

Uloga reaktivnih kisikovih oblika u odgovoru biljaka na stresne uvjete

Vojvodić, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:796408>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**ULOGA REAKTIVNIH KISIKOVIH OBLIKA U ODGOVORU
BILJAKA NA STRESNE UVJETE**

**THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PLANTS'
RESPONSE TO STRESS**

ZAVRŠNI RAD

Jelena Vojvodić

Preddiplomski studij Molekularne biologije

Mentor: prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu,
pod voditeljstvom prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek.

SADRŽAJ:

1. Uvod	1
2. Reaktivni kisikovi oblici.....	1
2.1. Vrste reaktivnih kisikovih oblika i njihov nastanak u stanici.....	1
2.2. Održavanje oksidacijsko-redukcijskog stanja stanice.....	2
3. Građa i regulacija enzima RBOH	4
3.1. Detaljan opis građe	4
3.2. Uloga kalcijevih iona u regulaciji aktivnosti RBOH	5
3.3. Regulacija AtRBOH	7
4. Signalni putevi koji su aktivirani pod utjecajem biotičkih i abiotičkih stresnih čimbenika.....	8
4.1. Kompleks PRR prepoznaje PAMP.....	8
4.2. Uloga ROS u djelovanju ABA.....	9
5. Interakcija ROS sa staničnim proteinima i lipidima.....	11
5.1. ROS i post-translacijska modifikacija proteina.....	11
5.2. ROS, lipidna peroksidacija i HR	12
5.3. ROS i epigenetička modifikacija	13
5.4. Metoda OxiTRAQ.....	13
6. Zaključak.....	15
7. Literatura	16
8. Sažetak	21
9. Summary.....	21
Životopis.....	22

POPIS KRATICA

ABA – abscizinska kiselina

AtCPK5 – kinaza ovisna o kalciju u vrste *Arabidopsis thaliana*

AtRBOH – enzim NADPH oksidaza vrste *Arabidopsis thaliana*, engl. *respiratory burst oxidase homolog*

BAK1 – engl. *BR1-associated kinase*, **BRI1** – engl. *brassinosteroid insensitive 1*

BIK1 – proteinska kinaza BIK1, engl. *botrytis-induced kinase*

CPK – kinaza ovisna o kalciju

elf18 – epitop molekule EF-Tu od 18 aminokiselina

flg22 – konzervirani peptid koji je dio bakterijskog flagelina

FLS2 – engl. *flagellin-sensing 2*

GUS – β -glukuronidaza

HDA9 i HDA19 – histonske deacetilaze

HR – hipersenzitivni odgovor, engl. *hypersensitive response*

Hsp – protein toplinskog šoka, engl. *heat shock protein*

LRR – ponavljajući sljedovi bogati leucinom, engl. *leucin-rich repeat*

OST1 – proteinska kinaza OST1, engl. *open stomata 1*

PAMP – molekularni uzorci koji potječu od patogena, engl. *pathogen-associated molecular patterns*

PR – proteini koji se induciraju u biljci pri napadu patogena, engl. *pathogenesis-related*

PRR – receptori za prepoznavanje molekularnih uzoraka patogena, engl. *pattern recognition receptors*

PYR – engl. *pyrabactin resistance*

RBOH – enzim NADPH oksidaza, engl. *respiratory burst oxidase homolog*

ROS – reaktivni kisikovi oblici, engl. *reactive oxygen species*

SLAC1 – engl. *slow anion channel-associated 1*

SnRK2s – engl. *sucrose non-fermentable related kinases*

SOD – superoksid dismutaza

1. Uvod

Reaktivni kisikovi oblici (ROS) nastaju primarno kao nusprodukti aerobnog metabolizma. Budući da imaju toksičan učinak, u biljnim stanicama razvijeni su brojni mehanizmi kontrole njihove količine (Hasanuzzaman i sur., 2020). Međutim, osim prevladavanja štetnog učinka ROS, biljne stanice također su stekle prilagodbe koje im omogućuju da koriste ROS kao signalne molekule tijekom razvojnih procesa te u odgovoru na stresne čimbenike (Mittler i sur., 2011). Sinteza ROS pomoću NADPH oksidaze u apoplastu jedan je od ključnih odgovora biljnih stanica nakon primanja stresnog signala. Velika se važnost pripisuje regulaciji proizvodnje ROS pomoću NADPH oksidaze, kojom se osiguravaju sekundarni glasnici za daljnji prijenos signala i stjecanje otpornosti na stres (Qi i sur., 2017). ROS dovode do raznih promjena, od kojih su vrlo značajne epigenetička modifikacija i utjecaj na sastav proteina biljne stanice. Posljedično, njihov utjecaj dovodi do promjene ekspresije gena i pokretanja kaskade odgovora u biljci koja će osigurati toleranciju stresnog čimbenika (Liu i sur., 2015).

2. Reaktivni kisikovi oblici

2.1. Vrste reaktivnih kisikovih oblika i njihov nastanak u stanici

Reaktivni kisikovi oblici (ROS) su djelomično reducirane kisikove jedinice, a mogu biti slobodni radikali i/ili molekule (Su i sur., 2019). ROS koje u stanici nalazimo u ionskom obliku, tj. u obliku radikala su hidroksilni radikal ($\text{OH}\cdot$) i superoksidni anion (O_2^-), dok se u molekularnom obliku nalaze vodikov peroksid (H_2O_2) i singletni kisik ($^1\text{O}_2$). Svaki pojedini ROS ima određeni kapacitet oksidacije i stoga utječe na različite fiziološke i biokemijske reakcije u stanici (Huang i sur., 2019). ROS se smatraju neizbježnim nusproduktom aerobnog metabolizma od pojave fotosintetskih organizama koji produciraju kisik (Choudhury i sur., 2017). Singletni kisik nastaje u fotosustavu II (PSII) kloroplasta i, zbog visoke reaktivnosti, može značajno utjecati na fotosintezu. (Huang i sur., 2019). Superoksidni anion može nastati kao nusprodukt u fotosintetskom lancu prijenosa elektrona u kloroplastu i u dišnom lancu prijenosa elektrona u mitohondriju te djelovanjem NADPH oksidaza koje su vezane za staničnu membranu (Huang i sur., 2019). Enzimskom konverzijom se iz superoksidnog aniona vrlo brzo dobiva vodikov peroksid, a potom se, cijepanjem dvostruke veze između dvaju kisika, iz vodikovog peroksida može dobiti hidroksilni radikal (Bose i sur., 2014).

Unatoč činjenici da ih smatramo nusproduktima i štetni su za žive stanice, ROS imaju važnu ulogu u

biljnoj fiziologiji, primjerice u toleranciji biotičkih i abiotičkih stresnih uvjeta te u razvojnim procesima i staničnoj signalizaciji (Liu i He, 2016). ROS su vrlo dobre i važne signalne molekule iako su pri višim koncentracijama toksične radi čega su biljne stanice morale evolucijski razviti prilagodbe kojima mogu podnositi njihov toksičan učinak (Mittler i sur., 2011). U svrhu kontrole toksičnog učinka ROS koji bi u nekontroliranim uvjetima doveo do oksidativnog stresa i oštećenja, biljne stanice su razvile niz detoksifikacijskih mehanizama (Choudhury i sur., 2017).

