprječava napade patogena i od njih se štiti što bi se kod animalnih modela zapravo smatralo imunosnim sustavom, no biljke nemaju isti.

Nekoliko minuta nakon napada patogena aktiviraju se obrambeni mehanizmi u napadnutom tkivu (lokalni odgovor), dok se nekoliko sati nakon napada aktivira u udaljenim mjestima od napada (sistemski odgovor) te čak i u susjednim biljkama. Vrsta sistemskog odgovora ovisi o vrsti patogena (onaj od gljiva, bakterija i virusa razlikuje se od odgovora na napade insekata, dok oblići induciraju kombinacije dvaju odgovora, a posebni je induciran i kod nepatogenih bakterija kod kolonizacije korijena). Značenje sistemskog odgovora je omogućavanje i specifično reagiranje biljke na ponovni napad određenog patogena.

SAR = SISTEMSKI STEČENA REZISTENCIJA (engl. *systemic acquired resistance*)

Takav tip odgovora aktiviraju gljive, bakterije i virusi. Za njegovu aktivaciju inicijalna infekcija mora rezultirati u stvaranju **nekrotičnih lezija (koje nastaju kao dio HR).** Temelji se na **indukciji PR proteina u udaljenim biljnim tkivima**. Endogeni signal je SA. Mehanizam: lokalna nekroza na mjestu napada potiče *lokalno povećanje i akumulacije SA* – to je onda signal koji se prenosi *floemom* (druga signalna molekula je i H_2O_2). U udaljenim (nenapadnutim) dijelovima biljke se onda pod utjecajem SA potiče sinteza PR. Što se tiče drugih biljaka postoji i hlapljivi metilni ester SA (metil-salicilat) koji kao signal djeluje na druge dijelove biljaka ali pokreće i mehanizme otpornosti.

ISR = INDUCIRANA SISTEMSKA REZISTENCIJA (engl. *induces systemic resistance*)

Induciraju je **nepatogene bakterije** koje *koloniziraju korijen* (rizobiji koji fiksiraju dušik). **Ne ovisi o SA i PR**, ali se ostvaruje uz **JA i etilen** te *regulatorni protein NPR1* (on sudjeluje i u SAR što onda sugerira da bi mogla postojati mogućnost konvergiranja SAR i ISR u nekim kasnijim dijelovima signalnog puta). Nema indukcije i akumulacije PR.

SWRPS and PIs = SISTEMSKI ODGOVOR NA NAPAD INSEKATA I RANJAVANJE

Insekti mehanički oštećuju biljno tkivo što dovodi do **brze akumulacije PI** (engl. *Systemic proteinase inhibitors*) i drugih **proteina specifičnih za odgovor na ranjavanje** (**SWRPs**, engl. *systemic wound response proteins*). Isti odgovor javlja se kod bilo kojeg *mehaničkog ranjavanja tkiva*. *Oblići* koji ranjavaju korijen *induciraju kombinaciju SAR i PI/SWRP* odgovora. Tijekom ovog odgovora javljaju se velike koncentracije **oligogalakturonida** koji se *oslobađaju iz oštećenih staničnih stjenki* i induciraju pojavu PI i SWRPova, ali proteini *ne odlaze* u druge dijelove biljke. Nego to radi **sistemin** (peptid od 18 aminokiselina) *koji se prenosi floemom* u druge dijelove biljke *i inducira gene za PI/SWRP*. Sistemin u ciljnom tkivu **aktivira produkciju JA** koja tada *inducira traskripciju gena za PI/SWRP* (uz JA potreban je i etilen koji se akumulira nakon ulaska sistemina u floem). *Odgovor na ranjavanje blokiran je sa SA (PI/SWRP se ne induciraju za vrijeme SAR).*