

OXIDATIVNÍ STRES: LOKALIZACE TVORBY AKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU A JEJICH DEGRADACE V ROSTLINNÉM ORGANISMU

JANA PITERKOVÁ^a, KATEŘINA TOMÁNKOVÁ^{a,b},
LENKA LUHOVÁ^a, MAREK PETŘIVALSKÝ^a
a PAVEL PEČ^a

^aKatedra biochemie a ^bKatedra botaniky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Česká republika
luhova@prfholnt.upol.cz

Došlo 14.1.05, přijato 2.4.05.

Klíčová slova: aktivní formy kyslíku, oxidativní stres, antioxidanty, β -karoten, α -tokoferol, askorbát, askorbát-glutathionový cyklus, glutathionperoxidasa, katalasa, askorbátperoxidasa, superoxididmutasa, peroxidasa, NADPH-oxidasa, aminoxidasa, cytochrom P450

Obsah

1. Úvod
2. Stresové faktory a mechanismy odolnosti rostlin
3. Aktivní formy kyslíku
4. Neenzymová produkce aktivních forem kyslíku
5. Enzymová produkce aktivních forem kyslíku
6. Lokalizace produkce aktivních forem kyslíku v rostlinném organismu
 - 6.1. Chloroplasty
 - 6.2. Mitochondrie
 - 6.3. Peroxisomy
 - 6.4. Endoplazmatické retikulum
 - 6.5. Plazmatická membrána
 - 6.6. Buněčná stěna
 - 6.7. Apoplast
7. Katabolismus aktivních forem kyslíku
 - 7.1. Antioxidanty
 - 7.1.1. L-askorbát
 - 7.1.2. Karotenoidy
 - 7.1.3. Redukovaný glutathion
 - 7.1.4. α -Tokoferol
 - 7.2. Antioxidační enzymy
 - 7.2.1. Superoxididmutasa
 - 7.2.2. Katalasa
 - 7.2.3. Enzymy askorbát-glutathionového cyklu
 - 7.2.4. Glutathionperoxidasy
8. Závěr

1. Úvod

Rostliny jsou v průběhu svého života vystavovány působení řady stresových faktorů, které mohou nejen zpomalovat jejich životní funkce, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést až k uhynutí rostliny. Stresové faktory mohou být biotické (útok patogena, negativní působení okolních organismů, stárnutí) nebo abiotické povahy (herbicidy, intenzivní světlo, teplo, chlad, mráz, těžké kovy, sucho, ozón).

Působení stresových faktorů může vyvolat u rostlin oxidativní stres, charakteristický prudkou přechodnou tvorbou velkého množství aktivních forem kyslíku (AFK)^{1,2}. Dochází k porušení rovnováhy mezi produkcí a odbouráváním AFK (cit.³). Zdrojem AFK je řada redoxních reakcí jako např. redukce kyslíku v průběhu elektronového transportu v mitochondriích nebo fotolýza vody chloroplastovým elektronovým transportním řetězcem. Produkce singletového kyslíku následně stimuluje vznik dalších aktivních forem kyslíku, tj. peroxidu vodíku, superoxidového nebo hydroxylového radikálu⁴. Tyto reaktivní molekuly, zejména hydroxylový radikál, působí destruktivně na lipidy, nukleové kyseliny a proteiny. AFK nejsou jen toxickými vedlejšími produkty metabolismu, ale fungují také jako signální molekuly kontrolující obranné procesy rostlinného organismu a hrají významnou roli v procesu programované buněčné smrti⁵⁻⁷. AFK mají přímý toxický účinek na patogení organismus^{8,9} a podílejí se aktivně na strukturálním zesílení rostlinné buněčné stěny^{10,11}.

Ochranu před oxidačním poškozením organismu aktivními formami kyslíku zajišťuje řada antioxidačních obranných systémů lokalizovaných v různých buněčných strukturách. Antioxidační obranné mechanismy zahrnují neenzymové a enzymové systémy. Mezi velmi účinné antioxidanty řadíme askorbát, β -karoten, redukovaný glutathion a α -tokoferol^{12,13}. Specializované enzymy jako superoxididmutasa (EC 1.15.1.1), peroxidasa (EC 1.11.1.7), katalasa (EC 1.11.1.6) a enzymy askorbát-glutathionového cyklu zabezpečují univerzální obranu rostlin^{14,15}.

2. Stresové faktory a mechanismy odolnosti rostlin

Proměnlivé podmínky vnějšího prostředí často negativně působí na rostliny, které se pod tlakem nejrůznějších nepříznivých vlivů (stresorů) ocitají ve stresu. Stres je dynamický komplex mnoha reakcí.

Výzkum vztahů mezi vnějším prostředím a stresovými reakcemi rostlin obvykle začíná studiem přenosu podnětů vyvolávajících stres na rozhraní orgánů rostliny s vnějším prostředím a dále pak přenosem signálů uvnitř rostliny. Mechanismy odolnosti proti stresu lze obecně

rozdělit do dvou kategorií¹⁶. Prvními jsou mechanismy zabraňující tomu, aby byla hostitelská rostlina vystavena stresu („avoidance mechanisms“). Tento způsob obrany zahrnuje mechanickou bariéru rostlin, která má převážně pasivní a dlouhodobý charakter (např. silná kutikula na listech, výrazná impregnace buněčných stěn, rezervoáry vody a řada organických látek).

Druhou skupinu obranných mechanismů tvoří tzv. aktivní obrana rostlin („tolerance mechanisms“), která omezuje negativní dopad stresorů až po jejich proniknutí k plazmatické membráně buněk a do symplastu. V takovém případě dochází ke spuštění řetězce změn, označovaného jako stresová reakce. Průběh a výsledek stresové reakce závisí jednak na intenzitě a délce působení stresového faktoru, jednak na rostlině samotné (stadium vývoje, vitalita, genotyp, adaptační schopnosti). Studium vlivu stresu na rostliny v přírodních podmínkách je komplikováno tím, že často působí současně více stresových faktorů. Působení stresorů bývá také obvykle omezeno pouze na část rostliny, ve které dochází k lokální stresové reakci, ale ta může druhotně způsobovat stres i v ostatních orgánech.

3. Aktivní formy kyslíku

Přehled aktivních forem kyslíku je uveden v tabulce I. Za normálních růstových podmínek je produkce aktivních forem kyslíku v buňce nízká (např. v chloroplastu $240 \mu\text{mol s}^{-1} \text{O}_2^{\cdot-}$). Působí-li na rostlinu stresové faktory, které naruší její buněčnou homeostázu, dochází k výraznému zvýšení koncentrace AFK v buňce (např. v chloroplastu až $720 \mu\text{mol s}^{-1} \text{O}_2^{\cdot-}$) (cit.²).

Aktivní formy kyslíku hrají v biologických systémech dvojí roli: *i*) slouží jako signální molekuly pro expresi

Tabulka I
Značení a molekulární struktury aktivních forem kyslíku v rostlinách

Sloučenina	Zkrácené značení	Struktura
Singletový kyslík	$^1\text{O}_2$	O-O:
Superoxidový anion-radikál	$\text{O}_2^{\cdot-}$	$[\ddot{\text{O}}=\ddot{\text{O}}]^-$
Hydroxylový radikál	OH^\cdot	$\ddot{\text{O}}-\text{H}$
Hydroxylový ion	OH^-	$\ddot{\text{O}}-\text{H}$
Perhydroxylový radikál	O_2H^\cdot	$\ddot{\text{O}}=\ddot{\text{O}}-\text{H}$
Peroxid vodíku	H_2O_2	$\text{H}-\ddot{\text{O}}-\ddot{\text{O}}-\text{H}$

genů, *ii*) jako toxické meziproducty aerobního metabolismu způsobují poškození či zánik buňky¹⁷. Reakci s nenasycenými mastnými kyselinami dochází k peroxidaci esenciálních membránových lipidů v plazmalemě nebo v intracelulárních organelách¹⁸. Peroxidační poškození plazmalemy vede k úniku buněčného obsahu a k buněčné smrti. Intracelulární poškození membrány ovlivňuje respirační aktivitu mitochondrie a způsobuje také ztrátu schopnosti chloroplastu fixovat CO_2 (cit.¹). Aktivní formy kyslíku mohou inaktivovat enzymy, oxidovat proteiny a poškozovat DNA a RNA. V důsledku uvedených reakcí nastává buněčná smrt. Zvýšená koncentrace AFK je důležitým jevem pro vznik hypersensitivní reakce rostlin a následnou programovanou buněčnou smrt¹⁹.

