

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**ULOGA FOTORESPIRACIJE U UVJETIMA ABIOTIČKOG
STRESA**

**THE ROLE OF PHOTORESPIRATION IN ABIOTIC STRESS
CONDITIONS**

SEMINARSKI RAD

Klara Cik

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

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

Zagreb, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. REAKCIJE ENZIMA RUBISCO – KARBOKSILACIJA I OKSIGENACIJA	2
3. FOTORESPIRACIJA	4
3.1. REAKCIJE FOTORESPIRACIJE	4
3.2. ASIMILACIJA AMONIJAKA	6
3.3. POTROŠNJA ENERGIJE	7
4. ULOGA FOTORESPIRACIJE U STRESNIM UVJETIMA	9
4.1. ISKORIŠTAVANJE SUVIŠKA SVJETLOSNE ENERGIJE	10
4.2. ZAŠTITA OD FOTOINHIBICIJE	11
4.3. SMANJIVANJE STOPE REAKCIJE OKSIGENACIJE ENZIMA RUBISCO.....	12
4.4. PRIJENOS SIGNALA	12
4.5. UKLANJANJE TOKSIČNIH INTERMEDIJERA.....	13
4.6. ULOGA U PRODUKCIJI SPECIFIČNIH METABOLITA.....	13
5. ZAKLJUČAK	15
6. LITERATURA	16
7. SAŽETAK	18
8. SUMMARY	18

POPIS KRATICA

2PG – 2-fosfoglikolat

3PGA – 3-fosfoglicerat

AOX – alternativna oksidaza

CAT – katalaza

CH₂-THF – 5,10-metilentetrahidrofolat

Fd-GOGAT – feredoksin-ovisna glutamat sintaza

GDC – glicin dekarboksilaza

GGT – glioksilat-glutamat aminotransferaza

GLYK – glicerat kinaza

GOX – glikolat oksidaza

GS – glutamin sintetaza

HPR – hidroksipiruvat reduktaza

MDH – malat dehidrogenaza

PGP – 2-fosfoglikolat fosfataza

PSII – fotosustav II

ROS – reaktivni kisikovi oblici

RUBISCO – ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza

RuBP – ribuloza-1,5-bisfosfat

SGT – serin-glioksilat aminotransferaza

SHMT – serin-hidroksimetil transferaza

THF – tetrahidrofolat

1. UVOD

Područja na Zemlji u kojima obitavaju biljke imaju vrlo raznolike okolišne uvjete. Iz tog su razloga biljke tijekom evolucijskog razvoja stekle različite prilagodbe metabolizma koje im omogućuju prevladavanje nepovoljnih uvjeta. Zelene biljke su razvile sposobnost korištenja svjetlosne energije i ugrađivanja ugljikovog dioksida iz atmosfere u organske spojeve u procesu fotosinteze. Biljke koriste te spojeve za potrebe rasta i razvoja te na taj način sudjeluju u ciklusu ugljika u prirodi. Ugljik se natrag u atmosferu oslobađa u obliku CO₂ u procesu respiracije.

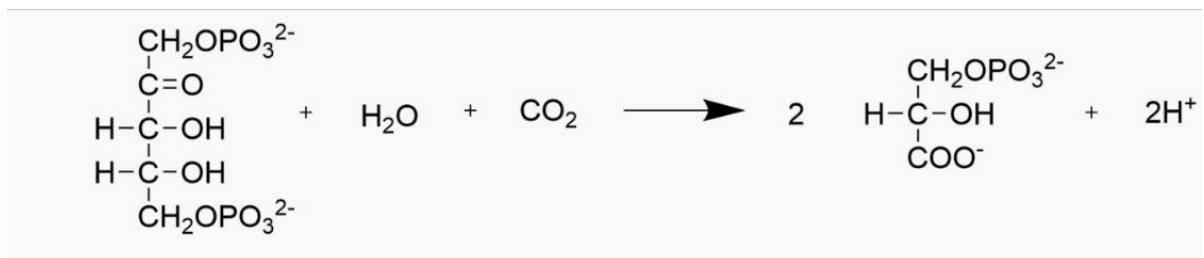
Enzim ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (RUBISCO) omogućuje asimilaciju CO₂ u organske ugljikove spojeve u Calvin-Benson-Basshamovom ciklusu. Međutim, RUBISCO ponekad može reagirati s molekularnim kisikom što uzrokuje značajan gubitak energije.

Tema ovog rada je proces fotorespiracije koji se pokreće uslijed ugrađivanja O₂ u organski spoj reakcijom RUBISCO-a. Pritom ću opisati ulogu fotorespiracije, njezinu povezanost s drugim metaboličkim procesima te moguću pozitivnu ulogu u stresnim uvjetima.

2. REAKCIJE ENZIMA RUBISCO – KARBOKSILACIJA I OKSIGENACIJA

Enzim ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (RUBISCO) je glavni enzim zaslužan za asimilaciju CO₂ u organske spojeve preko Calvin-Benson-Basshamovog ciklusa. RUBISCO je važan enzim u biljnom organizmu, što potvrđuje činjenica da mu je udio do 50% ukupnog sadržaja topivih proteina u listovima (Andersson i Backlund, 2008), a odgovoran je za fiksiranje oko 200 milijardi tona CO₂ godišnje (Pevalek-Kozlina, 2003). RUBISCO posjeduje većina autotrofnih organizama, od prokariota do eukariota, a vrlo važna je i njegova prisutnost u fitoplanktonu u morima (Andersson i Backlund, 2008).