2.2. Održavanje oksidacijsko-redukcijskog stanja stanice

Redoks stanje stanice nema jedinstvenu definiciju, ali smatra se sumom reducirajućih i oksidirajućih redoks-aktivnih molekula te redoks potencijala stanice. Redoks stanje stanice povezano je sa staničnom homeostazom, osobito u slučaju redoks događaja, kao što je oksidativni stres. Kontrola redoks stanja stanice nije povezana isključivo s odgovorom na stres, već ima temeljnu ulogu u svakoj živoj stanici (Potters i sur., 2010). ROS svojom interakcijom s redoks-aktivnim tvarima mijenjaju oksidacijsko-redukcijsko stanje te su stoga stanice razvile mehanizme njihove kontrole i razgradnje pomoću antioksidacijskog sustava.

Antioksidans je bilo koja tvar koja, kada je prisutna u niskoj koncentraciji u odnosu na supstrat podložan oksidaciji, značajno odgađa i/ili sprječava oksidaciju tog supstrata (Halliwell, 1995). U užem, biološkom smislu, antioksidans je bilo koja organska tvar sa sposobnošću neutralizacije negativnog učinka oksidacije (Gupta, 2015). Antioksidansi direktno ili indirektno reagiraju s ROS, odnosno kontroliraju njihovu produkciju. Sustav antioksidansa biljnih stanica sastoji se od neenzimskih i nekih enzimskih antioksidansa, navedenih u Tablici 1 (Hasanuzzaman i sur., 2020).

Tablica 1: Antioksidacijski sustav biljnih stanica (Preuzeto i prilagođeno prema Hasanuzzaman i sur., 2020).

Neenzimski antioksidansi	Enzimski antioksidansi
Askorbat	Superoksid dismutaza
Reducirani glutacion	Katalaza
Tokoferol (vitamin E)	Askorbat peroksidaza
Karotenoidi	Glutacion peroksidaza
Flavonoidi	Polifenol oksidaza
Alkaloidi	
Neproteinogene aminokiseline	

Askorbat sudjeluje u uklanjanju ROS zahvaljujući kapacitetu za doniranje elektrona, uslijed čega ostaje stabilan. Zajedno s reduciranim oblikom glutaciona tvori askorbat-glutacioni ciklus (AsA-GSH) koji služi uklanjanju ROS i održavanju stanične homeostaze (Hasanuzzaman i sur., 2020). AsA-GSH ciklus sastoji se od niza redoks reakcija čija je glavna uloga uklanjanje vodikovog peroksida uz regeneraciju reduciranih oblika askorbata i glutaciona (Hernandez i sur., 2017). Askorbat također regenerira tokoferol (vitamin E) koji štiti kloroplaste od oksidativne štete, uklanjajući uglavnom singletni kisik i hidroksilni radikal (Hasanuzzaman i sur., 2020).

Karotenoidi su važne neenzimatske antioksidativne molekule koje uklanjaju slobodne radikale čime štite sastavne dijelove fotosustava (Hasanuzzaman i sur., 2020). Flavonoidi imaju potencijal za neutralizaciju slobodnih radikala i time smanjuju stanično oštećenje uslijed lipidne peroksidacije (Hasanuzzaman i sur., 2020). Poznato je da uslijed abiotičkog stresa dolazi do povećanja ekspresije gena odgovornih za biosintezu flavonoida (Mehla i sur., 2017). Preostale neenzimske komponente antioksidativnog sustava navedene u Tablici 1 su alkaloidi koji uklanjaju slobodne radikale i sprječavaju oksidaciju uzrokovanu vodikovim peroksidom te neproteinogene aminokiseline¹ koje se također smatraju učinkovitim neenzimskim antioksidansima.

Osim neenzimskih, u Tablici 1 navedene su i enzimске komponente antioksidativnog sustava biljnih stanica. Superoksid dismutaza (SOD) pretvara superoksidni anion u vodikov peroksid čime smanjuje mogućnost nastanka hidroksilnog radikala (Gill i sur., 2015). Polifenol oksidaza nalazi se u tilakoidnim membranama kloroplasta i stoga može utjecati na fotosintezu (Hasanuzzaman i sur., 2020). Askorbat

¹ Neproteinogene aminokiseline (γ -aminomaslačna kiselina, ornitin, citrulin) su one koje organizmi koji ih proizvode ne inkorporiraju u proteine (Bell i sur., 2008).

peroksidaza se u biljnim stanicama nalazi u brojnim izooblicima – citosolna, mitohondrijska, kloroplastna, peroksisomalna/glioksisomalna. Kloroplastna askorbat peroksidaza jedini je enzim koji u kloroplastu uklanja vodikov peroksid jer katalaza nije prisutna (Pandey i sur., 2017). Glutation peroksidaza koristi reducirani oblik glutaciona za uklanjanje vodikovog peroksida te redukciju lipida i organskih hiperoksida (Hasanuzzaman i sur., 2020).

Regulacija razine ROS u stanici temelji se na dinamičnoj i mnogobrojnoj mreži gena koji kodiraju proteine odgovorne za njihovu produkciju i uklanjanje. Postojanje takvog složenog sustava kontrole ROS ukazuje na njihovu važnu ulogu u staničnoj signalizaciji, ali i visoku toksičnost za stanice (Harir i Mittler, 2009).

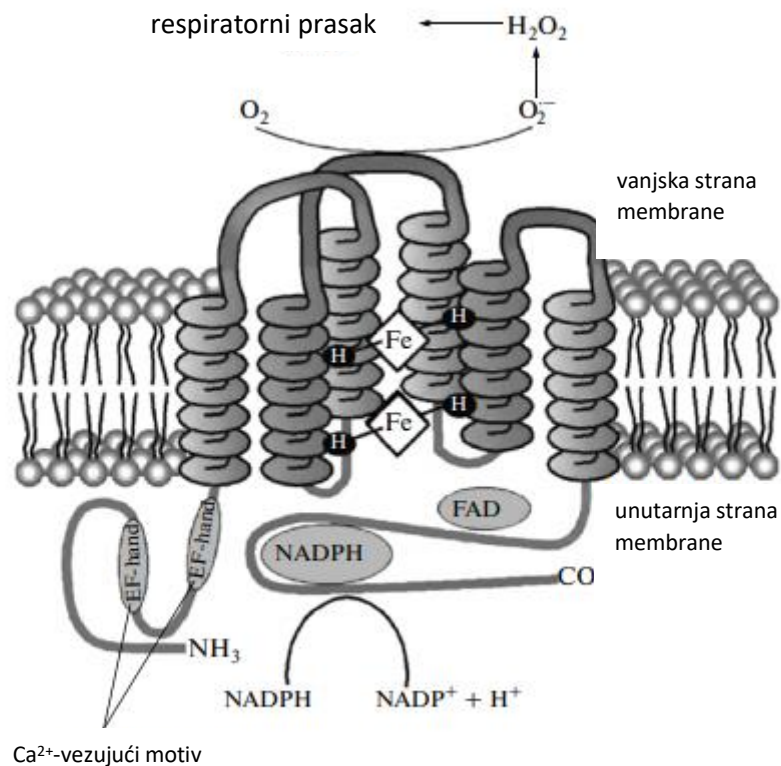
Uska povezanost ROS sa staničnom homeostazom i metabolizmom je upravo i svojstvo koje ih čini tako učinkovitim signalnim molekulama zato što i najmanja promjena homeostaze stanice dovodi do promjene stabilnog stanja razine ROS u određenim staničnim kompartmentima, a time i do promjene fiziološkog stanja stanice (Mittler i sur., 2011).

