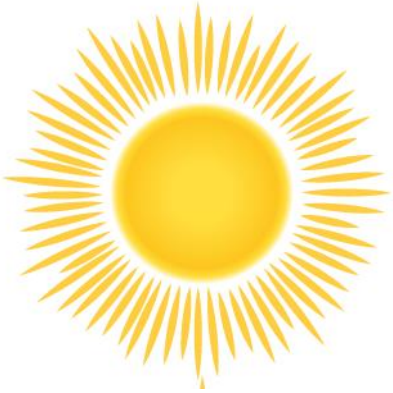


TOPLINSKI STRES

-pojedina tkiva ili organi - različito osjetljivi na toplinu - dehidrirana tkiva, npr. sjemenke, su otpornija od rastućih
-suhe sjemenke preživljavaju 120 °C, a pelud 70 °C (kratkotrajno izlaganje)
-rastuća tkiva – mogu podnijeti temp. do oko 45 °C

-odgovor na toplinski stres potaknut je porastom temperature za 5-10 °C iznad optimalne

Letalne temperature za pojedine biljne vrste i njihove organe

Biljka	Letalna temperatura (°C)	Vrijeme izloženosti
Nicotiana rustica (divlji duhan)	49 – 51	10 min
Cucurbita pepo (bundeva)	49 – 51	10 min
Zea mays (kukuruz)	49 – 51	10 min
Brassica napus (korabica)	49 – 51	10 min
Citrus aurantium (naranča)	50,5	15 – 30 min
Opuntia (kaktus)	>65	-
Sempervivum arachnoideum	57 – 61	-
Listovi krumpira	42,5	1 sat
Sijanci bora i smreke	54 – 55	5 min
Sjemenke lucerne	120	30 min
Vinova loza (zreli plodovi)	63	-
Plodovi rajčice	45	-
Pelud bora	70	1 sat
Mahovine		
hidrirane	42 – 51	-
dehidrirane	85 – 110	-

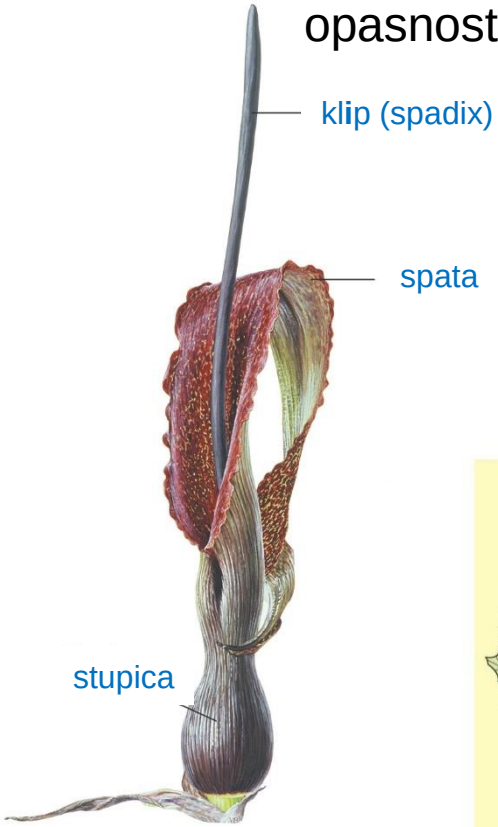
U uvjetima intenzivnog Sunčevog zračenja:

-kaktusi i sukulente, npr. vrste *Opuntia* i *Sempervivum* podnose temp. tkiva do 60-65 °C

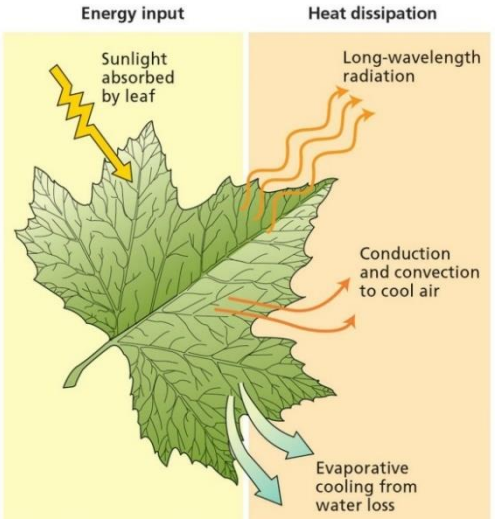
Opuntia sp.