U procesu fotosinteze, RUBISCO katalizira prvu reakciju Calvin-Benson-Basshamovog ciklusa, reakciju karboksilacije pri kojoj se odvija vezanje CO₂ na molekulu ribuloza-1,5-bisfosfata (RuBP) pri čemu nastaje kratkotrajni međuprodukt od šest ugljikovih atoma koji se cijepa na dvije molekule 3-fosfoglicerata (3PGA) (Andersson i Backlund, 2008), što je prikazano na Slici 1. Budući da je 3PGA prvi stabilni fotosintetski intermedijer koji nastaje i da sadrži tri atoma ugljika, Calvin-Benson-Basshamov ciklus se još naziva i C₃ redukcijski fotosintetski ciklus ugljika, a biljke koje ga provode nazivaju se C₃ biljke (Buchanan i sur., 2015).



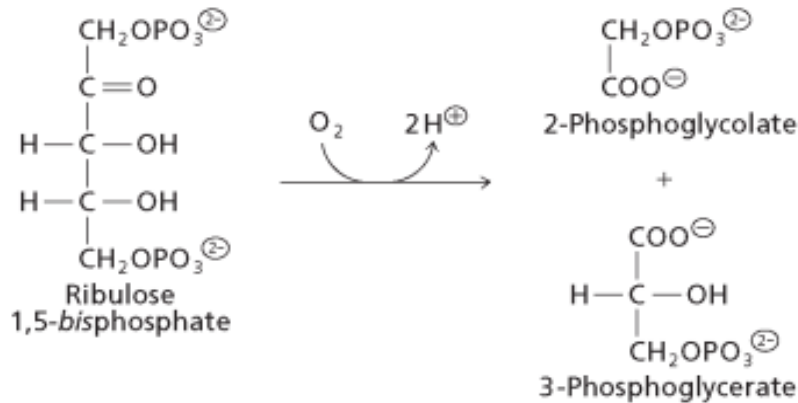
ribuloza-1,5-bisfosfat

3-fosfoglicerat

Slika 1. Reakcija karboksilacije katalizirana enzimom RUBISCO pri kojoj nastaju dvije molekule 3-fosfoglicerata; preuzeto i prilagođeno prema http://parts.igem.org/Part:BBa_K2201263

Navedena karboksilazna aktivnost RUBISCO-a u kompeticiji je s reakcijom oksigenacije što umanjuje učinkovitost reakcije asimilacije CO₂ (Andersson i Backlund, 2008). Oksigenazna aktivnost RUBISCO-a koristi atmosferski kisik, O₂, kao supstrat koji se također veže na molekulu RuBP što je prva reakcija u procesu fotorespiracije. Produkti reakcije

oksidacije su jedna molekula 3PGA te jedna molekula 2-fosfoglikolata (2PG) (Buchanan i sur., 2015; Pevalek-Kozlina, 2003), što je prikazano na Slici 2. Molekula 2PG je produkt koji se zbog svoje neiskoristivosti i štetnosti mora reciklirati u procesu fotorespiracije, što zahtijeva korištenje energije ATP-a i redukcijskih ekvivalenata (NAD(P)H) (Peterhansel i sur., 2010).



Slika 2. Reakcija oksigenacije enzima RUBISCO pri kojoj nastaje jedna molekula 3-fosfoglicerata i jedna molekula 2-fosfoglikolata; preuzeto s <https://www.chegg.com/homework-help/cost-making-amino-acids-atp-equivalents-calculated-using-val-chapter-17-problem-16p-solution-9780321830562-exc>

Na omjer reakcija karboksilacije i oksigenacije RUBISCO-a utječe relativna zastupljenost tih dvaju plinova u atmosferi (Buchanan i sur., 2015). RUBISCO je evoluirao u doba kada je koncentracija kisika bila 10¹⁴ puta manja od današnje, a koncentracija CO₂ sto puta veća, te zbog manjka evolucijskog pritiska RUBISCO nije bio u mogućnosti u potpunosti razlikovati O₂ od CO₂. To se donekle očuvalo i do danas, kada je približno svaka četvrta reakcija koju katalizira RUBISCO reakcija oksigenacije (Peterhansel i sur., 2010).

Potrebno je istaknuti kako je oksigenazna aktivnost RUBISCO-a izraženija u toplim i suhim uvjetima. U takvim je uvjetima smanjena topljivost CO₂ u vodenim otopinama te je omjer O₂/CO₂ u stanicama još veći. Biljke tada zatvaraju puči kako bi se izbjegla pretjerana evaporacija vode čime se onemogućuje difuzija CO₂ u list, a O₂ ostaje „zarobljen“ u lisnom mezofilu, što potiče oksigenaznu aktivnost RUBISCO-a. (Peterhansel i sur., 2010)

3. FOTORESPIRACIJA

Naziv fotorespiracija navodi na pomisao da se radio o metaboličkom procesu stimuliranom svjetlošću tijekom kojeg se veže O₂ te oslobađa CO₂. No, fotorespiracije je puno složeniji proces koji uključuje brojne reakcije. Proces je poznat i kao fotorespiratorni oksidacijski ciklus ugljika te kao C₂ oksidacijski fotosintetski ciklus ugljika. Ovaj drugi spomenuti naziv dobiven je prema 2-fosfoglikolatu (2PG), molekuli čiju okosnicu čine dva atoma ugljika. Ona nastaje u prvom koraku fotorespiracije, oksigenaznom aktivnošću enzima RUBISCO, kako je ranije navedeno (Buchanan i sur., 2015).