3. Građa i regulacija enzima RBOH

3.1. Detaljan opis građe

Enzim koji katalizira proizvodnju ROS, NADPH oksidaza, prvi je puta otkriven na plazma membrani fagocitnih animalnih stanica (Vermot i sur., 2021). U biljnim stanicama pronađene su o membrani ovisne NADPH oksidaze koje su, uslijed homologije s katalitičkim podjedinicama enzima pronađenih u stanicama sisavaca, dobile naziv RBOH – *respiratory burst oxidase homolog* (Kuar i Pati, 2018). Enzim katalizira sljedeću kemijsku reakciju: $\text{NADPH} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + 2 \text{O}_2^{\cdot -} + \text{H}^+$. Produkcijom ROS ovi enzimi doprinose imunološkom odgovoru u animalnim stanicama, odnosno signalizaciji u stresnim uvjetima u biljnim stanicama (Glyan'ko i Ischenko, 2010).

RBOH pripada skupini proteina čija aktivnost je modulirana kalcijevim ionima. Sadrži dva mjesta za vezanje kalcijevih iona koja se nalaze u tzv. *EF-hand* domeni na N-terminalnom kraju (Liu i sur., 2020). Dvije *EF-hand* domene zajedno su označene kao Ca^{2+} -vezujući motiv. *EF-hand* motivi karakteristični su, osim po vezanju kalcijevih iona, po tome što dolaze u paru i odvojeni su savitljivom omčom (Slika 1) (Lewit-Bentley i Rety, 2000). Vezanje kalcijevih iona inducira konformacijsku promjenu kojom u interakciju stupaju N-terminalna i katalitička C-terminalna domena, čime se aktivira prijenos elektrona s NADPH na molekularni kisik čime nastaje superoksidni anion ($\text{O}_2^{\cdot -}$) (Liu i sur., 2020).



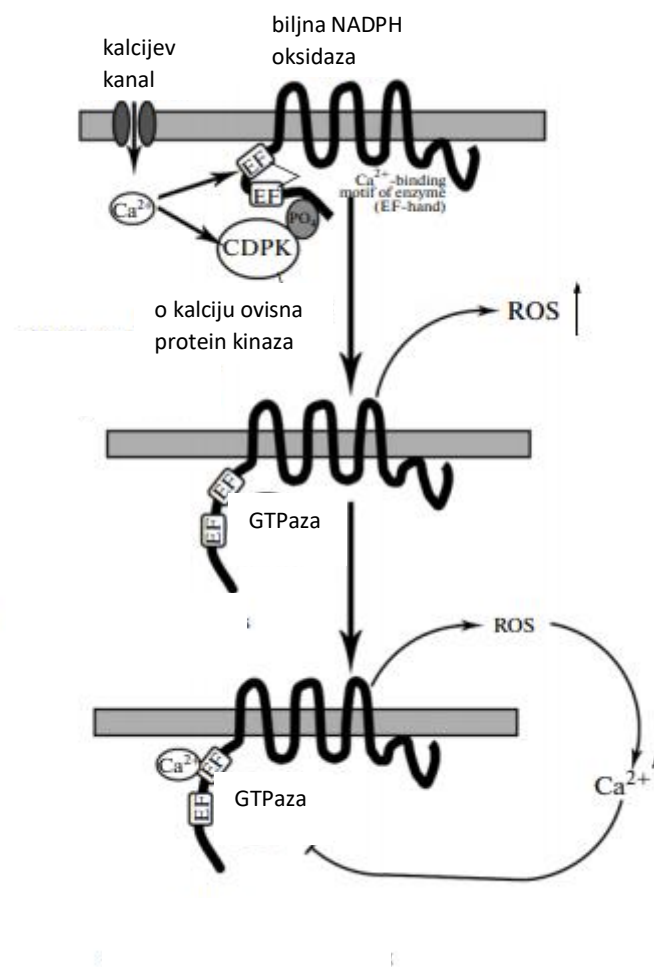
Slika 1: Struktura biljne NADPH oksidaze – RBOH, (Preuzeto i prilagođeno prema Glyan’ko i Ischenko, 2010).

3.2. Uloga kalcijevih iona u regulaciji aktivnosti RBOH

Osim direktne aktivacije RBOH pomoću kalcijevih iona putem Ca^{2+} -vezujućih domena, pretpostavlja se da važnu ulogu u aktivnosti ovog enzima imaju i o kalciju ovisne kinaze koje fosforiliraju N-terminalnu domenu (Glyan’ko i Ischenko, 2010). Ulazak kalcijevih iona u citosol putem membranskih prijenosnika dovodi do aktivacije o kalciju ovisnih kinaza koje, fosforilacijom N-terminalne domene enzima RBOH, induciraju konformacijsku promjenu koja pomaže interakciju RBOH s citosolnom Rop GTPazom za koju se smatra da potiče oksidativnu aktivnost enzima (Slika 2) (Glyan’ko i Ischenko, 2010). Proizvedeni superoksidni anion (O_2^-) zatim se prevodi u vodikov peroksid (H_2O_2) pomoću SOD te dolazi do aktivacije kalcijevih kanala koji su ovisni o ROS (Liu i sur., 2020). Riječ je o mehanizmu pozitivne povratne sprege – producirani ROS doprinose ulasku kalcijevih iona koji potom aktiviraju RBOH čime se stimulira proizvodnja dodatne količine ROS. Na taj način se osigurava dulje trajanje i veća amplituda čak i slabih signala, koji će svejedno dovesti do značajnih staničnih odgovora (Liu i sur., 2020). S druge strane, smatra se da akumulacija kalcijevih iona, do koje je došlo mehanizmom povratne sprege, inhibira

interakciju između RBOH i Rop GTPaze čime se smanjuje njezina aktivnost, a time i produkcija ROS (Glyan'ko i Ischenko, 2010).

Dugoročna aktivnost NADPH oksidaze može se regulirati i drugim staničnim mehanizmima, kao što je manjak supstrata tj., NADPH (Glyan'ko i Ischenko, 2010). Međutim, i ova razina regulacije povezana je s kalcijevim ionima zato što citosolna koncentracija NADPH dijelom ovisi i o aktivnosti NAD kinaze čija aktivnost ovisi o kalmodulinu (Glyan'ko i Ischenko, 2010). Kalmodulin je svestrani Ca^{2+} -vezujući protein i stanični sekundarni glasnik koji regulira aktivnost brojnih efektorskih proteina u odgovoru na kalcijeve signale (Yamniuk i sur., 2007).



Slika 2: Shematski prikaz regulacije aktivnosti enzima RBOH, (Preuzeto i prilagođeno prema Glyan'ko i Ischenko, 2010).