Přehled zdrojů a biologických účinků AFK je shrnut v tab. II (cit.¹). V biologických systémech jsou AFK produkovány cestou enzymových a neenzymových reakcí.

4. Neenzymová produkce aktivních forem kyslíku

Přítomnost molekulárního kyslíku, nezbytného pro existenci aerobních organismů byla ze všech planet Sluneční soustavy prokázána pouze na Zemi. Kyslík v atmosféře Země (21 % O_2) je tvořen v průběhu fotosyntézy kyanobakteriemi a rostlinami¹.

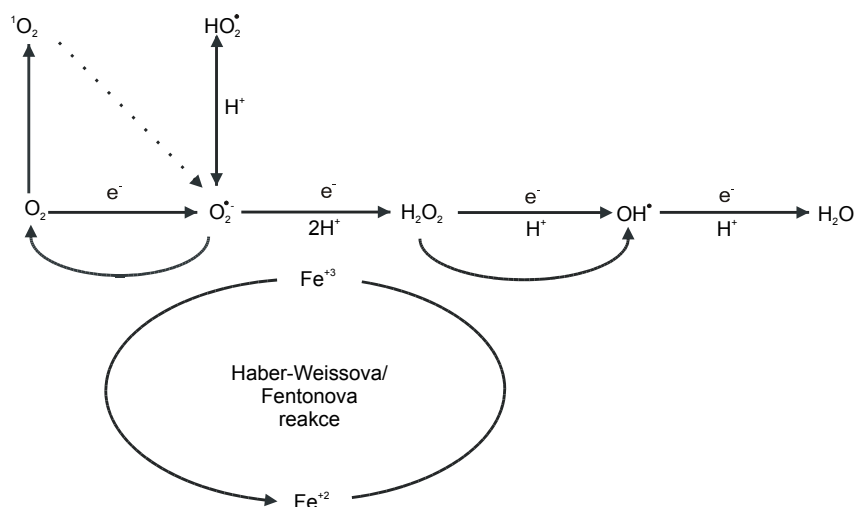
Atmosférický kyslík v základním stavu se od ostatních plynných prvků liší tím, že je biradikál, jinými slovy obsahuje dva nepárové elektrony. Tato vlastnost způsobuje jeho paramagnetismus. Požadavek aktivace hraje významnou roli, neboť nepárové elektrony molekuly kyslíku mají paralelní spin, což podle Pauliho principu zabraňuje reakcím s bivalentním reduktantem. Reakce by mohla probíhat pouze za předpokladu, že tento reduktant má také dva nepárové elektrony s paralelním spinem, ale opačné orientace k tomu, který má molekulární kyslík. Tato pravděpodobnost je však velmi malá.

Molekulární kyslík je tedy poměrně málo reaktivní²⁰. Jeho aktivace probíhá různými mechanismy (obr. 1). Prvním z nich je absorpce dostatečné energie potřebné k obrácení spinu jednoho z nepárových elektronů. Hodnota této energie je 22 kJ mol^{-1} a je získána přenosem excitační energie světelných kvant pigmenty fotosyntetického reakčního centra¹. Vzniklý singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) je ve srovnání s molekulárním kyslíkem velmi reaktivní. Doba jeho života je $4 \mu\text{s}$ ve vodě a $100 \mu\text{s}$ v nepolárním prostředí. Singletový kyslík může svou excitační energii přenést buď na jiné biologické molekuly, nebo s nimi může reagovat za vzniku hydroperoxidů⁴. Druhým mechanismem je aktivace kyslíku jednoelektronovou redukcí, kdy dochází ke tvorbě superoxidu ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxidu vodíku (H_2O_2), hydroxylového radikálu (OH^\cdot) a vody podle schématu na obr. 1.

Celková redukce molekulárního kyslíku na vodu vyžaduje čtyři elektrony a je vždy doprovázená postupnou jedno až tří elektronovou redukcí, kdy dochází ke tvorbě superoxidového radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylové-

Tabulka II
Přehled zdrojů a biologických účinků aktivních forem kyslíku^{1,30,31,50, 51,52}

Forma kyslíku	Zdroj	Biologický efekt
O ₂	atmosferický kyslík, PSII, různé enzymy (superoxiddismutasa, katalasa)	inhibice fotosyntézy (preference oxygenasové reakce ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasy/oxygenasy), náhodná produkce volných radikálů
O ₂ ⁻	osvětlené chloroplasty, PSII a PSI, mitochondrie v přítomnosti NADH, Fe-S proteiny, cytochrom P450, elektronový transportní řetězec v endoplasmatickém retikulu, herbicidy (paraquat a nitrofen), enzymové reakce: xanthinoxidasa, NAD(P)H oxidasa, aldehydoxidasa, urikáza (EC 1.7.3.3).	peroxidace lipidů, inaktivace enzymů, depolymerizace polysacharidů, reakce s H ₂ O ₂ za tvorby OH [•] , schopnost oxidovat síru, askorbát a NADPH, redukovat cytochrom c a ionty kovů
H ₂ O ₂	glykolát oxidasa v glyoxysomech, osvětlené chloroplasty - PSII, mitochondrie v přítomnosti NADH, β-oxidace mastných kyselin, Fe-S proteiny a enzymové reakce (SOD, glykolát oxidasa, aminoxidasa, oxalát oxidasa (EC 1.2.3.4), peroxidasy...)	inhibice fixace CO ₂ , inaktivace enzymů Calvinova cyklu, oxidace sulhydrylů a flavonolů, substrát oxidační reakce
OH [•]	Haberova-Weissova reakce, Fentonova reakce	velmi silné oxidační činidlo, poškození DNA, peroxidace lipidů, degradace proteinů, produkce C ₂ H ₄
¹ O ₂	excitované chlorofylové molekuly v tripletovém stavu, znečištění vzduchu (NO ₂ , O ₃ , atd.)	mutageneze, peroxidace lipidů, fotooxidace aminokyselin



Obr. 1. Celková redukce molekulárního kyslíku na vodu vyžaduje čtyři elektrony a je vždy doprovázená postupnou jedno až tři elektronovou redukcí, kdy dochází ke tvorbě superoxidového radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu⁴

ho radikálu⁴. Reakční řetězec vyžaduje iniciaci v prvním kroku, zatímco následné kroky jsou exotermní a mohou tedy probíhat samovolně²¹.

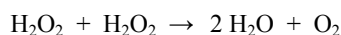
První reakce představuje univalentní redukcí molekulárního kyslíku vedoucí ke tvorbě superoxidového anionradikálu (O₂⁻)²². Superoxid je mírně reaktivní, krátce žijící forma kyslíku s poločasem života přibližně 2–4 μs. Neprochází přes biologické membrány⁴ a funguje jako oxidační i redukční činidlo. Oxiduje např. síru, askorbát, NADPH,

některé aminokyseliny (histidin, methionin, tryptofan)²¹, redukováný cytochrom c, chinony a komplexy přechodných kovů, čímž ovlivňuje aktivitu metaloenzymů⁴. V živých buňkách existuje superoxidový radikál v rovnováze se svou protonovanou formou, perhydroxylovým radikálem (O₂H[•]). Ten je více hydrofobní než superoxid a může tedy jednodušeji proniknout lipidovou dvojitou membránou, kde odebrá protony z polynenasycených mastných kyselin a lipidových hydroperoxidů,

čímž zahajuje oxidaci lipidů⁴. Ve vodném rozpouštědle, v neutrálním nebo mírně kyselém pH tento radikál v obou formách dismutuje na peroxid vodíku a kyslík²³. Reakce probíhá samovolně nebo za katalýzy enzymem superoxid-dismutasou.