Sempervivum sp.

-kompaktna tkiva (u kojih je mali omjer površine i volumena) i koja nemaju transpiraciju - velika opasnost od pregrijavanja,



npr. klip u vrste *Arum* i plodovi razli-čitih vrsta biljaka



List – građa i transpiracija omogućuju hlađenje i ispod temperature okoliša **(u uvjetima dobre opskrbljenosti vodom)**

Učinak toplinskog stresa na razini stanice

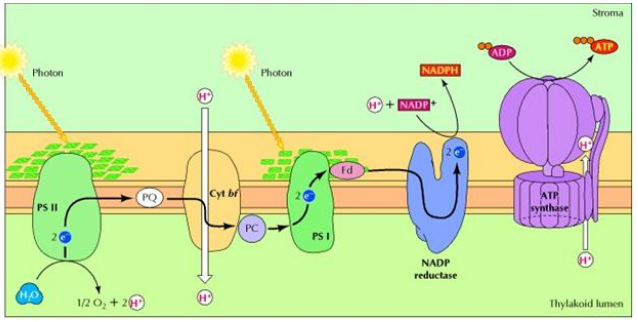
-povećana fluidnost membranskih lipida → gubitak integriteta membrana
-denaturacija membranskih proteina → “prokapavanje” membrana
-denaturacija i agregacija staničnih proteina i inaktivacija enzima
-promjena stope fotosinteze i staničnog disanja
-inhibicija biosinteze proteina
-narušavanje organizacije mikrotubula
-produkcija štetnih metabolita (uslijed oštećenja stanice)
-produkcija ROS

Učinak na razini organizma

-ovisno o razvojnoj fazi, ostalim uvjetima u okolišu (prisutnosti drugog stresnog čimbenika), genotipu

-smanjenje stope rasta
-oštećenje biljnih organa
-smrt biljke

UČINAK POVIŠENE TEMPERATURE NA FOTOSINTEZU

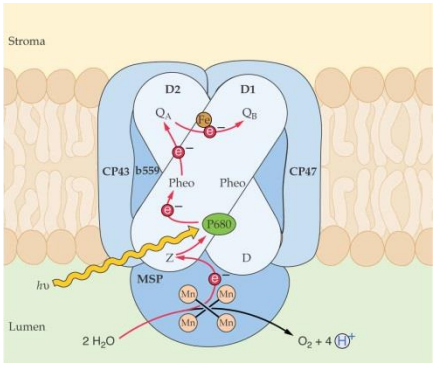


-temperaturni optimum procesa fotosinteze:
-između 20-30 °C
-iznad 30 °C - nagli pad stope fotosinteze

Tilakoidne membrane – osobito osjetljive na promjenu temperature
-promjena strukturne organizacije

-smanjena količina fotosintetskih pigmenata

PSII – termolabilan (uslijed učinka na tilakoidne membrane i disocijacije sustava za fotolizu vode → poremećaj u prijenosu elektrona; učinak na protein od 33 kDa koji u reakcijskom središtu stabilizira Mn → oslobađanje atoma Mn; učinak na proteine D1 i D2)
-različit učinak topline na PSII i PSI → oksidacija PQ