3.3. Regulacija AtRBOH

AtRBOH je NADPH oksidaza u vrste *Arabidopsis thaliana* (Ogasawara i sur., 2008). Detaljno je istražena i opisana njezina regulacija koja se odvija na više razina. Pokazano je, u radu Dubiella i sur. (2013), da je AtRBOH regulirana jednom od kinaza ovisnih o kalciju. U vrste *Arabidopsis thaliana* pronađene su 34 o kalciju ovisne kinaze (CPK), a poznato je da enzim AtCPK5 fosforilira AtRBOH kao odgovor na flg22² i egzogeni vodikov peroksid (Dubiella i sur., 2013). Također je dokazano da i neke druge CPK mogu fosforilirati N-terminalni kraj AtRBOH (Gao i sur., 2013). Osim kinaza ovisnih o kalciju, AtRBOH može biti fosforilirana i pomoću BIK1³ (*botrytis-induced kinase*) (Kadota i sur., 2014). Sljedeći oblik regulacije aktivnosti AtRBOH odnosi se na komponente ovisne o staničnoj membrani. Fosfolipaza D (PLD), koja se nalazi na staničnoj membrani, hidrolizira fosfolipide uz produkciju fosfatidne kiseline (Liu i He, 2016). Dokazano je da fosfatidna kiselina veže arginine koji se nalaze na N-terminalnom kraju AtRBOH čime se aktivira produkciju ROS u prisutnosti ABA. Postoji i oblik negativne regulacije AtRBOH, odnosno inhibicije produkcije ROS, a postiže se S-nitrozilacijom (Liu i He, 2016). S-nitrozilacija je vrsta post-translacijske modifikacije u kojoj se na tiolne (SH) skupine cisteinskih ostataka proteina dodaje NO- uz nastanak protein S-nitrozocisteina (Yun i sur., 2011). Specifična S-nitrozilacija AtRBOH događa se kao odgovor na *Pst* DC300⁴. Regulacija enzima AtRBOH vrlo je složena iz dva razloga – prvo, potrebni su brojni regulatorni mehanizmi kako bi držali produkciju potencijalno opasnih ROS pod kontrolom te drugo, produkcija ROS pomoću AtRBOH predstavlja važnu komponentu u signalnim putevima koji su pokrenuti kao odgovor na širok spektar stresnih uvjeta.

² flg22 – konzervirani peptid koji je dio bakterijskog flagelina, inducira lokalni i sistematski imunosni odgovor u biljaka (Jelenska i sur., 2017).

³ BIK1 – citoplazmatska kinaza vrste *Arabidopsis thaliana* koja sudjeluje u brojnim signalnim putevima (Xu i sur., 2013).

⁴ *Pst* DC300 – kratica za *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300; patogen koji uzrokuje bakterijske infekcije kod rajčice i uročnjaka te služi kao modelni organizam u molekularnoj biljnoj patologiji (Subramanian i sur., 2011).

4. Signalni putevi koji su aktivirani pod utjecajem biotičkih i abiotičkih stresnih čimbenika

4.1. Kompleks PRR prepoznaje PAMP

Kako bi se omogućila signalizacija pomoću ROS, stanica mora prvo prepoznati prisutnost stresnog čimbenika i pokrenuti signalne puteve koji će dovesti do njihove produkcije. PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) su molekularni uzorci koji potječu od patogena, a biljne stanice ih prepoznaju pomoću PRR (*pattern recognition receptors*) koji se nalaze na staničnoj membrani (Liu i He, 2016). Flagelin i EF-Tu, kao primjeri PAMP, prepoznati su pomoću svojih odgovarajućih PRR-ova. FLS2 (*flagellin-sensing 2*) prepoznaje flg22, dok EFR (*EF-Tu receptor*) prepoznaje EF-Tu. FLS2 i EFR pripadaju u skupinu receptorskih kinaza koje sadrže LRR (*leucine-rich repeat*), odnosno slijed bogat leucinom (Qi i sur., 2017). Prije aktivacije pomoću flg22, FLS2 se nalazi u pre-aktivacijskom stanju u kojem je u interakciji s proteinima BIK1 i PBL1⁵. Nakon interakcije s flg22, u interakciju stupa i koreceptor BAK1 što rezultira fosforilacijom: FLS2, BAK1 te BIK1/PBL1 kompleksa (Qi i sur., 2017). Interakcija receptor-ligand dovodi do aktivacije produkcije ROS putem aktivacije AtRBOH pomoću jedne od navedenih kinaza (Zipfel i sur., 2006). Dokazano je da kod *flg22* i *elf18*⁶ mutanata potpuno izostaje AtRBOH-ovisna produkcija ROS (Zipfel i sur., 2006), dok je kod *bak1* i *bik1*⁷ mutanata značajno kompromitirana (Chinchilla i sur., 2007, Smith i Heese 2014).

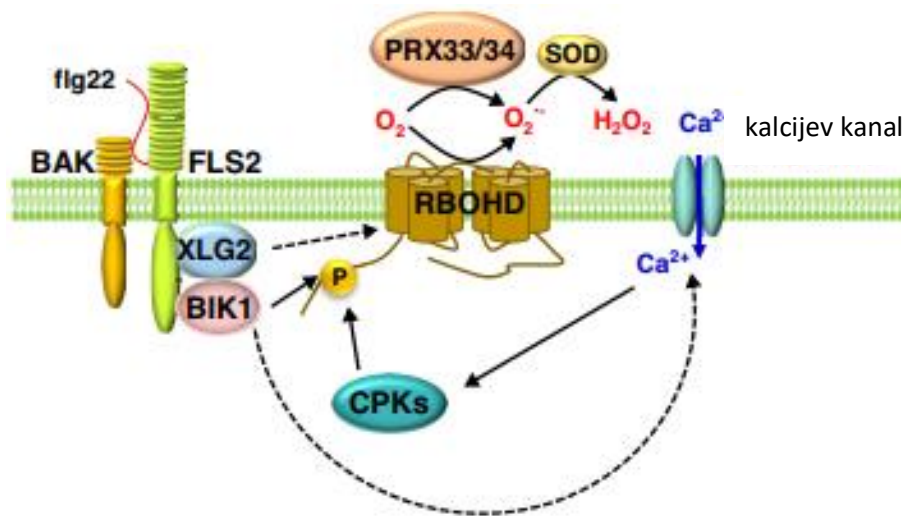
Percepcija PAMP pomoću PRR dovodi do raznih promjena na molekularnoj razini (Schwessinger i Zipfel, 2008). Prva promjena, koja se događa svega nekoliko sekundi do nekoliko minuta nakon prepoznavanja, je ulazak iona preko plazmatske membrane, uključujući Ca²⁺ što je važno zbog regulacije RBOH, zatim slijedi oksidativni prasak, aktivacija kinaza, endocitoza – procesi koji su također važni za regulaciju RBOH (Schwessinger i Zipfel, 2008). Sljedeća promjena, kojoj je potrebno otprilike 30 minuta, je transkripcijska aktivacija. Molekule elf18 i flg22 induciraju ekspresiju istog seta gena koji kodiraju proteine PR (*pathogenesis-related*). Čak 30% gena iz istog seta transkripcijski je aktivirano nakon prepoznavanja peptidoglikana, dok je njih čak 50% aktivirano nakon prepoznavanja hitina. Preklapanje transkripcijske aktivacije u slučaju različitih PAMP koji su je inducirali (elf18, flg22, peptidoglikan i hitin) ukazuje na konvergenciju signala (Schwessinger i Zipfel, 2008). Usprkos ovim sličnostima, vrijeme indukcije, intenzitet i trajanje indukcije obrambenog signala varira ovisno o PAMP-

⁵ PBL1 – *PBS1-Like* protein; citoplazmatska kinaza koja je usko povezana s BIK1 (Qi i sur., 2017).