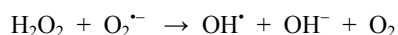
Druhá redukce kyslíku produkuje peroxid vodíku, což je poměrně stabilní molekula s poločasem života 1 ms (cit.⁴). Peroxid vodíku je schopen procházet přes buněčnou membránu. Nově vzniklý H₂O₂ v rostlinné buňce může být:

- a) disproportionován na vodu a kyslík v reakci katalyzované katalasou,

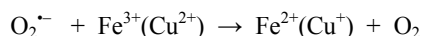
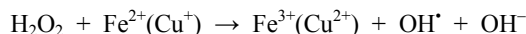


- b) použit jako substrát různých peroxidas,
c) detoxifikován askorbátperoxidasou (EC 1.11.1.11), která působí spolu s dehydroaskorbátreduktasou (EC 1.8.5.1) a glutathionreduktasou (EC 1.8.1.7) v Halliwellově-Asadově dráze²³.

Třetí reakce je velmi důležitá z hlediska oxidativního stresu. Jde o tříelektronovou redukci molekulárního kyslíku, kdy je produkována nejreaktivnější forma kyslíku – hydroxylový radikál²², který se může tvořit přímou reakcí v tzv. Haberově-Weissově reakci peroxidu vodíku a superoxidu²⁴:



Za normálních podmínek se jedná o pomalou reakci, která není účinná v tvorbě značného množství hydroxylového radikálu. Dostatečné množství se však může tvořit cyklem Fentonovy reakce zahrnující oxidaci přechodných kovů, jako jsou železnaté nebo měďné ionty^{25,26}:



Následná regenerace oxidovaných iontů na jejich redukováný stav probíhá cestou reakce se superoxidovým radikálem. Lokalizace a dostupnost přechodných kovů s katalytickým účinkem ve Fentonově reakci jsou pravděpodobně hlavními faktory určujícími místo tvorby hydroxylového radikálu²³. Hydroxylový radikál je velmi silný

oxidant, který může iniciovat radikálové řetězové reakce s řadou organických molekul, vedoucích k peroxidaci lipidů, inaktivaci enzymů a poškození nukleových kyselin²⁷. Poločas jeho života je menší než 1 μs (cit.²³).

5. Enzymová produkce aktivních forem kyslíku

Aktivní formy kyslíku v živém organismu vznikají rovněž cestou enzymových reakcí. Značné množství superoxidového radikálu jako meziprojektu se tvoří reakcemi katalyzovanými enzymy jako je dihydroorotátdehydrogenasa (EC 1.3.3.1), xanthinoxidasa (EC 1.17.3.2) nebo tryptofandioxygenasa (EC 1.13.11.11)²². Nejznámějším z těchto enzymů je xanthinoxidasa, která používá jako donory elektronů xanthin, hypoxanthin či acetaldehyd²⁰. Při katalytické oxidaci xanthinu na kyselinu močovou se uvolňuje superoxidový radikál, který podléhá redukci za tvorby peroxidu vodíku (H₂O₂) a hydroxylového radikálu (OH[•]) cestou Haberovy-Weissovy a Fentonovy reakce⁴. Xanthinoxidasová reakce se obecně používá jako zdroj kyslíkových radikálů pro studie *in vitro*²².

Aldehydoxidasa (EC 1.2.3.1) podobně jako xanthinoxidasa obsahuje molybden a katalyzuje oxidaci aldehydu za tvorby superoxidového radikálu²².

Dalším možným zdrojem aktivních forem kyslíku je reakce katalyzovaná lipoxygenasou (EC 1.13.11.12), při které dochází k peroxidaci polynenasycených mastných kyselin. Vzniklé peroxidderiváty podléhají autokatalytické degradaci, při které dochází ke tvorbě radikálů iniciujících řetězové reakce peroxidace lipidů²⁰.

Do skupiny enzymů redukujících molekulární kyslík přímo bez tvorby superoxidu jako meziprojektu patří prostaglandinsynthasa (EC 1.14.99.1), guanylatcyklasa (EC 4.6.1.2), glukosaoxidasa (EC 1.1.3.4) a D- a L-aminokyselinoxidasa (EC 1.4.3.2-3)²².

Oxalát oxidasa (EC 1.2.3.4) katalyzuje produkci peroxidu vodíku a oxidu uhličitého z oxalátu za přítomnosti kyslíku²⁸. Aminoxidasa (EC 1.4.3.6) katalyzuje oxidaci biogenních aminů na příslušný aldehyd za uvolnění amoniaku a peroxidu vodíku²⁹.

Tabulka III

Zdroje aktivních forem kyslíku²

Mechanismus	Lokalizace	AFK
Fotosyntetický elektronový transportní řetězec	chloroplast	O ₂ ^{•-}
Respirační elektronový transportní řetězec	mitochondrie	O ₂ ^{•-}
Glykolát oxidasa	peroxisomy	H ₂ O ₂
Excitovaný chlorofyl	chloroplast	¹ O ₂
NADPH-oxidasa	plazmatická membrána	O ₂ ^{•-}
β-Oxidace mastných kyselin	peroxisomy	H ₂ O ₂
Oxalát oxidasa	apoplast	H ₂ O ₂
Xanthinoxidasa	peroxisomy	O ₂ ^{•-}
Peroxidasy (Mn, NADH)	buněčná stěna	H ₂ O ₂ , O ₂ ^{•-}
Aminoxidasa	apoplast	H ₂ O ₂

6. Lokalizace produkce aktivních forem kyslíku v rostlinném organismu

V rostlinách existuje řada známých zdrojů aktivních forem kyslíku (tab. III), které jsou produkovány i v rámci normálního metabolismu, např. v průběhu fotosyntézy a respirace². Na zvýšené tvorbě AFK se podílí zejména NADPH-oxidasa (EC 1.6.3.1), aminoxidasa a peroxidasa vázaná na buněčnou stěnu²¹.

6.1. Chloroplasty

Chloroplasty, fotosyntetické organely, jsou považovány za nejvýznamnější zdroje aktivních forem kyslíku v rostlinách^{21,30}. Při absorpci záření asimilačními pigmenty se v nich soustřeďuje velké množství energie a současně se (za světla) zvyšuje koncentrace kyslíku, který vzniká při fotolýze vody ve fotosystému II.

Ve fotosystému I, jehož redukční místo obsahuje Fe-S centra, redukovaný thioredoxin a ferredoxin, může docházet k redukci kyslíku Mehlerovou reakcí. Primárním produktem této reakce je superoxidový radikál, z něhož se mohou dále tvořit reaktivnější hydroxylové radikály a peroxid vodíku. Mehlerova reakce probíhá při nízké koncentraci NADP⁺, např. při nedostatečně rychlé zpětné oxidaci NADPH v Calvinově cyklu.

Fotoredukce kyslíku spojená s tvorbou superoxidu je možná i ve fotosystému II (PS II). Zde dochází k přenosu čtyř elektronů z molekuly vody na reakční centrum PS II a k uvolnění tripletového kyslíku nebo kyslíku v základním stavu. Únik elektronů z tohoto místa na molekulu kyslíku nebo uvolnění částečně redukovaného kyslíku přispívá k produkci aktivovaného kyslíku. Uvažuje se také o možné pozitivní funkci tohoto procesu jako o jedné z cest disipace excitační energie chránící fotosystém II před fotoinhibičním poškozením.

Fotoaktivovaný chlorofyl převádí excitační energii na

reakční centra fotosystémů. Za jistých podmínek může být tato excitační energie chlorofylu přenesena na kyslík v základním stavu za vzniku singletového kyslíku. K tomuto jevu dochází např. při zavřených průduších v době sucha, při narušení membránového transportu, při nedostatku živin nebo v přítomnosti xenobiotik.