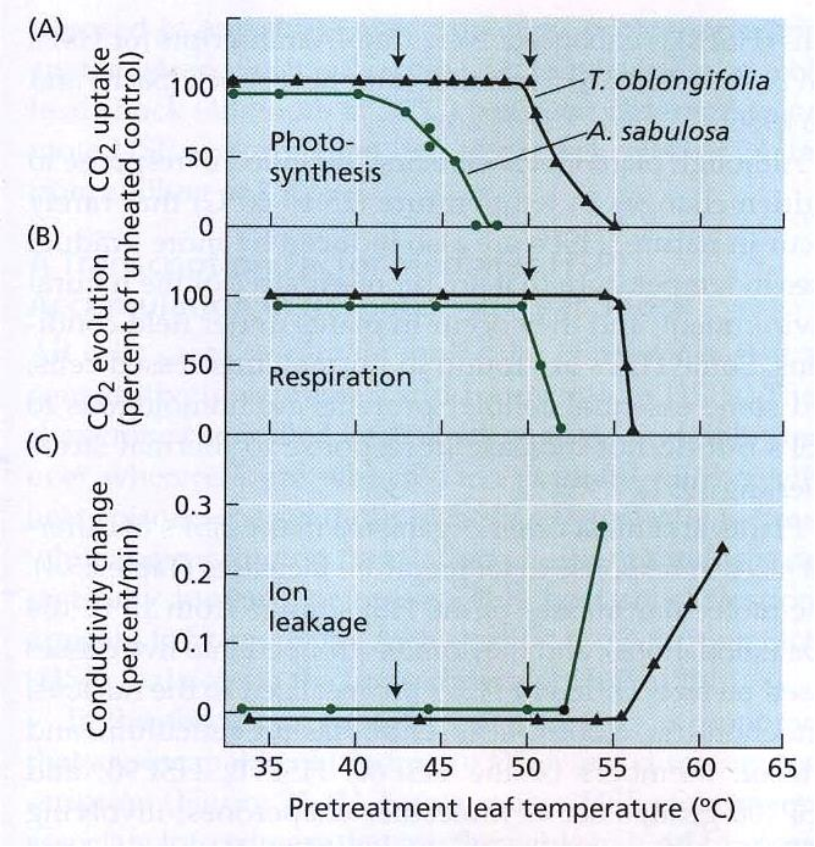
reakcijsko središte PSII

Enzim Rubisco - s porastom temp. katalitička aktivnost raste, ali afinitet prema CO_2 opada
-usporedba učinka topline na fotosintezu u C3 i C4 biljaka

-smanjena sinteza **škroba** i **saharoze** zbog jakog učinka na enzime

Primjer: Odgovor na povišenu temperaturu dviju vrsta C_4 biljaka

1. *Atriplex sabulosa* (*Chenopodiaceae*)
– samonikla u hladnoj klimi
2. *Tidestromia oblongifolia* (*Amaranthaceae*)
– samonikla u toploj klimi



-odgovor tih dviju vrsta na povišenu temperaturu se razlikuje

-neravnoteža između fotosinteze i disanja

Atriplex sabulosa

Tidestromia oblongifolia

Taiz, L., Zeiger, E. (2002). Plant Physiology.

-visoke temperature inhibiraju i fotosintezu i disanje, ali pri porastu temperature stopa fotosinteze se počinje smanjivati pri nižoj temperaturi u u usporedbi s temperaturom pri kojoj se počinje smanjivati stopa disanja
-stopa fotorespiracije raste

Aktivnost PS II - osjetljiviji na visoke temperature u vrste *A. sabulosa* u usporedbi s *T. oblongifolia*

Enzimi

Rubisco (povišena oksigenazna aktivnost, u usporedbi s optimalnom temp.)
NADP:gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
PEP-karboksilaza
→ pri povišenim temperaturama manje su stabilni u vrste *A. sabulosa* nego u *T. oblongifolia*

-temperatura pri kojoj započinje denaturacija tih enzima je znatno **viša** od temperature pri kojoj započinje pad **stope fotosinteze** kao procesa u cjelini

Mehanizmi tolerancije

-promjene membranskih lipida (npr. viši stupanj zasićenja)

-pojava proteina toplinskog šoka (heat shock proteins – HSP)

-biosinteza kompatibilnih osmolita (prolin, glicin-betain, GABA)

-uloga specijaliziranih metabolita

GABA - γ-amino maslačna kiselina

-uklanjanje ROS antioksidacijskim sustavom (SOD, CAT, APX, POD)

-promjena količine i učinka nekih biljnih hormona

-sudjelovanje brojnih drugih proteina (proteini u prijenosu signala – kinaze, fosfataze, TFs; proteini slični osmotinu; proteini LEA; dehidrini…)