⁶ elf18 – epitop molekule EF-Tu od 18 aminokiselina kojeg biljke prepoznaju kao PAMP (Tintor, 2020).

⁷ BAK1 i BIK1 – kinaze koje djeluju nizvodno od PRR i fosforiliraju AtRBOH (Liu i He, 2016).

u koji ga je pokrenuo. Također je ponekad potrebno više različitih PAMP signala kako bi se aktivirao određeni signalni put, dok drugi PAMP mogu međusobno djelovati antagonistički (Vidhyasekaran, 2018).



Slika 3: Shematski prikaz aktivacije RBOH i produkcije ROS nakon prepoznavanja PAMP pomoću PRR (Preuzeto i prilagođeno prema Qi i sur., 2017).

U okviru mehanizma aktivacije RBOH koji rezultira produkcijom ROS (Slika 3) prvo dolazi do percepcije PAMP pomoću PRR, u ovom slučaju je riječ o flg22, koji je prepoznat pomoću receptora FLS2. FLS2 zatim aktivira BIK1, dovodi do otvaranja kalcijevih kanala i direktno fosforilira N-terminalni dio enzima RBOH. Ulazak kalcijevih iona dovodi do aktivacije o kalciju ovisnih kinaza koje provode daljnju fosforilaciju NADPH oksidaze. Peroksidaze PRX33/34 također sudjeluju u produkciji ROS. Superoksidni anion koji je nastao djelovanjem RBOH, dalje se prevodi u vodikov peroksid pomoću SOD (Qi i sur., 2017).

4.2. Uloga ROS u djelovanju ABA

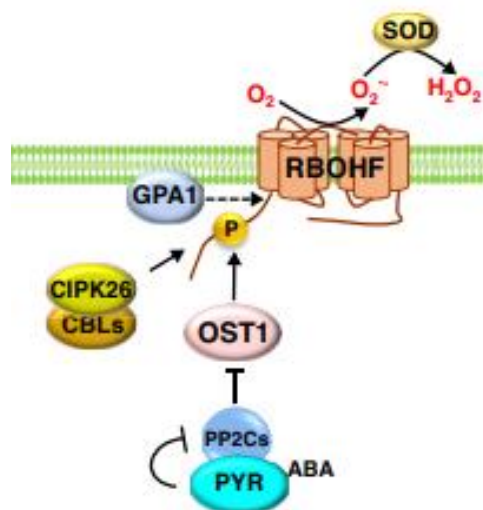
Osim produkcije ROS koja je ovisna o signalu PAMP, događa se i produkcija ROS ovisna o apscizinskoj kiselini (ABA). ABA je biljni hormon koji regulira više mehanizama uključenih u rast i razvoj biljaka te odgovora na stresne uvjete (Nambara, 2017).

Receptori na koje se veže ABA su *pyrabactin resistance* (PYR), *PYR1-like* (PYL) te *regulatory component of ABA receptor* (RCAR), a svima im je zajedničko da vežu i inhibiraju proteinske fosfataze 2Cs (PP2Cs).

PP2Cs, u odsutnosti ABA, kada nisu inhibirane, svojim djelovanjem defosforiliraju i inaktiviraju kinaze SnRK2s (*sucrose non-fermentable related kinases*), a upravo je jedna od tih kinaza odgovorna za fosforilaciju i aktivaciju enzima RBOH (Qi i sur., 2017). Dakle, kada ABA nije prisutna, kinaze su inaktivirane djelovanjem protein fosfataze, ne mogu fosforilirati RBOH i stoga nema produkcije ROS.

Osobito važna uloga ROS, koja je povezana s ABA, je regulacija otvaranja i zatvaranja puči. Stanice zapornice, koje grade puči, odgovorne su za izmjenu plinova, sprječavanje gubitka vode i kontrolu invazije patogena. Vezano uz invaziju patogena, tj. biotički stres, utvrđeno je da flg22 potiče zatvaranje puči (Qi i sur., 2017).

Zatvaranje puči ovisno o ABA je vrlo složen proces koji se oslanja na aktivaciju anionskih kanala koji dovode do gubitka turgora koji je držao stanice zapornice otvorenima. Kod vrste *Arabidopsis thaliana*, anionski kanali koji sudjeluju u ovom procesu su *slow anion channel-associated 1* (SLAC1) i *aluminum-activated malate transporter 12/quickly activated anion channel 1* (ALMT12/QUAC1). Kada ABA nije prisutna, aktivna je protein fosfataza 2Cs koja inaktivira SLAC1. S druge strane, kada se ABA veže na receptor, aktivira se OST1 (*open stomata 1*) koji fosforilacijom aktivira i SLAC1 i QUAC1 što će dovesti do zatvaranja puči. OST je kinaza koja pripada ranije spomenutoj skupini SnRK2 i fosforilira RBOHF⁸ na N-terminalnom kraju (Qi i sur., 2017).



Slika 4: Shematski prikaz aktivacije RBOHF i aktivacije produkcije ROS nakon djelovanja ABA (Preuzeto i prilagođeno prema Qi i sur., 2017).

⁸ Jedna od podvrsta NADPH oksidaza u biljaka koja je uključena u zatvaranje puči inducirano ABA-om i signalizaciju pomoću reaktivnih kisikovih oblika (UniProt, 2021).

Prema shematskom prikazu (Slika 4), OST1 i CIPK26 (*CBL-interacting serine/threonine protein kinase 26*) pozitivno reguliraju aktivnost RBOHF fosforilacijom njezinog N-terminalnog kraja. Pozitivan učinak na aktivnost ima i heterotrimerni G-protein, GPA1.

ROS koji su proizvedeni pod utjecajem ABA i flg22 dovest će do zatvaranja puči, kao odgovor na vodni, a također i na biotički stres. Povezanost ROS i zatvaranja puči ostvarena je putem *guard cell hydrogen peroxide-resistant1* (GHR1) receptorske kinaze koja sadrži LRR. Iako nije poznat točan mehanizam interakcije između ROS i GHR1, očito je da ROS koji nastaju kao reakcija na prepoznate čimbenike stresa dovode do zatvaranja puči. Naime, stanice zapornice koje su bile *ghr1* mutanti, nisu reagirale na tretman s ABA, flg22, niti egzogenim vodikovim peroksidom (Qi i sur., 2017).

5. Interakcija ROS sa staničnim proteinima i lipidima

5.1. ROS i post-translacijska modifikacija proteina

ROS koji su proizvedeni kao stanični odgovor na biotički ili abiotički stres stupaju u interakciju sa staničnim proteinima, tj. oksidiraju one proteine čije funkcije ovise o oksidativnim modifikacijama, a time i o redoks stanju stanice (Liu i sur., 2015). Post-translacijska modifikacija proteina jedan je od staničnih mehanizama kojima se povećava raznolikost proteina (Liu i sur., 2015). ROS, kao dio brzog odgovora na različite stresne uvjete, reguliraju aktivnost brojnih proteina uključenih u post-translacijsku modifikaciju, kojom se ostvaruju brzi stanični odgovori, bez potrebe za *de novo* sintezom proteina (Hewezi, 2015). U enzime važne za proces post-translacijske modifikacije ubrajaju se proteinske fosfataze koje uklanjaju fosfatnu skupinu sa supstrata (Barshevsky, 2008). Regulacija nekih proteinskih fosfataza temelji se na alosteričkoj konformacijskoj promjeni regulatornih podjedinica koje određuju izmjenu aktivnog i inaktivnog oblika enzima (Liu i sur., 2015). Za tri takve regulatorne podjedinice proteinske fosfataze A2 dokazano je, u radu Liu i sur. (2015), da prolaze oksidativne modifikacije nakon tretmana salicilatom. Vrlo je vjerojatno da produkcija ROS, koja je potaknuta uslijed izloženosti biljke biotičkom ili abiotičkom stresnom čimbeniku, dovodi do oksidacije regulatornih podjedinica proteinske fosfataze čime se utišava njezina funkcija, što dovodi do povećane fosforilacije ciljnih proteina.