Krajnji cilj procesa fotorespiracije je iskoristiti 2PG, toksičnu molekulu u kojoj su „zarobljena“ dva atoma ugljika. Cilj je pretvoriti tu molekulu u oblik koji se može iskoristiti u metaboličkim putovima rasta i razvoja biljke. Takvo recikliranje zahtjeva brojne enzimske reakcije tijekom kojih se dvije molekule 2PG prevode u jednu molekulu 3PGA koja se može iskoristiti u Calvin-Benson-Basshamovom ciklusu. Na taj način, proces fotorespiracije uspijeva iskoristiti čak tri četvrtine potencijalno izgubljena atoma ugljika, dok se samo jedan gubi u obliku CO₂ koji se oslobađa tijekom procesa fotorespiracije (Buchanan i sur., 2015).

S druge strane, fotorespiracija je dugo smatrana rasipnim procesom, budući da reakcija oksigenacije enzima RUBISCO potroši molekulu RuBP, a ne rezultira dobitkom iskoristive organske molekule. Također, kao što je ranije navedeno, proces zahtjeva veliki utrošak energije (ATP-a) i redukcijskih ekvivalenata (NAD(P)H). Nasuprot tome, fotorespiracija ima mnogobrojne pozitivne učinke na biljni metabolizam, što ću opisati u sljedećem poglavlju, te čini drugi najveći metabolički tok iza fotosinteze. Zbog uloge u recikliranju ugljika, fotorespiracija se može gledati kao važan metabolički put koji izvlači najbolje iz nepogodne situacije (Peterhansel i sur., 2010).

3.1. REAKCIJE FOTORESPIRACIJE

Recikliranje 2PG nastalo u kloroplastu oksigenaznom aktivnošću RUBISCO-a sastoji se od niza enzimskih reakcija koje se odvijaju u citosolu te trima staničnim odjeljcima: kloroplastu, peroksisomu i mitohondriju (Slika 3), što više puta zahtjeva transmembranski prijenos reakcijskih intermedijera (Bauwe i sur., 2010).

Enzimi ključni za ovaj proces su 2-fosfoglikolat fosfataza (PGP), glikolat oksidaza (GOX), katalaza (CAT), glioksilat-glutamat aminottransferaza (GGT), glicin dekarboksilaza

(GDC), serin-hidroksimetil transferaza (SHMT), serin-glioksilat aminotransferaza (SGT), hidroksipiruvat reduktaza (HPR) i glicerat kinaza (GLYK).

Unutar kloroplasta, enzim 2-fosfoglikolat fosfataza (PGP) katalizira defosforilaciju 2PG u glikolat koji se prenosi iz kloroplasta u peroksisom. Tamo djeluje glikolat oksidaza (GOX), enzim ovisan o flavinu, koji oksidira glikolat u glioksilat uz potrošnju molekule kisika pri čemu, kao nusprodukt, nastaje vodikov peroksid (H_2O_2). Za razgradnju H_2O_2 na kisik i vodu odgovoran je enzim katalaza (CAT) (Bauwe i sur., 2010).

Enzim glutamat-glioksilat aminotransferaza (GGT) katalizira transaminaciju glioksilata u glicin, koristeći glutamat kao donor amino skupine (Bauwe i sur., 2010; Peterhansel i sur., 2010). Glicin se membranskim transportom prenosi u matriks mitohondrija, gdje se odvijaju reakcije pretvorbe dviju molekula glicina u jednu molekulu serina enzimima glicin dekarboksilaza (GDC) i serin-hidroksimetil transferaza (SHMT). GDC je multienzimski kompleks koji katalizira dekarboksilaciju i deaminaciju glicina oslobađanjem CO_2 i NH_3 . U reakciji također nastaje NADH i 5,10-metilentetrahidrofolat koji u reakciji s enzimom SHMT reagira s drugom molekulom glicina pri čemu nastaje serin i tetrahidrofolat (Peterhansel i sur., 2010).

Serin se prenosi u peroksisom gdje se deaminira pomoću serin-glioksilat aminotransferaze (SGT) u hidroksipiruvat koji se reducira u glicerat uz hidroksipiruvat reduktazu (HPR). Za tu reakciju je potreban NADH koji se doprema u peroksisom putem malat-oksaloacetatnog prijenosnika u kojem sudjeluje malat dehidrogenaza (MDH). Nastali glicerat ponovno ulazi u kloroplast gdje se fosforilira djelovanjem glicerat kinaze (GLYK) uz potrošnju jedne molekule ATP-a, čime nastaje 3PGA, molekula kojom završava recikliranje štetnog produkta 2PG iz reakcije oksigenacije RuBP i koja se može uključiti u Calvin-Benson-Basshamov ciklus (Bauwe i sur., 2010; Peterhansel i sur., 2010) (Slika 3).

2010). Produkcija NH_3 za vrijeme odvijanja fotorespiracije je veća nego njegova produkcija primarnom asimilacijom dušika koja se odvija redukcijom nitrata, zbog čega je reasimilacija vrlo važna u održavanju statusa dušika u biljci (Wingler i sur., 2000). Također, reasimilacija NH_3 je potrebna kako bi se izbjegla akumulacija ovog toksičnog produkta (Buchanan i sur., 2015).