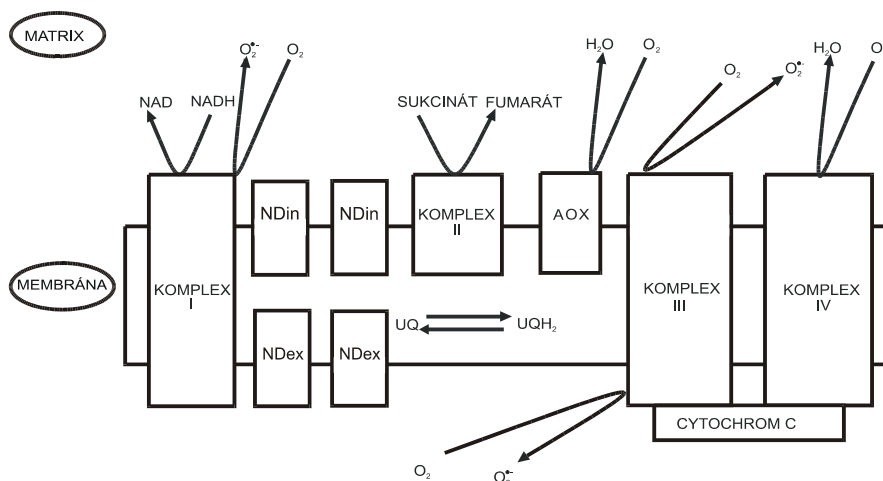
Fotorespirace je oxygenační pochod, odehrávající se v chloroplastech, při kterém enzym ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa (rubisco) (EC 4.1.1.39) katalyzuje adici kyslíku k ribulosa-1,5-bisfosfátu za vzniku fosfoglykolátu a fosfoglycerátu. Ačkoli tato reakce netvoří AFK přímo v chloroplastech, následujícím odbouráním glykolátu v peroxisomech vzniká peroxid vodíku.

6.2. Mitochondrie

Produkce superoxidového radikálu v mitochondriálním elektronovém transportním řetězci je zjevně zvýšená v přítomnosti antimycinu A, který blokuje tok elektronů přes ubichinon. To vede k hromadění redukovaného ubichinonu, jenž pak podléhá autooxidaci za tvorby superoxidu²².

Mitochondriální elektronový transportní řetězec je tedy hlavním místem produkce aktivních forem kyslíku v mitochondriích (obr. 2). Kromě komplexů I až IV obsahuje mitochondrie alternativní oxidasu (AOX) a na každé straně vnitřní membrány dvě NAD(P)H dehydrogenasy (EC 1.6.99.1)³¹. Různé Fe-S proteiny a NADH dehydrogenasa (EC 1.6.99.3) jsou předpokládaným místem produkce superoxidu a peroxidu vodíku³². Izolované mitochondrie produkují H₂O₂ a O₂⁻ v přítomnosti NADH^{33,34}.

Komplex I je hlavním enzymem oxidujícím NADH za normálních podmínek a spolu s komplexem III místem produkce aktivních forem kyslíku. Vyšší rychlosti produkce AFK dosáhneme inhibicí obou terminálních oxidas, komplexu IV a AOX (cit.²¹).



Obr. 2. Schématické zobrazení elektronového transportního systému ve vnitřní mitochondriální membráně naznačující možné místo produkce superoxidu redukovaným ubichinonem^{2,31}. AFK mohou vznikat na obou stranách membrány. Zkratky: Ndin, Ndex, vnitřní a vnější NAD(P)H dehydrogenasy; UQ, ubichinon; AOX, alternativní oxidasa

6.3. Peroxisomy

Peroxisomy jsou buněčné orgány o průměru 0,1–1,7 μm, obsahující granulární nebo fibrilární matrix a ohraničené jednoduchou membránou. V tabulce IV jsou uvedeny metabolické děje doposud popsané pro peroxisomy rostlin a hub³⁵. V rostlinách bylo nalezeno několik typů peroxisomů. Glyoxisomy jsou specializované peroxisomy v zásobních pletivech olejnatých semen, které obsahují enzymy β-oxidace mastných kyselin a glyoxylátového cyklu. Tyto enzymy slouží k přeměně rezervních lipidů semene na cukry potřebné pro klíčení a růst rostlin.

Dalším typem specializovaných peroxisomů jsou peroxisomy hlízek kořenů tropických luštěnin, ve kterých probíhá syntéza alantoinu, hlavního transportního metabolitu dusíku.

Hlavní metabolické procesy odpovědné za tvorbu peroxidu vodíku v různých typech peroxisomů jsou fotorepirační glykolátoxidase reakce, β-oxidace mastných kyselin, enzymové reakce flavinoxidasy a dismutace superoxidového radikálu³⁵. V průběhu fotorespirace glykolátoxidasa (EC 1.1.3.15) katalyzuje oxidaci glykolátu za tvorby peroxidu vodíku²¹. Enzymy fotorepirační dráhy jsou uspořádány v matrix peroxisomu ve formě multienzymového komplexu, který umožňuje přenos metabolitů přes membránu peroxisomu pomocí prolinových kanálků³⁵.

V peroxisomech existují dvě místa produkce superoxidového radikálu. Prvním místem je matrix peroxisomu,

Tabulka IV

Metabolické procesy odehrávající se v peroxisomech hub a vyšších rostlin³⁵

Organismus	Metabolický děj
Rostliny	fotorespirace β-oxidace mastných kyselin glyoxylátový cyklus metabolismus ureidů metabolismus aktivních forem kyslíku
Houby	metabolismus methanolu syntéza oxalátu metabolismus aminů metabolismus alkanů

Tabulka V

Vlastnosti a pravděpodobná identita integrálních polypeptidů zodpovědných za tvorbu superoxidu v membráně peroxisomu^{37,38}

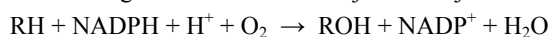
M_r (kDa)	Donor elektronů	Vlastnosti	Pravděpodobná identita
32,0	NADH	flavoprotein hemoprotein ferrikyanidreduktasa	monodehydroaskorbátreduktasa
29,0	NADPH	Cyt <i>c</i> reduktasa	Cyt P450 (?)
18,0	NADH	Cyt <i>c</i> reduktasa	cytochrom typu <i>b</i>

kde xanthinoxidasa katalyzuje oxidaci xanthinu a hypoxanthinu na kyselinu močovou, přičemž dochází k uvolnění superoxidu. Druhým místem je membrána peroxisomu obsahující malý transportní řetězec, který je tvořen flavoproteinovou NADH:ferrichelátreduktasou (EC 1.16.1.7) a cytochromem *b* (cit.³⁶). Za tvorbu superoxidu v membráně jsou zodpovědné tři nedávno identifikované integrální polypeptidy o molekulové hmotnosti 18, 29 a 32 kDa. Jejich vlastnosti a pravděpodobná identita jsou uvedeny v tabulce V (cit.^{37,38}).

Působením stresových faktorů bylo pozorováno intenzivnější uvolňování superoxidu, produkovaného membránou peroxisomu, do cytosolu. Superoxidový radikál rychle přechází na peroxid vodíku a kyslík³⁵.

6.4. Endoplazmatické retikulum

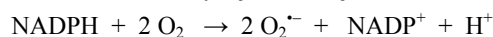
V endoplazmatickém retikulu probíhají procesy, jako např. oxidace, hydroxylace, dealkylace, deaminace a dehalogenace. Oxygenasy obsahující hem připojují atom kyslíku na organický substrát, přičemž jako donor elektronů jim slouží NAD(P)H. Nejlépe charakterizovaným enzymem v rostlinách obsahujícím cytochrom P450 je cinnamát-4-hydroxylasa (EC 1.14.13.11), která se účastní biosyntézy flavonoidů a ligninu. Celková reakce je následující:



Další enzymy s podobnou funkcí se účastní např. biosyntézy gibberellinů a sterolů. Aktivace kyslíku je základem předpokladem reakcí obsažených v syntéze těchto složitých metabolitů. Superoxid je produkován NAD(P)H-dependentním elektronovým transportem zahrnujícím cytochrom P450 (cit.³⁹). Po univalentní redukci substrátu (RH) a reakci s tripletovým kyslíkem se tvoří komplex P450-ROOH, který se může rozkládat na P450-RH a uvolnit tak superoxid.