Druga skupina proteina koja sudjeluje u post-translacijskoj modifikaciji su šaperoni. Jedan od šaperona čija aktivnost ovisi o redoks statusu stanice je Hsp33⁹. Regulacija ovog šaperona temelji se na trima

⁹ Hsp – *heat shock protein*, protein toplinskog šoka.

reaktivnim cisteinima čijom oksidacijom, primjerice djelovanjem vodikovog peroksida, nastaju disulfidne veze koje aktiviraju šaperonsku aktivnost (Jakob i sur., 1999). Osim Hsp33, u radu Liu i sur. (2015), dokazano je da uslijed tretmana peptidom flg22 ili salicilatom dolazi do oksidacije još dvaju šaperona – TCP1 i HSP81.

Treća skupina proteina koja sudjeluje u post-translacijskoj modifikaciji su disulfid izomeraze (PDI, *protein disulfide isomerase*). To su sveprisutne oksidoreduktaze koje kataliziraju nastanak, redukciju i izomerizaciju disulfidnih veza u proteinima (Liu i sur., 2015). PDI karakteristične su po tetrapeptidnoj sekvenci – CGHC (Houston i sur., 2005). Cisteini koji su u sastavu tetrapeptidne konzervirane sekvence sudjeluju u regulaciji aktivnosti. Prilikom tretmana peptidom flg22 i salicilatom, pokazano je da su oba cisteina osjetljiva na promjenu redoks stanja te je došlo do njihove oksidacije prilikom tretmana stanica vrste *Arabidopsis thaliana* vodikovim peroksidom (Liu i sur., 2015).

5.2. ROS, lipidna peroksidacija i HR

Povećana koncentracija ROS u stanici dovodi do oštećenja brojnih molekula, uključujući peroksidaciju lipida koji su sastavni dio stanične membrane te membrana organela (Sharma i sur., 2012). PUFA (*polyunsaturated fatty acid*), tj. masne kiseline koje sadrže više od jedne dvostruke veze u molekuli, osobito su osjetljive na oksidaciju putem ROS (Sharma i sur., 2012). Lipidna peroksidacija je reakcija u kojoj slobodni radikali, koji se ubrajaju u ROS, oksidiraju lipide čime nastaju reaktivni intermedijeri koji mogu dalje stupati u kemijske reakcije (Su i sur., 2019). Važna posljedica koja se povezuje s lipidnom peroksidacijom je programirana stanična smrt.

Jedan od načina ograničavanja širenja patogena u biljnom organizmu je hipersenzitivni odgovor (HR, *hypersensitive response*). HR je kompleksan odgovor na patogene koji uključuje ekspresiju proteina PR, sintezu sekundarnih metabolita koji imaju antimikrobna svojstva i lokaliziranu staničnu smrt na mjestu zaraze. Na taj način programirana smrt stanice sprječava širenje patogena na druge dijelove tkiva (Zurbriggen i sur., 2010). U stanicama sisavaca dokazano je da povećana proizvodnja ROS u mitohondriju prethodi lokaliziranoj staničnoj smrti, a sličan slijed događaja dokazan je i u biljnim stanicama. Nakon tretmana biljne stanice bakterijskim aktivatorom, došlo je do proizvodnje ROS u mitohondriju, popraćene formiranjem pora u staničnoj membrani (Zurbriggen i sur., 2010). Iako nije u potpunosti razjašnjena poveznica između ROS i HR, iz dosadašnjih saznanja i činjenice da ROS dovode do lipidne peroksidacije, odnosno do povećanja fluidnosti i permeabilnosti stanične membrane (Sharma i sur., 2012), naslućuje se ključna uloga produkcije ROS u pokretanju programirane stanične smrti kao dijela obrambenog odgovora na biotički stres, tj. na patogene organizme.

5.3. ROS i epigenetička modifikacija

Ekspresija gena tijekom određenog redoks procesa temelji se na epigenetičkim promjenama koje uključuju post-translacijsku modifikaciju histona i kemijsku modifikaciju molekule DNA (Huang i sur., 2019). Liu i sur. (2015) utvrdili su da su histonske deacetilaze – HDA19 i HDA9 jedna od skupina proteina koji su podložni oksidaciji nakon tretmana peptidom flg22 i salicilatom. Oksidacija histonskih deacetilaza dovodi do njihove inaktivacije čime se povećava acetilacija histona, a time i ekspresija odgovarajućih gena. Ishod ekspresije odgovarajućih gena ovisi o tome na koji način njihovi produkti modeliraju obrambeni odgovor. Zhou i sur. (2005), proveli su dva pokusa kojima su dokazali ulogu HDA19 u obrambenom odgovoru na stresne uvjete. Napravljen je fuzijski protein HDA19:GUS¹⁰ pomoću kojeg je praćena ekspresija histonske deacetilaze u biljci *Arabidopsis thaliana*. Ozljeda tkiva ili zaraza patogenom *A. brassicicola*¹¹ doveli su do ekspresije GUS što upućuje na ulogu HDA19 u regulaciji ekspresije obrambenih gena.

Uloga HDA19 u odgovoru biljke *Arabidopsis thaliana* na stresne uvjete istražena je i u radu Kim i sur. (2008), u kojem je dokazano da interakcija između transkripcijskih aktivatora WRKY38 i WRKY62 i histonske deacetilaze HDA19 dovodi do precizne regulacije biljnog obrambenog odgovora. Transkripcijski aktivatori djeluju kao negativni regulatori obrambenog odgovora biljke, dok HDA19 direktno reducira njihovu transkripcijsku aktivnost i time dovodi do aktivacije imunskog odgovora potaknutog bakterijom *P. syringae*¹².

Osim histonskih deacetilaza, dokazana je uloga i povezanost ROS i acilacije te histonske demetilacije, koje predstavljaju ostale razine epigenetičke modifikacije povezane s odgovorom na stresne uvjete (Huang i sur., 2019).

5.4. Metoda OxiTRAQ

Važan korak u razumijevanju biljnih obrambenih mehanizama bio je otkriće proteina osjetljivih na promjenu redoks stanja (Liu i sur., 2015). U svrhu istraživanja takvih proteina primijenjena je metoda OxiTRAQ – kvantitativna metoda za identifikaciju proteina koji su prošli oksidativne promjene (Mayer, 2014). Liu i sur. (2015) su metodom OxiTRAQ identificirali proteine stanica vrste *Arabidopsis thaliana* u kojima su tiolne skupine cisteina bile reverzibilno oksidirane nakon tretmana salicilatom ili peptidom

¹⁰ GUS – β -glukuronidaza; koristi se kao reporter gen.

¹¹ *Alternaria brassicicola*; fitopatogena gljiva.