U procesu reasimilacije, koji se odvija u kloroplastu, sudjeluju dva enzima, glutamin sintetaza (GS) te feredoksin-ovisna glutamat sintaza (Fd-GOGAT). GS katalizira vezanje NH_3 na glutamat kako bi nastao glutamin što zahtijeva utrošak jedne molekule ATP-a. Fd-GOGAT koristi nastali glutamin za transaminaciju α -ketoglutarata, uz sudjelovanje reduciranog feredoksina, čime se dobiju dvije molekule glutamata. Jedna se koristi za potrebe sljedeće reakcije asimilacije NH_3 , a jedna za sintezu glicina iz glioksilata u peroksisomu tijekom glavnog metaboličkog puta fotorespiracije (Peterhansel i sur., 2010).

3.3. POTROŠNJA ENERGIJE

Fotorespiracija je s obzirom na potrošnju energije rasipan proces, no taj proces osigurava uspješno recikliranje tri četvrtine ugljika nastalog reakcijom oksigenacije enzima RUBISCO (Peterhansel i sur., 2010) i tako se osigurava njihovo iskorištavanje u daljnjim metaboličkim putovima.

Pri recikliranju jedne molekule 2PG i dobivanja 0.5 molekule 3PGA, u reakciji dekarboksilacije glicina otpusti se 0.5 molekula CO_2 i 0.5 molekula NH_3 . Nastali CO_2 se može koristiti u reakciji karboksilacije enzima RUBISCO pa se u tom slučaju u daljnjim reakcijama Calvin-Benson-Basshamovog ciklusa po molekuli CO_2 troši 3 ATP-a i 2 NADPH. NH_3 je potrebno reasimilirati u čemu sudjeluju dva reducirana feredoksina, što je ekvivalentno jednom NAD(P)H, te se troši jedan ATP.

U reakciji redukcije hidroksipiruvata potroši se jedna molekula NADH, no tijekom dekarboksilacije glicina dolazi do produkcije jedne molekule NADH, što na kraju ne dovodi do utroška redukcijskih ekvivalenata.

Po jednoj molekuli 2PG, nastaje 0.5 molekule glicerata za čiju se fosforilaciju u 0.5 molekule 3PGA utroši 0.5 ATP-a. 0.5 molekule 3PGA, uz jednu molekulu 3PGA nastalu inicijalnom reakcijom oksigenacije enzima RUBISCO, koristi se u Calvin-Benson-Basshamovom ciklusu što zahtijeva utrošak energije od 1.5 ATP-a i 1 NADPH po molekuli

3PGA. Ukupni trošak se na kraju svodi na 4.75 ATP-a i 3 redukcijska ekvivalenta, što je prikazano u Tablici 1. Redukcijski ekvivalenti se mogu prevesti u ATP u lancu prijenosa elektrona u mitohondriju pa, računajući da jedan redukcijski ekvivalent iznosi 2.5 ATP-a, ukupni utrošak energije u procesu fotorespiracije iznosi 12.25 ATP-a.

Tablica 1. Prikaz utroška energije i redukcijskih ekvivalenata u pojedinim koracima procesa fotorespiracije; preuzeto i prilagođeno prema Peterhansel i sur., 2010.

	RED. EKV.	ATP
Redukcija 0.5 CO ₂	1	1.5
Reasimilacija 0.5 NH ₃	0.5	0.5
Fosforilacija 0.5 glicerata	0	0.5
Redukcija 1 PGA nastalog u reakciji RUBISCO-a	1	1.5
Redukcija 0.5 PGA nastalog fotorespiracijom	0.5	0.75
	3	4.75
Računajući 2.5 ATP po NAD(P)H	7.5	4.75
UKUPNO		12.25

Reakcijom karboksilacije enzima RUBISCO nastaju dvije molekule 3PGA na koje se za potrebe Calvin-Benson-Basshamovog ciklusa utroši 3 ATP-a i 2 NADPH po molekuli 3PGA, a ukupni utrošak s preračunatim redukcijskih ekvivalentima iznosi 8 ATP-a.

Usporedbom ukupnih troškova energije za oba procesa, jasno je da biljka provođenjem procesa fotorespiracije znatano povećava potrošnju energije tijekom fiksacije CO₂ (Peterhansel i sur., 2010).

4. ULOGA FOTORESPIRACIJE U STRESNIM UVJETIMA

Abiotički stresni uvjeti, kao što su suša, hladnoća, povišena temperatura, salinitet, UV zračenje, izloženost teškim metalima i herbicidima, te biotički stresni uvjeti, kao što su napadi patogeni i herbivora, uzrokuju u biljci specifični fiziološki odgovor koji nazivamo stres. Jedan takav odgovor koji se javlja u svim stresnim uvjetima je nastajanje reaktivnih kisikovih oblika (ROS), tj. oksidacijski stres.

U ROS se ubrajaju slobodni radikali, reaktivne molekule i ioni izvedeni iz O_2 , od kojih su najčešći 1O_2 , $\bullet O_2^-$, H_2O_2 , $\bullet OH$. Oni pri visokim koncentracijama uzrokuju oštećenja lipida, proteina, molekule DNA te izmjenu svojstava membrana kao što su fluidnost i transport iona što može rezultirati staničnom smrću, no pri umjerenim koncentracijama mogu imati i signalnu ulogu koja posreduje između različitih staničnih odgovora na stres (Sharma i sur., 2012).