TFs – transkripcijski faktori
LEA - late embryogenesis abundant (proteini kasne embriogeneze)

Proteini toplinskog šoka (HSP – heat shock proteins)

Izlaganje biljke povišenoj temp. → percepcija signala → promjena ekspresije gena i akumulacija transkripata → biosinteza HSP

-povišena stopa transkripcije i translacije HSP
-pad biosinteze "normalnih" proteina

-Indukcija HSP – univerzalni odgovor na toplinski stres u svim organizmima
-neki HSP su prisutni u svim organizmima (od bakterija do kralješnjaka)

-otkriveni u vinskoj mušici, dokazani i u drugih životinja, ljudi, biljaka i mikroorganizama
-u većoj se mjeri pojavljuju kao odgovor na izlaganje biljke temperaturi koja je za ~5 °C viša od optimalne
-najčešća uloga: šaperoni

Osnovne uloge **molekularnih šaperona**: stupaju u interakciju s već formiranim ili novosintetiziranim proteinima i sprečavaju njihovu agregaciju ili potiču deagregaciju peptidnih lanaca; pomažu pri smatanju peptidnih lanaca, olakšavaju translokaciju proteina i prelazak preko membrana, sudjeluju u prijenosu signala i aktivaciji transkripcije

Svojstva HSP

1. Neki HSP se nalaze u svim živim organizmima (i prokariotima i eukariotima); konzervirana struktura
2. U biljaka se HSP redovito induciraju u uvjetima toplinskog stresa u svim fazama razvoja i u većini HSP-a je prisutna homologija među različitim organizmima
3. Lokalizacija HSP: jezgra, mitohondriji, kloroplasti, ER, citoplazma
4. Većina HSP - uloga šaperona (npr. uspostavljanje strukture proteina nakon djelovanja povišene temperature)
5. Ekspresija nekih HSP - tijekom normalnih razvojnih procesa u biljci
6. Neki nisu inducirani povišenom temperaturom, ali se ubrajaju u HSP zbog strukturne homologije s “pravim” HSP
7. Pojedini HSP se ne javljaju isključivo kao odgovor na povišenu temperaturu, nego i kao odgovor na druge stresne uvjeta, npr. deficit vode, tretman ABA-om, ranjavanje, niske temperature, salinitet (višestruka otpornost - “cross protection”)
8. Molekularna masa: 10-200 kDa – podijeljeni u razrede – HSP100, HSP90 HSP70, HSP60, smHSP

Uloga HSP

-nije poznata za sve HSP

-**molekularni šaperoni** (HSP 60, 70 i 90 kDa) – ATP-ovisna stabilizacija i uvijanje proteina te sastavljanje funkcionalnih oligomernih proteina

-interakcija pri **prijenosu** polipeptida preko membrana (i kretanje unutar stanice)

-**stabilizacija enzima** u određenoj fazi razvoja stanice, u cilju da se enzimi kasnije aktiviraju i oslobode; npr. plastidni HSP70 u kromoplastima cvijeta narcise štiti fitoen-desaturazu (enzim u biosintezi karotenoida)

-**zaštita hidrofobnih ogranaka proteina** u vodenoj sredini (sprečavanje agregacije i nepravilnog uvijanja proteina)