¹² *Pseudomonas syringae*; Gram-negativna bakterija, biljni patogen.

flg22, kao induktorima biljnog imunskog odgovora. Izlaganje salicilatu i peptidu flg22 bilo je kratkotrajno kako bi se mogli identificirati proteini ranog odgovora. Pronađeno je 128 peptida koji pripadaju 111 različitih proteina i koji su pokazali ovisnost o redoks stanju nakon opisanog tretmana. Od njih 128, redoks stanje njih 106 je podložno tretmanu salicilatom, dok ih je 56 ovisno o tretmanu peptidom flg22, što upućuje na zaključak da tretman salicilatom dovodi do značajnijeg remećenja staničnog redoks stanja. Također, postoje 33 redoks-osjetljiva peptida koji su identificirani u oba slučaja, što upućuje na zaključak da ovi tretmani dijele određene stanične odgovore. Devet od navedenih redoks osjetljivih proteina uključeno je u transkripcijsku i post-transkripcijsku regulaciju. Tri se ubrajaju u transkripcijske faktore, dva su histonske deacetilaze, jedan protein je odgovoran za prekranje mRNA i tri proteina procesiraju molekule RNA. Iz dobivenih rezultata proizlazi zaključak da su remodeliranje kromosoma i epigenetička modifikacija važni mehanizmi biljnog odgovora na biotičke ili abiotičke stresne čimbenike.

6. Zaključak

Reaktivni kisikovi oblici prisutni su u svakoj stanici u kojoj se odvija aerobni metabolizam te se prvenstveno smatraju štetnim nusproduktima. U svrhu prevencije njihova štetnog djelovanja, stanice su razvile brojne mehanizme uklanjanja ROS. Međutim, stanice su također stekle i prilagodbu kojom koriste ROS kao signalne molekule prilikom stresnih uvjeta. Osnovno mjesto produkcije ROS tijekom stresnih uvjeta je apoplast, a enzim koji provodi tu reakciju je RBOH – membranska NADPH oksidaza. Osnovnom reakcijom koju katalizira RBOH nastaje superoksidni anion koji dalje služi kao izvor ostalih ROS u stanici. S obzirom na potencijalno štetan učinak produkta koji nastaje djelovanjem ovog enzima, njegova aktivnost vrlo je precizno regulirana i to na brojnim razinama. Regulacija aktivnosti RBOH temelji se na koncentraciji kalcijevih iona, fosforilaciji, te S-nitrozilaciji. Produkcija ROS potaknuta je kada stanica primi signal o biotičkom ili abiotičkom stresnom čimbeniku. Percepcija stresnih uvjeta provodi se pomoću staničnih receptora – primjerice PRR receptori prepoznaju specifične molekularne uzorke patogena. Jednom kada je registriran stresni čimbenik i kada je njegova interakcija sa stanicom dovela do produkcije ROS, proizvedeni ROS šire stanični signal o stresnom uvjetu putem interakcije sa staničnim komponentama. Provode oksidaciju proteina koji su odgovorni za epigenetičku te post-translacijsku modifikaciju čime mijenjaju ekspresiju gena i sadržaj staničnih proteina. Promjene koje su inducirane u stanici dovest će do njezine prilagodbe na stresni uvjet. Iako nisu potpuno razjašnjene sve interakcije između ROS i staničnih komponenti, jasno je da ROS služe kao vrlo korisne signalne molekule čiji nastanak je strogo reguliran, a djelovanje značajno utječe na stanice i osigurava preživljavanje stresnih uvjeta.

7. Literatura

- Barshevsky T. (2008.): Specificity of phosphate removal, New England Biolabs, pristupljeno 05.09.2021.
- Bell E. A., Watson A. A., Nash R. J. (2008): Non-protein amino acids: a review of the biosynthesis and taxonomic significance. *Natural Product Communications* 3, 93-110.
- Bose J., Rodrigo-Moreno A., Shabala S. (2014): ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 65, 1241-1257.
- Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., Jones J. D., Felix F., Boller T. (2007): A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448, 497-500.
- Choudhury F. K., Rivero R. M., Blumwald E., Mittler R. (2017): Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* 90, 856-867.
- Dubiella U., Seybold H., Durian G., Komander E., Lassig R., Witte C. P., Schulze W. X., Romeis T. (2013): Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 8744-8749.
- Gao X., Chen X., Lin W., Chen S., Lu D., Niu Y., Li L., Cheng C., McCormack M., Sheen J., Shan L., He P. (2013): Bifurcation of Arabidopsis NLR immune signaling via Ca²⁺-dependent protein kinases. *PLoS pathogens* 9, e1003127.
- Gill S. S., Anjum N. A., Gill R., Yadav S., Hasanuzzaman M., Fujita M., Mishra P., Sabat S. C., Tuteja N. (2015): Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 10375-10394.
- Glyan'ko A. K., Ischenko A. A. (2010): Structural and functional characteristics of plant NADPH oxidase: a review. *Applied biochemistry and microbiology* 46, 463-471.
- Gupta D. (2015): Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 6, 546-566.
- Halliwell B. (1995): Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical pharmacology* 49, 1341-1348.
- Harir Y., Mittler R. (2009): The ROS signaling network of cells. U: del Rio L. A., Puppo A. (ur.) *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*. Springer, str. 165-174.

Hasanuzzaman M., Bhuyan M. H. M., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S. M., Mahmud J. A., Fujita M., Fotopoulos V. (2020): Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9, 681.

Hernandez J. A., Espin G. B., Diaz-Vivancos P. (2017): Glutathione-mediated biotic stress tolerance in plants. U: Hossain M. A., Mostofa M. G., Diaz-Vivancos P., Burritt D. (ur.) *Glutathione in Plant Growth, Development and Stress Tolerance*. Springer, str. 309-329.

Hewezi T. (2015): Cellular signaling pathways and posttranslational modifications mediated by nematode effector proteins. *Plant Physiology* 169, 1018-1026.

Houston N. L., Fan C., Xiang Q. Y., Schulze J. M., Jung R., Boston R. S. (2005): Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins. *Plant Physiology* 137, 762-778.

Huang H., Ullah F., Zhou D. X., Yi M., Zhao Y. (2019): Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science* 10, 800.

Jakob U., Muse W., Eser M., Bardwell J. C. (1999): Chaperone activity with a redox switch. *Cell* 96, 341-352.

Jelenska J., Davern S. M., Standaert R. F., Mirzadeh S., Greenberg J. T. (2017): Flagellin peptide flg22 gains access to long-distance trafficking in Arabidopsis via its receptor, FLS2. *Journal of Experimental Botany* 68, 1769-1783.

Kadota Y., Sklenar J., Derbyshire P., Stransfeld L., Asai S., Ntoukakis V., Jones J. D. G., Shirasu K., Menke F., Jones A., Zipfel C. (2014): Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Molecular Cell* 54, 43-55.

Kim K. C., Lai Z., Fan B., Chen Z. (2008): Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *The Plant Cell* 20, 2357-2371.

Kaur G., Pati P. K., 2018: In silico physicochemical characterization and topology analysis of Respiratory burst oxidase homolog (Rboh) proteins from Arabidopsis and rice. *Bioinformation* 14, 93.

Lewit-Bentley A., Réty S. (2000): EF-hand calcium-binding proteins. *Current opinion in structural biology* 10, 637-643.