ROS kontinuirano nastaju kao nusprodukti metaboličkih procesa kao što su respiracija u mitohondrijima, fotosinteza u kloroplastima i različite reakcije u mikrotjelešcima, npr. peroksisomima. U normalnim uvjetima, te molekule se uklanjaju antioksidacijskim mehanizmima. No, stresni uvjeti mogu narušiti ravnotežu između nastajanja ROS i njihovog uklanjanja zbog čega dolazi do porasta njihove koncentracije (Apel i Hirt, 2004) te se biljne stanice tada nalaze u stanju oksidacijskog stresa (Sharma i sur., 2012).

Svjetlosna energija pokreće lanac prijenosa elektrona koji omogućuje redukciju $NADP^+$ u $NADPH$ i stvara protonski gradijent koji dovodi do nastajanja ATP-a. $NADPH$ i ATP koriste se u asimilaciji CO_2 u Calvin-Benson-Basshamovom ciklusu. Lanac prijenosa elektrona u kloroplastima je veliki izvor ROS. U normalnim uvjetima, tok elektrona u lancu prijenosa elektrona u kloroplastu reducira $NADP^+$ u $NADPH$ (Sharma i sur., 2012). U stresnim uvjetima poput visoke temperature, suše i zatvorenih puči, količina $NADPH$ nastalog tijekom svjetlosnih reakcija fotosinteze može biti viša nego količina koja se može iskoristiti u Calvin-Benson-Basshamovom ciklusu. Iz tog razloga ponestane $NADP^+$ koji bi bio raspoloživ za primanje elektrona u lancu prijenosa elektrona te je veća mogućnost da elektron reagira s kisikom pri čemu nastaju ROS. Zbog toga je potrebno $NADPH$ iskoristiti i u drugim procesima kako se elektroni ne bi učestalo prenosili na akceptore poput O_2 , i doveli do stvaranja ROS (Peterhansel i sur., 2010).

Kao jedan od načina na koji biljka može smanjiti utjecaj oksidacijskog stresa, spominje se i fotorespiracija. U sljedećim potpoglavljima, opisat ću mehanizme kojima se to

odvija, kao i ulogu fotorespiracije u optimiziranju fotosinteze te njezinu povezanost s biljnim metabolizmom u cjelini.

4.1. ISKORIŠTAVANJE SUVIŠKA SVJETLOSNE ENERGIJE

Proces fotorespiracije se pokazao vrlo učinkovitim u uvjetima u kojima nastaju suvišne količine energije i redukcijskih ekvivalenata koji se ne mogu na druge načine potrošiti. U procesu fotorespiracije se iskorištavaju molekule NADPH, NADH i ATP pri čemu se regeneriraju molekule NADP⁺, NAD⁺ i ADP. Pretvorbom glicerata u 3PGA, troši se jedna molekula ATP-a, a reasimilacijom NH₃, koji je nastao dekarboksilacijom glicina, iskorištavaju se redukcijski ekvivalenti te ATP. Na taj se način, procesom fotorespiracije, uklanja suvišak redukcijskih ekvivalenata i energije što pridonosi smanjenju produkcije ROS (Voss i sur., 2013).

Uvjeti suše dovode do zatvaranja puči kako bi se izbjegao gubitak vode. Zatvaranje puči rezultira smanjenjem difuzije CO₂ u listove. U takvim uvjetima smanjene razine CO₂ u listovima izraženija je oksigenazna aktivnost RUBISCO-a, a time i viša stopa fotorespiracije. Prema Voss i sur. (2013), postotak asimilacije CO₂ u biljkama rajčice se smanjio, dok se fotorespiracija povećala s 23% na 40%. Također, zabilježeno je povećanje koncentracije glicina, koji nastaje procesom fotorespiracije i koji služi kao supstrat u biosintezi glutationa, važnog antioksidansa u sustavu za obranu u uvjetima oksidacijskog stresa. Nadalje, fotorespiracijom nastaje 70% ukupnog H₂O₂ koji služi za signalizaciju i induciranje obrambenog odgovora. Sve navedeno upućuje na važnu ulogu fotorespiracije u adaptaciji na sušu (Voss i sur., 2013).

Visoki salinitet također uzrokuje manjak vode u biljci zbog niskog osmotskog potencijala tla što dovodi do zatvaranja puči te ograničene difuzije CO₂ u lisni mezofil (Chaves i sur., 2008). To upućuje da se fotorespiracija može inducirati i u uvjetima visokog saliniteta, sličnim mehanizmom kao u uvjetima suše. Prema Voss i sur. (2013), dokazan je porast enzima ključnih za proces fotorespiracije te koncentracije nekih od intermedijera koji su poslužili kao indikator fotorespiracije, npr. glicina i glioksilata. Ovi pokazatelji idu u prilog tvrdnji da fotorespiracija ima ulogu u potrošnji suvišne energije kako bi se smanjilo oštećenje oksidacijskim stresom (Voss i sur., 2013).

U uvjetima niskih temperatura, raste topljivost O₂ te njegov unos u biljnu stanicu što ima za posljedicu povećanje fotorespiracije (Voss i sur., 2013). Prema Sharma i sur. (2012),

hladnoća umanjuje količinu i aktivnost RUBISCO-a čime se inhibira Calvin-Benson-Basshamov ciklus te narušava ravnoteža između apsorpcije svjetlosti i njezinog iskorištavanja. Prema Voss i sur. (2013), hladnoća uzrokuje povećavanje razine određenih enzima koji sudjeluju u procesu fotorespiracije, poput GOX, HPR i CAT, što ukazuje da fotorespiracija i u uvjetima hladnoće ima ulogu u potrošnji suviška energije.