-**interakcija s elementima citoskeleta** (tubulin i aktin), HSP60

-uloga u **prijenosu signala** u uvjetima toplinskog šoka

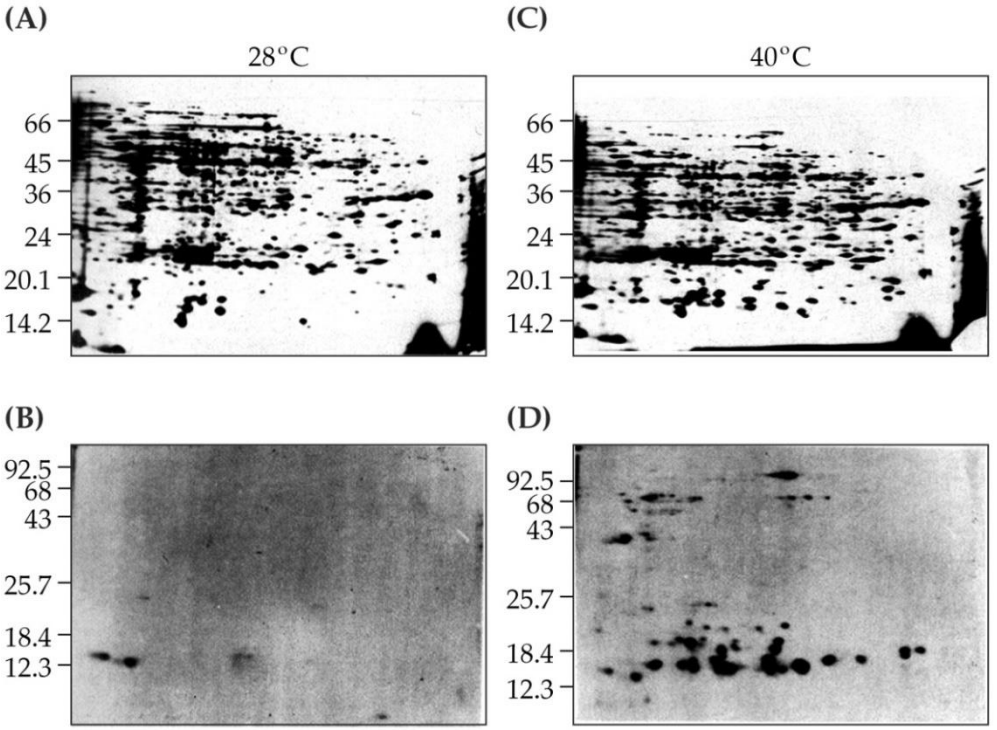
INDUCIRANA TERMOTOLERANCIJA –kratkotrajno izlaganje subletalnom toplinskom stresu u cilju postizanja tolerancije temperatura koje bi bez aklimatizacije bile letalne

Primjer 1:

Nagla promjena temp. od 28 °C do 40 °C u soje:

1. smanjena sinteza mRNA za uobičajene proteine
2. indukcija sinteze 30-50 vrsta HSP

transkripti (mRNA) za HSP
pojavljuju se 3-5 min
nakon toplinskog šoka
mol. masa: 16-104 kDa



Dvodimenzionalna PAGE
A i B – proteini pri 28 °C
C i D – proteini pri 40 °C

A i C – proteini - bojenje srebrom
B i D – proteini - vizualizirani obilježavanjem radioaktivnim aminokis.

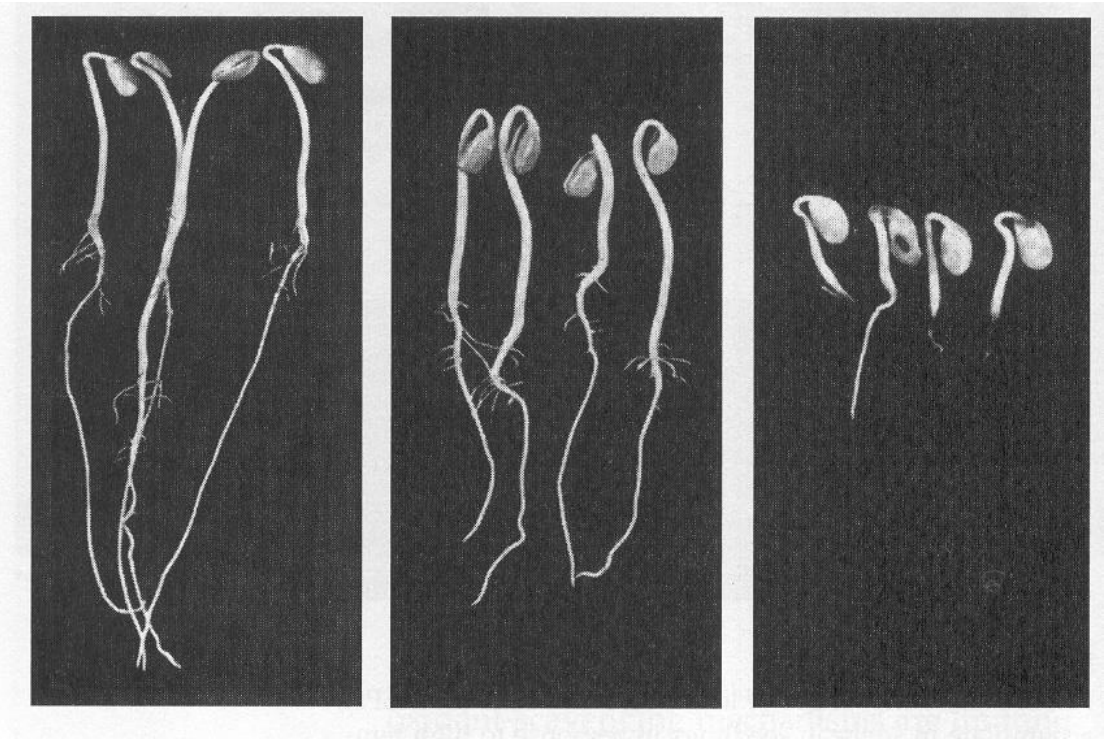
Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2002): **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**.