6.5. Plazmatická membrána

Během stresové reakce tvoří rostlina superoxid pomocí NADPH-oxidasy vázané v plazmatické membráně. Tato rostlinná NADPH-oxidasa, homolog NADPH-oxidasy savčích neutrofilů, katalyzuje následující reakci²⁷:

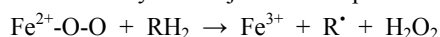


NADPH-oxidasa je vícesložkový komplex obsahující cytochrom b_{558} s proteinovými podjednotkami gp91^{phox} a p22^{phox} (cit.²⁷). Cytochrom b_{558} nekovalentně váže FAD a dvě hemové prostetické skupiny. Elektrony z NADPH předává cestou FAD a hemu na kyslík. Aktivace elektronového transportního řetězce vyžaduje několik cytosolových proteinů s regulační rolí. Jsou to p47 a p67 fosfoproteiny, spojené s buněčným cytoskeletem, p40 a dva malé proteiny vázané na GTP: Rac2 a Rap1A. Cytosolové proteiny tvoří komplex s cytochromem a dochází tak ke změnám, které iniciují tok elektronů přes membránu³⁶. Vnější povrch plazmatické membrány je nejpravděpodobnějším místem uvolnění superoxidu, který následně dismutuje na peroxid vodíku²⁷. Chemické inhibitory NADPH-oxidasy pod vlivem biotických a abiotických stresových faktorů blokuji nebo snižují tvorbu aktivních forem kyslíku⁴.

6.6. Buněčná stěna

Peroxidasas buněčné stěny produkují superoxidový radikál za spotřeby NADH v reakci závislé na manganaťých iontech²¹. Tvorba peroxidu vodíku peroxidasami buněčné stěny je závislá na pH. Elicitor přicházející na buněčný povrch je rozpoznán příslušnou molekulou receptoru, která způsobuje otevření iontových kanálů. Pohyb iontů vyvolává přechodnou alkalizaci exocelulárního prostoru, což vede k aktivaci peroxidas závislých na pH (cit.²³).

Mechanismus produkce peroxidu vodíku zahrnuje redukcí sloučeniny obsahující Fe-O-O podle rovnice³⁶:

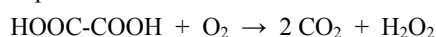


Při dostatečné zásobě reduktantu se tvorba peroxidu vodíku udržuje po dlouhou dobu. Tento reduktant se nepodařilo identifikovat, ale ví se, že to není NADPH, NADH, askorbát, glutathion ani cystein²³.

Nejčastějšími biosyntetickými reakcemi v buněčné stěně závislými na peroxidu vodíku je tvorba fenylypropionidních prekurzorů ligninu a následně jejich zesíťování a spojení do podjednotek tvořících lignin⁴⁰. Také některé metabolické dráhy odbourávající xenobiotické látky jsou lokalizovány v buněčné stěně.

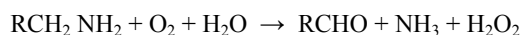
6.7. A P O P L A S T

Mezi zdroje aktivních forem kyslíku v apoplastu patří enzymy oxalát oxidasa a aminoxidasa^{21,36}. Oxalát oxidasa katalyzuje přeměnu oxalátu na oxid uhličitý a peroxid vodíku podle reakce:



Expresí genů oxalát oxidasy je indukována vlivem vysoké koncentrace solí, salicylátu a methyljasmonátem²¹.

Aminoxidasy jsou enzymy obsahující měď, katalyzující oxidaci široké řady biogenních aminů (mono-, di- a polyaminů) na odpovídající aldehyd za uvolnění amoniaku a peroxidu vodíku podle reakce:



Tyto enzymy jsou homodimery s podjednotkami velikosti 70–95 kDa. Každá podjednotka obsahuje Cu (II) a chinonový kofaktor topachinon (TPQ). Peroxid vodíku vznikající při oxidaci aminů může být přímo využit peroxidasami buněčné stěny při lignifikaci a zesílení buněčné stěny jak během normálního růstu, tak v reakci na vnější podnět jako je zranění nebo patogenez^{4,36}.

7. Katabolismus aktivních forem kyslíku

Rostliny vyvinuly účinné obranné systémy, které odstraňují aktivní formy kyslíku a chrání tak buňky proti oxidačnímu poškození^{4,41}. Tyto obranné systémy zahrnují enzymové i neenzymové antioxidanty, jejichž zastoupení ve specifických buněčných strukturách je uvedeno v tabulce VI. a VII. Antioxidační kapacita je velmi závislá na působení stresových faktorů, stejně jako na druhu, stadiu vývoje a na fyziologickém věku rostliny²¹.

Tabulka VI
Subcelulární lokalizace antioxidantů²

Antioxidant	Subcelulární lokalizace
Askorbát (vitamin C)	apoplast, cytosol, plastid, mitochondrie, peroxisom
β -Karoten	plastid
Redukovaný glutathion	cytosol, apoplast, mitochondrie, plastid, peroxisom
Polyaminy (putrescin)	cytosol, mitochondrie, jádro, plastid
α -Tokoferol (vitamin E)	buněčné membrány
Zeaxanthin	chloroplast

Superoxidové radikály jsou eliminovány superoxid-dismutasou v reakci produkující peroxid vodíku. Peroxid vodíku je přeměněn na kyslík a vodu katalasou nebo využit při oxidaci askorbátu. Enzymová redukce monodehydroaskorbátu probíhá v plastidech. Monodehydroaskorbát, který samovolně dismutuje na dehydroaskorbát, může reagovat s glutathionem (GSH) za tvorby askorbátu a oxidovaného glutathionu (GSSG) v reakci katalyzované dehydroaskorbátreduktasou. GSSG je redukován NADPH-dependentní glutathionreduktasou (EC 1.8.1.7). Singletový kyslík a hydroxylové ionty jsou eliminovány glutathionovou cestou. Poškození singletovým kyslíkem a hydroxylovými ionty je také sníženo neenzymovými antioxidanty, vitamínem E a karotenoidy⁴².

7.1. Antioxidanty

První skupinu ochranných mechanismů před oxidačním poškozením tvoří neenzymové systémy přímé deaktivace.

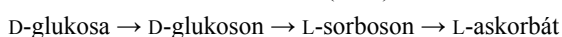
Tabulka VII
Subcelulární a orgánová lokalizace antioxidantních enzymů^{2,21,22,35}

Antioxidační enzym	Zkratka	Subcelulární a orgánová lokalizace
Asorbátperoxidasa	APX	cytosol, stroma plastidů, membrána plastidů, mitochondrie, peroxisomy, apoplast, kořenové hlízky
Katalasa	CAT	peroxisomy
Dehydroaskorbátreduktasa	DHAR	cytosol, stroma plastidů, kořenové hlízky
Glutathionreduktasa	GR	cytosol, mitochondrie, stroma plastidů, kořenové hlízky
Monodehydroaskorbátreduktasa	MDHAR	stroma plastidů, kořenové hlízky
Superoxiddismutasa	Cu/Zn-SOD Mn-SOD Fe-SOD	cytosol, peroxisomy, plastidy, kořenové hlízky mitochondrie plastidy

7.1.1. L-Asorbát

L-Asorbát (vitamin C) je důležitým vitamínem lidské stravy vyskytujícím se ve většině rostlinných buněk²⁰. Asorbát hraje hlavní roli v některých fyziologických procesech rostlin, jako je růst, diferenciaci a řada metabolických drah. Je významným reduktantem mnoha volných radikálů, čímž minimalizuje poškození způsobené oxidačním stresem.