Jedan od utjecaja teških metala na biljku je oštećenje fotosintetskog sustava. Pokazano je da teški metali negativno utječu na komponente reakcija na svjetlu i reakcija fiksacije CO₂ (Sharma i sur., 2012). Prema Voss i sur. (2013), izlaganje teškim metalima uzrokovalo je indukciju ekspresije enzima HPR što ukazuje na povećanje stope fotorespiracije. Svi navedeni primjeri pokazuju važnost procesa fotorespiracije u direktnom odgovoru na stres.

Također, kako bi se što bolje razumjela uloga fotorespiracije, provedena su istraživanja na mutantama s izmijenjenim enzimima važnim za proces fotorespiracije i metaboličke putove koji su s njim povezani. Prema Voss i sur. (2013), postoji *aox-1A* mutanta biljke *Arabidopsis thaliana* koja ima izmijenjenu mitohondrijsku alternativnu oksidazu (AOX). To je enzim koji je zaslužan za preusmjeravanje toka elektrona na O₂, u uvjetima kada su komponente lanca prijenosa elektrona u mitohondriju preopterećene pa postoji uvećani rizik nastanka ROS (Buchanan i sur., 2015). U takvoj je mutanti dokazana povećana akumulacija ROS, ali i indukcija fotorespiracije kako bi se na taj način nadomjestio gubitak AOX. U eksperimentu s *cat2* mutantom biljke *A. thaliana*, koja ima izmijenjen enzim CAT, došlo je do zaostataka u rastu i promjene fenotipa, a stanice su pokazivale povećanu količinu H₂O₂ i izmijenjen redoks status stanice. Prema tome, mutante koje ne mogu pravilno provoditi fotorespiraciju su jako osjetljive na stres što potvrđuje značajnu ulogu fotorespiracije u stresnim uvjetima. Također, pokazalo se da postoje povezani metabolički putovi zaslužni za uspostavljanje ravnoteže redoks statusa biljke i zaštitu od oštećenja putem ROS u stresnim uvjetima (Voss i sur., 2013).

4.2. ZAŠTITA OD FOTOINHIBICIJE

Uz ulogu u ranije opisanoj potrošnji energije, fotorespiracija se povezuje i sa zaštitom fotosustava od fotoinhibicije. Fotoinhibicija je pojam koji opisuje stanje smanjene učinkovitosti fotosinteze u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti. Iako je svjetlost izvor energije, može uzrokovati narušavanje lanca prijenosa elektrona i oštećenje fotosintetskog aparata, a posebno PSII. Osobito su sklони oštećenjima proteini D1 i D2 koji su važne sastavnice reakcijskog središta PSII. Kada nastupi oštećenje proteina D1, uključuje se ciklus

popravka, no u slučajevima svjetlosnog oštećenja PSII koje nadilazi brzinu popravka, dolazi do fotoinhibicije. Pretjerano pobuđivanje klorofila, također dovodi do fotoinhibicije jer dolazi do stvaranja tripletnog klorofila i ROS što uzrokuje oštećenja sastavnica fotosintetskog aparata (Buchanan i sur., 2015).

Prema Wingler i sur. (2000) te prema Kozaki i Takeba (1997), fotorespiracija, uz ulogu u uklanjanju viška energije i sprječavanju nastanka ROS, ima ulogu i u poboljšavanju toka elektrona u lancu prijenosa elektrona. Potrošnjom NADPH i regeneriranjem akceptora elektrona NADP^+ , održava se dinamika toka elektrona u lancu prijenosa elektrona, kao i procesi u PSII – kompleksima antena i reakcijskom središtu. Optimalnim korištenjem energije u lancu prijenosa elektrona umanjuje se nastanak ROS. Budući da je fotorespiracija jedan od procesa u kojima se troši NADPH, ona sudjeluje u sprječavanju nastanka suvišnih ROS i fotoinhibicije. Također, u tilakoidnim membranama kloroplasta uspostavlja se i ciklički tok elektrona u kojem ne nastaje NADPH, a stvara se ATP. Stoga i taj proces doprinosi uspostavljanju ravnoteže u uvjetima nedostatka akceptora elektrona, NADP^+ (Voss i sur., 2013).

4.3. SMANJIVANJE STOPE REAKCIJE OKSIGENACIJE ENZIMA RUBISCO

U procesu fotorespiracije, dekarboksilacijom glicina, oslobađa se CO_2 kojeg može iskoristiti enzim RUBISCO i pritom smanjiti stopu reakcije oksigenacije. U stresnim uvjetima pri kojima je zbog zatvaranja puči ograničena difuzija CO_2 , fotorespiracija na taj način može doprinijeti povećavanju njegove količine unutar stanica (Voss i sur., 2013).

4.4. PRIJENOS SIGNALA

Fotorespiracija je izvor H_2O_2 koji nastaje oksidacijom glikolata u peroksisomima. Poznato je da H_2O_2 ima ulogu u prijenosu signala i induciranju odgovora na abiotički i biotički stres. Zaslužan je za aktiviranje obrambenog odgovora pri napadu patogena te inducira učvršćivanje stanične stijenke, a svojim reaktivnim potencijalom direktno uzrokuje štetu u stanicama patogena. Budući da se tijekom procesa fotorespiracije stvaraju velike količine H_2O_2 , moguća je njegova uloga u aktiviranju određenih gena uključenih u detoksifikaciju ROS i

aklimatizaciju biljaka na buduće nepogodne uvjete (Peterhansel i sur., 2010; Voss i sur., 2013).