Liu M., Yu H., Ouyang B., Shi C., Demidchik V., Hao Z., Yu M., Shabala S. (2020): NADPH oxidases and the evolution of plant salinity tolerance. *Plant, Cell & Environment* 43, 2957-2968.

Liu P., Zhang H., Yu B., Xiong L., Xia Y. (2015): Proteomic identification of early salicylate-and flg22-responsive redox-sensitive proteins in Arabidopsis. *Scientific Reports* 5, 1-7.

Liu Y., He C. (2016): Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Reports* 35, 995-1007.

Mayer M. J. (2014): *OxiTRAQ: a novel approach to identify redox-sensitive proteins*, ThermoFisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/blog/proteomics/oxitraq-a-novel-approach-to-identify-redox-sensitive-proteins/>, pristupljeno u srpnju 2021.

Mehla N., Sindhi V., Josula D., Bisht P., Wani S. H. (2017): An introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance: U: Iqbal M., Khan R., Khan N. A. (ur.) *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation Under Abiotic Stress*. Springer, str. 1-23.

Mittler R., Varderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. (2011): ROS signaling: the new wave?. *Trends in Plant Science* 16, 300-309.

Nambara E. (2017): *Plant physiology and development*. U: Thomas B., Murray B. G., Murphy D. J. (ur.) *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, Volume 1, Elsevier.

Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Kadota Y., Hishinuma H., Senzaki E., Yamagoe S., Nagata K., Nara M., Suzuki K., Tanokura M., Kuchitsu K. (2008): Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 8885-8892.

Pandey S., Fartyal D., Agarwal A., Shukla T., James D., Kaul T., Negi Y. K., Arora S., Reddy M. K. (2017): Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in Plant Science* 8, 581.

Potters G., Horemans N., Jansen M. A. K. (2010): The cellular redox state in plant stress biology – A charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 292-300.

Qi J., Wang J., Gong Z., Zhou J. M. (2017): Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 38, 92-100.

Respiratory burst oxidase homolog protein F, *uniprot*, pristupljeno 07.06.2021., <https://www.uniprot.org/uniprot/O48538>

Schwessinger B., Zipfel C. (2008): News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 389-395.

Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessaraki M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defence mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012, Article ID 217037.

Smith J. M., Heese A. (2014): Rapid bioassay to measure early reactive oxygen species production in *Arabidopsis* leaf tissue in response to living *Pseudomonas syringae*. *Plant Methods* 10, 1-9.

Su L. J., Zhang J. H., Gomez H., Murugan R., Hong X., Xu D., Jiang F., Peng Z. Y. (2019): Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019, Article ID 5080843.

Subramanian S., Sangha J. S., Gray B. A., Singh R. P., Hiltz D., Critchley A. T., Prithviraj B. (2011): Extracts of the marine brown macroalga, *Ascophyllum nosodum*, induce jasmonic acid dependent systematic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology* 131, 237-248.

Tintor E. (2020): Elongacijski faktor Tu kao moonlighting protein, Završni rad, preuzeto s: <https://repozitorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf:8682>

Vermot A., Petit-Härtlein I., Smith S. M., Fieschi F. (2021): NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants*, 10, 890.

Vidhyasekaran P. (2018): PAMP signaling in plant innate immunity. U: Vidhyasekaran P. (ur.) *PAMP Signals in Plant Innate Immunity*. Springer, 17-161.

Wang J., Ceccato J. C., Puel J. L. (2020): Physiology and pharmacology of the cochlea. *The Senses: A Comprehensive Reference* 2, 468-486.

Xu J., Wei X., Yan L., Liu D., Ma Y., Guo Y., Peng C., Zhou H., Yang C., Lou Z., Shui W. (2013): Identification and functional analysis of phosphorylation residues of the *Arabidopsis* BOTRYTIS-INDUCED KINASE1. *Protein & Cell* 4, 771-781.

Yamniuk A. P., Rainaldi M., Vogel H. J. (2007): Calmodulin has the potential to function as a Ca²⁺-dependent adaptor protein. *Plant Signaling & Behaviour* 2, 354-357.

Yun B. W., Feechan A., Yin M., Saidi N. B. B., Le Bihan T., Yu M., Moore J. W., Kang J. G., Kwon E., Spoel S. H., Pallas Y. A., Loake G. J. (2011): S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 478, 264-268.

Zhou C., Zhang L., Duan J., Miki B., Wu K. (2005): Histone deacetylase19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 1196-1204.

Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J. D. G., Boller T., Felix G. (2006): Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* 125, 749-760.

Zurbriggen M. D., Carrillo N., Hajirezaei M. R. (2010): ROS signaling in the hypersensitive response. *Plant Signaling & Behaviour* 5, 393-396.

8. Sažetak

Reaktivni kisikovi oblici često se smatraju štetnim nusproduktom aerobnog metabolizma. Međutim, oni djeluju i kao signalne molekule prilikom odgovora biljaka na stresne uvjete. Nakon percepcije stresnog čimbenika putem raznih receptora dolazi do povećane proizvodnje ROS koji pokreću daljnju signalnu kaskadu u biljnim stanicama. Promjena koncentracije ROS posljedica je promjene regulacije enzima NADPH oksidaze koja je središnje mjesto apoplastne sinteze ROS. NADPH oksidaza podložna je brojnim razinama regulacije, što omogućuje preciznu kontrolu proizvodnje ROS, koji potom stupaju u interakcije s brojnim staničnim proteinima te utječu na njihovu funkciju. Direktno utječu na post-translacijsku modifikaciju proteina i na taj način reguliraju njihovu aktivnost. Osim na aktivnost proteina, post-translacijskom modifikacijom histona indirektno djeluju i na ekspresiju određenih gena. S membranskim lipidima stupaju u reakciju peroksidacije čime mogu dovesti i do aktivacije programirane stanične smrti. Promjene koje su inducirane djelovanjem ROS omogućuju stanici odgovor i stjecanje otpornosti na biotički ili abiotički stresni čimbenik koji je pokrenuo prijenos signala.

Ključne riječi: ROS, NADPH oksidaza, regulacija produkcije ROS, stresni čimbenici, prijenos signala

9. Summary

Reactive oxygen species, which are often considered toxic by-products of aerobic metabolism, also act as signalling molecules during stress response in plants. After the cell senses a stressor via various receptors, there is an increase in the production of ROS which leads to a signalling cascade in plant cells. Concentration of ROS depends on the regulation of the NADPH oxidase, which is the central enzyme for apoplastic ROS production. NADPH oxidase is susceptible to many levels of regulation, which allows the fine control of ROS production. Produced ROS then interact with numerous cellular proteins, leading to changes in their function. ROS can directly cause posttranslational modifications of proteins, which results in the alteration of their activity. By inducing posttranslational modifications in histones, ROS can indirectly change gene expression. ROS also interact with membrane lipids and cause their peroxidation which can even result in programmed cell death. The cellular changes, which are induced by ROS, give rise to resistance to the abiotic or biotic stress factor which initiated the signalling cascade.

Keywords: ROS, NADPH oxidase, regulation of ROS production, stress factors, signalling cascade

Životopis

Rođena sam 1999. godine u Zagrebu, gdje sam pohađala Osnovnu školu Marina Držića. Završila sam XVI. gimnaziju Zagreb i paralelno s njom Glazbenu školu Pavla Markovca. Godine 2018. upisala sam Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Molekularna biologija.