Asorbát se syntetizuje v cytosolu z hexosových cukrů. Vyšší rostliny nejdříve mění D-glukosu na asorbát přímou konverzí, která udržuje uhlíkový řetězec ve stejném pořadí. Proces zahrnuje oxidaci C1 na D-glukose a tvorbu endiolu mezi C2 a C3 (cit.⁴³):



Za fyziologických podmínek se asorbát vyskytuje většinou v redukované formě. Schopnost uvolnit elektrony v řadě enzymových a neenzymových reakcí způsobuje, že asorbát je jednou z hlavních detoxifikačních sloučenin aktivních forem kyslíku ve vodné fázi²². Asorbát může přímo „odklízet“ superoxid, hydroxylové radikály, singletový kyslík a redukovat peroxid vodíku na vodu cestou askorbát-peroxidase reakce. V chloroplastu funguje askorbát jako kofaktor violaxantinu de-epoxidasy, která udržuje rozložení nadbytku excitační energie a regeneruje tokoferol z tokoferoxylového radikálu, čímž chrání membránu²⁰.

7.1.2. Karotenoidy

Karotenoidy velmi rychle odstraňují singletový kyslík z protein-pigmentových komplexů chloroplastů. Vznikající excitovaný tripletový stav karotenoidů se velmi snadno vrací do základního stavu za uvolnění tepla.

Byl prokázán inhibiční vliv β -karotenu na peroxidaci lipidů. β -Karoten se podílí na odstranění radikálů hydroperoxidů lipidů produkovaných během propagačního stupně reakce²².

7.1.3. Redukovaný glutathion

Glutathion je tripeptid (γ -glutamylcysteinylglycin)

hojně se vyskytující v cytosolu, mitochondriích a dalších buněčných složkách, kde vykonává různé funkce. GSH je hlavní zásobárnou síry a spolu se svou oxidovanou formou (GSSG) udržuje redoxní rovnováhu v buněčných odděleních. Díky redoxním vlastnostem se dvojice GSH/GSSG může účastnit regulace buněčného cyklu²⁰.

GSH zabraňuje peroxidaci lipidů odstraněním lipidových alkylů nebo lipoxylových radikálů. Dále předchází kovalentní vazbě různých xenobiotických molekul, které podléhají peroxidaci jednoelektronové reakci za tvorby radikálových meziproductů. Jednou z hlavních funkcí glutathionu je zabránění oxidaci thiolové skupiny enzymů, která způsobuje jejich inaktivaci²².

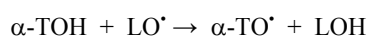
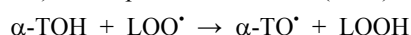
Glutathion odstraňuje cytotoxický peroxid vodíku a reaguje neenzymově i s dalšími aktivními formami kyslíku: singletovým kyslíkem, superoxidem a hydroxylovým radikálem.

Významná role glutathionu v antioxidační obraně spočívá v jeho schopnosti regenerovat jiný silný antioxidant, askorbát, cestou askorbát-glutathionového cyklu²⁰.

7.1.4. α -Tokoferol

α -Tokoferol (vitamin E) je nejdůležitějším antioxidantem, který je součástí lipidových membrán buněk²². Existují čtyři tokoferolové isomery (α -, β -, γ -, δ -) obsahující chromanový kruh a fytylový řetězec. Relativní antioxidační aktivita tokoferolových izomerů *in vivo* díky počtu methylových skupin připojených na fenolový kruh je následující: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ (cit.²⁰).

α -Tokoferol odstraňuje řetězově vznikající volné peroxylové radikály. Vodíkový atom z α -tokoferolu přechází na lipidový peroxylový (LOO \cdot) nebo lipoxylový radikál (LO \cdot) za tvorby odpovídajícího lipidového hydroperoxidu (LOOH) nebo lipidového alkoholu (LOH):



α -Tokoferol je metabolizován na α -tokoferolový radikál ($\alpha\text{-TO}\cdot$), který reaguje s dalším lipidovým peroxylo-

vým radikálem za vzniku neradikálových produktů LOOH, LOH a α -tokoferolchinonu (α -TOQ)²².



Askorbát a redukovaný glutathion ve spojení s tokoferolem synergisticky inhibují oxidační poškození buněčných membrán, pravděpodobně přes regeneraci α -tokoferolu²². Ireverzibilní oxidací α -tokoferolu lze z buňky odstranit zejména singletový kyslík⁴⁴.

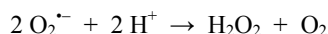
α -Tokoferol má v membráně také několik neantioxidačních funkcí. Jednou z nich je stabilizace membránových struktur. α -Tokoferol moduluje membránovou fluiditu podobně jako cholesterol, a také membránovou propustnost pro malé ionty a molekuly. Mezi další funkce tokoferolu patří inhibice proteinkinasy C (EC 1.14.16.2), inhibice buněčné proliferace a další²⁰.

7.2. Antioxidativní enzymy

Nejuniverzálnější ochranu proti poškození aktivními formami kyslíku ve všech částech buněk poskytují některé speciální enzymy a enzymové systémy (tab. VIII). Zabraňují iniciaci řetězových oxidací odstraňováním částečně redukovaných kyslíkových forem jako superoxid a peroxid vodíku²².

7.2.1. Superoxiddismutasa

Superoxiddismutasa patří mezi metaloenzymy katalyzující přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku:



Tato reakce probíhá o 4 řády rychleji než samovolná dismutace²⁰. Enzym superoxiddismutasa je přítomný v aerobních a fakultativně aerobních organismech²² a ve všech buněčných odděleních citlivých na oxidativní stres. Lokalizace isoenzymů SOD v rostlinné buňce je uvedena v tabulce VII. Isoenzymy SOD byly klasifikovány podle obsahu kovového kofaktoru jako Fe, Mn a Cu/Zn (cit.⁴¹).

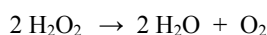
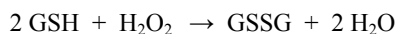
Tabulka VIII

Enzymy, které odstraňují a detoxifikují AFK²⁰

Enzym	EC číslo	Katalyzovaná reakce
Superoxiddismutasa	1.15.1.1	$\text{O}_2^{\bullet -} + \text{O}_2^{\bullet -} + 2\text{H}^+ \leftrightarrow 2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Katalasa	1.11.1.6	$2\text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
Glutathionperoxidasa	1.11.1.12	$2\text{GSH} + \text{PUFA-OOH} \leftrightarrow \text{GSSG} + \text{PUFA} + 2\text{H}_2\text{O}$
Askorbátperoxidasa	1.11.1.11	$\text{AA} + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{DHA} + 2\text{H}_2\text{O}$
Monodehydroaskorbátreduktasa	1.6.5.4	$\text{NADH} + 2\text{MDHA} \leftrightarrow \text{NAD}^+ + 2\text{AA}$
Dehydroaskorbátreduktasa	1.8.5.1	$2\text{GSH} + \text{DHA} \leftrightarrow \text{GSSG} + \text{AA}$
Glutathionreduktasa	1.6.4.2	$\text{NADPH} + \text{GSSG} \leftrightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{GSH}$
Fosfolipidhydroperoxid-glutathionperoxidasa	1.11.1.9	$2\text{GSH} + \text{PUFA-OOH} (\text{H}_2\text{O}_2) \leftrightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$

Nedávno byl popsán nový isoenzym SOD ve *Streptomyces* s niklem v aktivním místě²⁰. Isoenzymy lze identifikovat na základě citlivosti k peroxidu vodíku a KCN. Cu/Zn-SOD je inaktivována KCN i H_2O_2 , Fe-SOD pouze H_2O_2 a Mn-SOD je rezistentní na oba inhibitory⁴⁵.

Peroxid vodíku vznikající v živočišných buňkách je odstraněn enzymem glutathionperoxidasou (EC 1.11.1.9) nebo katalasou.



Chloroplasty v rostlinách obsahují SOD, nikoli však katalasu nebo glutathionperoxidasu. Proto peroxid vodíku odstraňují pomocí askorbát-glutathionového cyklu, podrobněji popsáno dále.