Iako tijekom fotorespiracije nastaje H_2O_2 , što je kontradiktorno tvrdnji da fotorespiracija ima ulogu u smanjivanju ROS, djelovanjem katalaze njegova koncentracija se može održati u količinama koje neće naštetiti biljci. Također, pokazano je da u stresnim uvjetima može doći do povećanja broja peroksisoma u stanici što doprinosi održavanju ravnoteže stvaranja i razgradnje H_2O_2 (Voss i sur., 2013).

4.5. UKLANJANJE TOKSIČNIH INTERMEDIJERA

Fotorespiracija je jedini proces koji biljci omogućuje uklanjanje 2PG koji bi se u suprotnom nakupljao. Poznato je da 2PG inhibira trioza-fosfat izomerazu i fosfofruktokinazu (Peterhansel i sur., 2010), enzime koji su ključni u regeneriranju RuBP za nastavak odvijanja Calvin-Benson-Basshamovog ciklusa (Buchanan i sur., 2015). Nadalje, gliksilat je pokazan kao inhibitor aktivacije enzima RUBISCO, što potvrđuje prisutnost enzima gliksilat reductaze u citosolu i kloroplastu čija je moguća uloga u uklanjanju suviška gliksilata oslobođenog iz peroksisoma (Peterhansel i sur., 2010).

Suprotno navedenom, moguća je uloga 2PG i gliksilata i u smanjivanju aktivnosti RUBISCO-a u uvjetima u kojim stopa fotorespiracije ne može pratiti stopu oksigenazne aktivnosti RUBISCO-a. To je izraženo u uvjetima nedostatka dušika pri kojima je smanjena konverzija gliksilata u glicin. U takvim nepogodnim uvjetima, opada stopa i fotosinteze i fotorespiracije. Prema svemu navedenom uočava se važnost fotorespiracije u uklanjanju toksičnih intermedijera te reguliranju njihovih koncentracija (Peterhansel i sur., 2010).

4.6. ULOGA U PRODUKCIJI SPECIFIČNIH METABOLITA

Većina fotorespiracijskih intermedijera sudjeluje i u drugim metaboličkim putovima. Fotorespiracija pridonosi sintezi određenih aminokiselina. Konverzijom glicina u serin unutar mitohondrija, biljke se opskrbljuju serinom za metaboličke procese poput sinteze metionina (Peterhansel i sur., 2010).

Fotorespiracija može imati ulogu i u produkciji glutaciona. Glutacion je u biljkama važan antioksidans koji ima značajnu ulogu u obrani od oksidativnog oštećenja (Buchanan i sur.,

2015). Važan supstrat za biosintezu glutationa je glicin koji se proizvodi tijekom fotorespiracije. Dokazano je da u uvjetima vodnog stresa dolazi do akumulacije glicina, što nije bilo prisutno u normalnim uvjetima (Voss i sur., 2013). Također, budući da se u uvjetima stresa povećaju potrebe za glutationom, glicin koji se sintetizira tijekom fotorespiracije može se koristiti za namirivanje te potrebe (Peterhansel i sur., 2010). Prema navedenim podacima, potvrđuje se uloga fotorepiracije u sintezi intermedijera koji se mogu koristiti u drugim metaboličkim putovima (Noctor i Foyer, 1998).

Također, fotorespiracija je povezana s metabolizmom dušika. Kao što je ranije opisano, fotorespiracijom nastaje NH_3 koji se procesom reasimilacije ugrađuje u organske spojeve. No, prema Peterhansel i sur. (2010), predložen je mehanizam kojim fotorespiracija sudjeluje u osiguravanju redukcijskih ekvivalenata za redukciju nitrata u citosolu. Redukcijski ekvivalenti se prenose u peroksisom iz kloroplasta putem malat-oksaloacetatnog prijenosnika (Tobin, 1992.) za potrebe redukcije hidroksipiruvata u glicerat te postoji mogućnost preusmjeravanja dijela tih redukcijskih ekvivalenata za redukciju nitrata.

5. ZAKLJUČAK

U ovom pregledu, opisane su moguće uloge fotorespiracije tijekom izloženosti biljaka djelovanju stresnih uvjeta. Fotorespiracija je dugo smatrana rasipnim i energetski zahtjevnim procesom za biljku te je gledana kao negativna posljedica oksigenazne aktivnosti enzima RUBISCO. No, ne mogu se zanemariti brojni dokazi njezinih pozitivnih učinaka.

Glavna uloga fotorespiracije je pretvaranje molekule 2-fosfoglikolata u oblik koji se može iskoristiti u drugim metaboličkim putovima. Osim njezine glavne uloge razmotrena je važnost i položaj fotorespiracije u široj metaboličkoj mreži te posebno njen utjecaj na ublažavanje oksidacijskog stresa. Ukazano je na njezinu važnu ulogu u potrošnji suviška energije nastale u svjetlosnim reakcijama fotosinteze iskorištavanjem molekula NAD(P)H i ATP pri čemu se regeneriraju molekule NAD(P)⁺ i ADP. Također, važna je njena uloga u prevenciji oštećenja PSII i fotoinhibicije. Fotorespiracija sprječava nastajanje ROS te indirektno pomaže u njihovom uklanjanju povećavajući produkciju glutationa i šaljući signale za indukciju obrambenog odgovora putem H₂O₂. Prijenosom signala sudjeluje i u aklimatizaciji biljke na nadolazeće nepovoljne okolišne uvjete. Nadalje, opisana je njezina povezanost s drugim metaboličkim putovima u stanici kao što je sinteza aminokiselina i asimilacija NH₃. Fotorespiracija, također, smanjuje stopu reakcije oksigenacije enzima RUBISCO povećavajući količinu CO₂ unutar stanica. Uz to, fotorespiracija povezuje tri unutarstanična odjeljka, kloroplast, mitohondrij i peroksisom s citosolom što može pomoći u održavanju metaboličke ravnoteže unutar biljne stanice.