7.2.2. Katalasa

Katalasa je tetramerní enzym obsahující hem²¹. Nachází se ve všech aerobních eukaryotech a účastní se odstraňování peroxidu vodíku produkovaného v peroxisomech oxidasami β -oxidace mastných kyselin, glyoxylátového cyklu nebo při katabolismu purinů. Může katalyzovat přímý rozpad peroxidu vodíku (katalasová aktivita) nebo oxidaci substrátů jako methanol, ethanol, formaldehyd, formát a nitrit peroxidem vodíku (peroxidasová aktivita)²¹.

Existují tři hlavní isoformy tohoto enzymu: CAT1, CAT2 a CAT3. Pro lepší orientaci mezi isoenzymy v různých druzích byla navržena základní nomenklatura²¹. Enzymy I. skupiny jsou lokalizovány v listech a zahrnuty do odstraňování peroxidu vodíku během fotorespirace. Enzymy II. skupiny se nacházejí hlavně v cévních svazcích a enzymy III. skupiny odstraňují peroxid vodíku z glyoxysomů a jsou hojně zastoupeny v semenech a mladých semenáčcích²¹.

Velmi dobře jsou prostudovány např. isoenzymy kukuřice, kde byly identifikovány tři různé isoformy (CAT-1, CAT-2 a CAT-3). Tyto tři isoenzymy jsou kódované třemi strukturálně nepodobnými geny: *Cat1*, ležícím na krátkém

rameni chromosomu 5, *Cat2* na krátkém rameni chromosomu 1, a *Cat3*, umístěným na dlouhém rameni chromosomu 1 (cit.¹).

7.2.3. Enzymy askorbát-glutathionového cyklu

Askorbát-glutathionový cyklus, také nazývaný Foyerův-Halliwellův-Asadův cyklus, odstraňuje peroxid vodíku z buněčných oddělení, ve kterých tento metabolit vzniká a ve kterých není přítomna katalasa. Tento cyklus používá neenzymové antioxidanty askorbát a glutathion v sérii reakcí katalyzovaných antioxidantními enzymy a probíhá v chloroplastech, peroxisomech, cytosolu a mitochondriích³⁵.

První enzym cyklu, askorbátperoxidasa, katalyzuje reakci peroxidu vodíku a askorbátu za vzniku monodehydroaskorbátu, případně dehydroaskorbátu. Není-li monodehydroaskorbát znovu redukován na askorbát monodehydroaskorbátreduktasou (EC 1.6.5.4), samovolně disproportionuje na askorbát a dehydroaskorbát. Ten je zpětně přeměňován na askorbát reakcí katalyzovanou dehydroaskorbátreduktasou v přítomnosti redukovaného glutathionu za vzniku jeho oxidované formy. Redukovaný glutathion je obnoven glutathionreduktasou v reakci závislé na NADPH (obr. 3, cit.⁴¹).

7.2.4. Glutathionperoxidasy

Mezi významné enzymové systémy uplatňující se zejména při zamezení peroxidace membránových lipidů patří rozsáhlá skupina glutathionperoxidas, které katalyzují redukci peroxidu vodíku, organických peroxidů a peroxidů lipidů s využitím glutathionu jako redukčního činidla. Podobně jako v živočišných systémech se glutathionperoxidasy u rostlin pravděpodobně také uplatňují při redoxní regulaci transkripční aktivity a signálních drah.

Významný podíl na zamezení poškození membránových struktur uplatňuje specifický enzym fosfolipidhydroperoxidglutathionperoxidasa (PHGPX) (EC 1.11.1.12)⁴⁶. Geny homologní s živočišnou PHGPX byly nalezeny v citrusech, tabáku, špenátu a *Arabidopsis*⁴⁷.

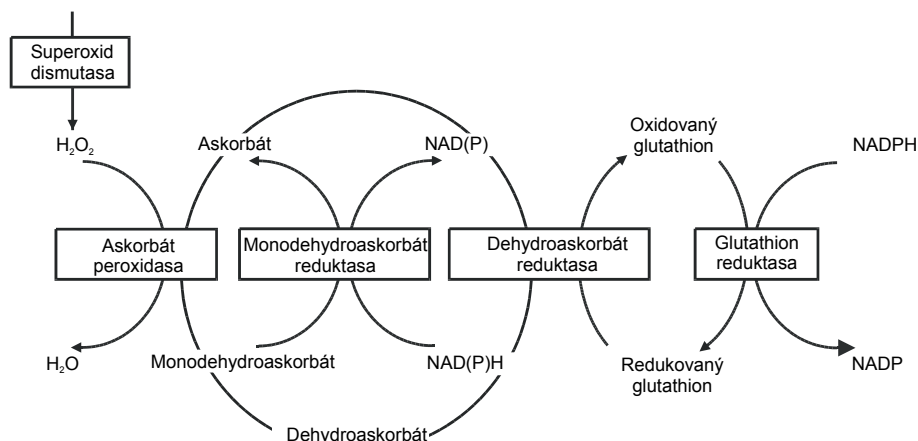
Selenocystein v aktivním místě živočišného enzymu je u rostlinného enzymu nahrazen cysteinem a specifická aktivita je o tři řády nižší. Produkty PHGPX-homologních genů z rajčete a slunečnice exprimovaných v *E.coli* redukuje v přítomnosti glutathionu hydroperoxydy mastných kyselin a fosfolipidů. Navíc, v přítomnosti thioredoxinu, jsou schopny se zvýšenou účinností kromě organických hydroperoxidů redukovat také peroxid vodíku. To ukazuje na další možné funkce těchto enzymů v propojení glutathion- a thioredoxin-dependentních redoxních systémů v rostlinných buňkách⁴⁸.

Kromě výše popsané cytosolové formy PHGPX byl enzym lokalizován také v chloroplastech, kde se pravděpodobně podílí na antioxidantním mechanismu při fotooxidativním stresu⁴⁹.

8. Závěr

V rostlinách existuje řada zdrojů tvorby aktivních forem kyslíku. Některé z nich jako fotosyntéza a respirace jsou součástí obecného metabolismu, jiné jsou naopak součástí biochemických pochodů probíhajících ve významném rozsahu pouze za stresových podmínek. Mezi nejdůležitější enzymové zdroje aktivních forem kyslíku patří NADPH oxidasa, aminoxidasa a peroxidasy vázané na buněčnou stěnu. AFK na jedné straně fungují v rostlinách jako signální molekuly, ale na straně druhé mohou při nadměrné a nekontrolované tvorbě rostlinnou buňku ohrozit svou toxicitou. Akumulace AFK může vést k peroxidaci membránových lipidů, k oxidaci proteinů, inhibici enzymů a destrukci nukleových kyselin. Z toho vyplývá důležitost mechanismů regulující produkci a katabolismus AFK v jednotlivých buněčných kompartmentech, jak v rámci signální funkce AFK v nízkých koncentracích, tak i pro snížení rizika možného poškození buněčných součástí vyplývající z vysoké koncentrace AFK v buňce při stresových podmínkách.

Mezi nejvýznamnější enzymy podílející se na katabo-



Obr. 3. Askorbát-glutathionový cyklus⁴¹

lismu AFK patří superoxiddismutasa a enzymy askorbát-glutathionového cyklu, přítomné ve většině buněčných organel, dále cytosolová glutathionperoxidasa a katalasa v peroxisomech. Proliferace peroxisomů za stresových podmínek potvrzuje významnou úlohu katalasy pro detoxifikaci vysokých koncentrací AFK. Antioxidanty jako askorbát a glutathion jsou nezbytné v obraně rostlin při oxidativním stresu. Zvýšení jejich koncentrace bylo prokázáno zejména v chloroplastech. Obecně je pro katabolismus AFK podstatné udržení poměru redukováných/oxidovaných forem askorbátu a glutathionu, což zajišťují s využitím redukčních vlastností NADPH enzymy glutathionreduktasa, monodehydroaskorbátreduktasa a dehydroaskorbátreduktasa.

Z hlediska obrany rostlin proti AFK jsou také nezanebatelné preventivní mechanismy umožňující snížení vlivů externích stresových faktorů. Jedná se o nejrůznější adaptační mechanismy na anatomické (pohyb a zkroucení listů, uložení stomat ve specializovaných útvarech), fyziologické (C4 a CAM metabolismus) a molekulární úrovni (změny ve fotosyntetickém aparátu).

Dosavadní výzkum tvorby a katabolismu AFK v rostlinných buňkách přinesl řadu výsledků a objasnil mnohé souvislosti, stále však existuje řada pochybností. Na svou odpověď čekají otázky týkající se např. buněčných receptorů signální funkce AFK, detailního mechanismu toxicity AFK vůči rostlinným buňkám a koordinace regulačních mechanismů hladiny AFK za fyziologických i stresových podmínek.

Tyto výsledky jsou součástí grantového projektu financovaného výzkumným záměrem MSM 6198959215.

LITERATURA

- Scandalios J. G.: *Adv. Genet.* 28, 1 (1990).
- Mittler R.: *Trends Plant Sci.* 7, 405 (2002).
- Neill S., Desikan R., Hancock J.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 388 (2002).
- Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F.: *J. Exp. Bot.* 53, 1227 (2002).
- Semenza G.L.: *Cell* 98, 281 (1999).
- Pasqualini S., Piccioni C., Reale L., Ederli L., Della Tore G., Ferranti F.: *Plant Physiol.* 133, 1122 (2003).
- Vacca R. A., de Pinto M.C., Valenti D., Passarella S., Marra E., de Gara L.: *Plant Physiol.* 134, 1100 (2004).
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb Ch.: *Cell* 79, 583 (1994).
- Jabs T., Tschope M., Colling C., Hahlbrock K., Scheel D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4800 (1997).
- Barceló A. R.: *Free Radical Res.* 31, 147 (1999).
- Cabané M., Pireaux J. C., Léger E., Weber E., Dizen-gremel P., Pollet B., Lapiere C.: *Plant Physiol.* 134, 586 (2004).
- Shalata A., Mittova V., Volokita M., Guy M., Tal M.: *Physiol. Plant.* 112, 487 (2001).
- Chen Z., Gallie D. R.: *Plant Cell* 16, 1134 (2004).
- Brüggemann W., Beyel V., Brodka M., Poth H., Weil M., Stockhaus J.: *Plant Sci.* 140, 145 (1999).
- Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S.: *J. Exp. Bot.* 53 (372), 1331 (2002).
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., v knize: *Fyziologie rostlin*, str. 412. Academia, Praha 1998.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T.: *J. Exp. Bot.* 53, 1237 (2002).
- Göbel C., Feussner I., Rosahl S.: *J. Biol. Chem.* 278 (52), 52834 (2003).
- Delledonne M., Murgia I., Ederle D., Sbicego P. F., Biondani A., Polverari A., Lamb Ch.: *Plant Physiol. Biochem.* 40, 605 (2002).
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V.: *Ann. Bot.* 91, 179 (2003).
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F.: *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 779 (2000).
- Winston G. W., v knize: *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*, str. 57. Wiley-Liss, 1990.
- Wojtaszek P.: *Biochem. J.* 322, 681 (1997).
- Haber F., Weiss J.: *Proc. R. Soc. London, Ser. A* 147, 332 (1934).
- Fenton H. J. H.: *J. Chem. Soc.* 65, 899 (1894).
- Fenton H. J. H.: *Proc. Chem. Soc.* 25, 224 (1899).
- Lamb Ch., Dixon R. A.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251 (1997).
- Zhang Z., Collinge D. B., Thordal-Christensen H.: *Plant J.* 8, 139 (1995).
- Bachrach U., v knize: *Structure and functions of amine oxidases*. (Mondovi B., ed.), str. 5. CRC Press, Boca Raton 1985.
- Asada K.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601 (1999).
- Möller I. M.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 561 (2001).
- Turrens J. F., Freeman B. A., Crapo J. D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 411 (1982).
- Loschen G., Azzi A., Floheß L.: *FEBS Lett.* 33, 84 (1973).
- Loschen G., Azzi A., Richter C., Floheß L.: *FEBS Lett.* 42, 68 (1974).
- Del Río L. A., Corpas F. J., Sandalio L. M., Palma J. M., Gómez M., Barroso J. B.: *J. Exp. Bot.* 53, 1255 (2002).
- Bolwell G. P., Wojtaszek P.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51, 347 (1997).
- López-Huertas E., Sandalio L. M., Gómez M., del Río L. A.: *Free Radical Res.* 26, 497 (1997).
- López-Huertas E., Corpas F. J., Sandalio L. M., Gómez M., del Río L. A.: *Biochem. J.* 337, 531 (1999).
- Winston G. W., Cederbaum A. I.: *J. Biol. Chem.* 258, 1508 (1983).
- Gross G. G.: *Adv. Bot. Res.* 8, 25 (1980).
- Inzé D., Van Montagu M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 6,

- 153 (1995).
42. Buchanan B. B., Gruissen W., and Jones R. L., v knize: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, str. 1189. American Society of Plant Physiologists, Riockville 2000.
43. Loewus F. A., v knize: *The Biochemistry of Plants* (Preiss J., ed.), str. 8. Academic Press, New York 1988.
44. Fryer M. J.: *Plant Cell Environ.* 15, 381 (1992).
45. Fridovich I.: *J. Biol. Chem.* 264, 7761 (1989).
46. Ursini F., Maiorino M., Brigelius-Flohe R., Aumann K. D., Roveri A., Schomburg D., Flohe L.: *Methods Enzymol.* 252, 38 (1995).
47. Mittova V., Guy M., Tal M., Volokita M.: *Free Radical Res.* 36, 195 (2002).
48. Herbetel S., Lennel C., Leblanc N., Julien J. J., Drevet J. R., Roedel-Drevet P.: *Eur. J. Biochem.* 269, 2414 (2002).
49. Baier M., Dietz K. J.: *Trends Plant Sci.* 4, 166 (1999).
50. Low P. S., Merida J. R.: *Physiol. Plant.* 96, 533 (1996).
51. Del Río L. A., Sandalio L. M., Corpas F. J., López-Huertas E., Palma J. M., Pastori G. M.: *Physiol. Plant.* 104, 673 (1998).
52. Bolwell G. P., Bindschedler L. V., Blee K. A., Butt V. S., Davies D. R., Gardner S. L., Gerrish Ch., Minibayeva F.: *J. Exp. Bot.* 53, 1367 (2002).

J. Piterková^a, K. Tománková^{a,b}, L. Luhová^a, M. Petřivalský^a, and P. Peč^a (^a*Department of Biochemistry*, ^b*Department of Botany, Palacký University, Olomouc*): **Oxidative Stress: Localisation of Reactive Oxygen Species Formation and Degradation in Plant Tissue**

This review summarizes the current knowledge on oxidative stress of plants from the viewpoint of formation and degradation of reactive oxygen species (ROS) in plant tissue. Special attention was paid to various non-enzymatic and enzymatic ROS-producing systems, including sites of ROS production (chloroplast, mitochondria, peroxisome, endoplasmic reticulum, plasma membrane, apoplastic space and cell wall). Defence reactions of plants, employing various antioxidants and antioxidant enzymes are also described in detail.

Česká společnost chemická

vypisuje výběrové řízení na místo tajemníka společnosti

Požadujeme:

- VŠ chemického nebo přírodovědného směru,
- dobré organizační a komunikační schopnosti,
- znalost práce s PC,
- znalost jazyků (především angličtiny) nutná.

Nabízíme zajímavou, různorodou práci v příjemném pracovním prostředí v centru Prahy, nástup 1.10.2005.

Příhlášky spolu s životopisem a přehledem dosavadní praxe zašlete prosím obratem na adresu sekretariátu (ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1). Příhlášku je možné podat i elektronicky na e-mailovou adresu: mblahova@csvts.cz . Případné bližší informace lze získat na tel. čísle 222 220 184.