S obzirom na sve navedene dokaze, može se zaključiti kako je fotorespiracija ključan proces biljnog metabolizma koji ima važnu ulogu tijekom izlaganja biljke stresnim uvjetima te je kao takav integriran u širu metaboličku mrežu. No, sami mehanizmi djelovanja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni te će njihovo razumijevanje značajno pridonijeti našoj spoznaji o funkcioniranju biljnog metabolizma u cjelini.

6. LITERATURA

- Andersson, I., Backlund, A. (2008): Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 275–291.
- Apel, K., Hirt, H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 373–399.
- Bauwe, H., Hagemann, M., Fernie, A. R. (2010): Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science*, **15**, 330–336.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2015): Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Biologists*, 2nd Edition.
- Chaves, M. M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2008): Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, **103**, 551–560.
- Kozaki, A., Takeba, G. (1996): Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature*, **384**, 557–560.
- Noctor, G., Foyer, C. H. (1998): Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**, 249–279.
- Peterhansel, C., Horst, I., Niessen, M., Blume, C., Kebeish, R., Kürkcüoglu, S., Kreuzaler, F. (2010): Photorespiration. *The Arabidopsis Book*, **8**, e0130
- Pevalek-Kozlina, B. (2003): Fiziologija bilja. *Profil International*, Zagreb
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, **2012**, 1–26.
- Tobin, A. K., ed. (1992): Plant Organelles: Compartmentation of Metabolism in Photosynthetic Tissue. *Cambridge University Press*, vol. 50.
- Voss, I., Sunil, B., Scheibe, R., Raghavendra, A. S. (2013): Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biology*, **15**, 713–722.

Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P., Leegood, R. C. (2000): Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **355**, 1517–1529.

http://parts.igem.org/Part:BBa_K2201263

<https://www.chegg.com/homework-help/cost-making-amino-acids-atp-equivalents-calculated-using-val-chapter-17-problem-16p-solution-9780321830562-exc>

7. SAŽETAK

Fotorespiracija je metabolički proces potaknut reakcijom oksigenacije enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze. U toj se reakciji umjesto ugljikova dioksida, na ribulozu-1,5-bisfosfat veže molekularni kisik. To dovodi do nastajanja 2-fosfoglikolata koji se reciklira tijekom fotorespiracije. Cilj je nastanak 3-fosfoglicerata, ugljikovog spoja koji može nastaviti svoj put u Calvin-Benson-Basshamovom ciklusu. Fotorespiracija troši energiju i redukcijske ekvivalente, stoga je smatrana rasipnim procesom. Međutim, ona ima važnu ulogu u odgovoru biljke na stresne uvjete. Izlaganjem stresnim uvjetima, dolazi do produkcije reaktivnih kisikovih oblika (ROS), u čijem uklanjanju sudjeluje niz staničnih mehanizama za obranu. U ovom radu predstavljena je uloga fotorespiracije u potrošnji viška energije što dovodi do smanjenja produkcije ROS u stanici i do sprječavanja fotoinhibicije. Nadalje, fotorespiracija kao integriran proces u biljnom metabolizmu sudjeluje u produkciji specifičnih metabolita i uklanjanju toksičnih intermedijera. Također, ima ulogu u prijenosu signala i induciranju obrambenog odgovora na stres, a inducira i aklimatizaciju biljaka na nepovoljne uvjete. Predstavljani su rezultati istraživanja uloge fotorespiracije u određenim stresnim uvjetima kao što su suša, povišen salinitet, hladnoća te teški metali, a prikazani su i neki od pokusa s mutantama koji su doveli do boljeg razumijevanja uloge fotorespiracije.

8. SUMMARY

Photorespiration is a metabolic process initiated by the oxygenation reaction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. In this reaction, molecular oxygen binds to ribulose-1,5-bisphosphate instead of carbon dioxide. This leads to production of 2-phosphoglycolate which is recycled by photorespiration. The goal is the production of 3-phosphoglycerate, a carbon compound that can continue its way in the Calvin-Benson-Bassham cycle. Photorespiration consumes energy and reducing equivalents and was consequently considered as wasteful. However, it plays an important role in the response of plants to stressful conditions. When exposed to stress, plants produce reactive oxygen species (ROS), which are detoxified by numerous cellular mechanisms. This paper presents the role of photorespiration in dissipating excess energy which decreases the production of ROS in cell and prevents photoinhibition. Furthermore, as an integrated process in the plant metabolism, photorespiration participates in the production of specific metabolites and removal of toxic intermediates. It has a role in signals transduction and induction of stress defence response and it also induces acclimatization to unfavourable conditions. Research of the role of photorespiration in

specific stressful conditions, such as drought, salinity, chilling and metal toxicity, is presented, including also experiments with metabolic mutants.