Primjer 2:

Termotolerancija i aklimatizacija klijanaca soje na povišenu temperaturu

Izlaganje umjereno povišenoj temperaturi (aklimatizacija) → sinteza proteina koji biljci omogućuju termotoleranciju, tj. preživljavanje onih temperatura koje bi bez aklimatizacije bile letalne

A B C



A klijanci koji su rasli pri 28 °C

B klijanci koji su pretretirani 2 sata temp. 40 °C, a zatim izloženi 2 sata temp. 45 °C

C klijanci tretirani temp. 45 °C bez pretretmana

HSP – proteini koji povećavaju stupanj termotolerancije

Pet razreda HSP – podjela na temelju molekularnih masa

Protein class	Name	Size (kDa)	Location
HSP100	hsp104 (yeast) ClpB *(Escherichia coli)* ClpA *(E. coli)*	100–114	Cytoplasm
HSP90	hsp90 GRP94	80–94	Cytoplasm ER
HSP70	DnaK *(E. coli)* BiP and GRP SSA1-4 (yeast) SSB1-2 (yeast) SSC1 (yeast) KAR2 (yeast)	69–71	 ER Cytoplasm Cytoplasm Mitochondria ER
HSP60	chaperonin 60 GroEL *(E. coli)* GroES *(E. coli)*	60 57 10	Chloroplasts and mitochondria
smHSP		15–30	Cytoplasm Chloroplast ER Mitochondria

Familija HSP 100 – proteini 100-140 kDa

- proteini iz bakterija, kvasaca, sisavaca i biljaka
- sadrže dvije konzervirane domene za vezanje ATP
- uloga - šaperoni koji ne sprečavaju agregaciju proteina već provode popravak (disagregaciju)
- proteaze u plastidima i mitohondrijima

Familija HSP90 – proteini 80-94 kDa; molekularni šaperoni

- za razliku od većine šaperona, stupaju u specifičnu i dugotrajnu interakciju s ciljnim proteinom

Familija HSP70 – proteni 69-71 kDa

- nužni za normalne stanične funkcije
- neki članovi te familije - konstitutivna ekspresija, (ostali se induciraju povišenom temperaturom ili hladnoćom)
- molekularni šaperoni ovisni o ATP - stupaju u interakciju s različitim proteinima (uloga u uspostavljanju pravilne tercijarne strukture te sastavljanju i rastavljanju proteinskih podjedinica)
- prisutni u nekoliko staničnih kompartimenata – citosolu, ER, mitohondriju, plastidima

HSP60 – proteini 57-60 kDa

- prisutni i pri normalnoj temperaturi
- u mitohondrijima i stromi kloroplasta
- glavna uloga - molekularni šaperoni; sastavljanje proteina
- *in vitro* sprečavaju agregaciju proteina
- ovisni o ATP
- u biljaka je najpoznatiji šaperonin 60 – kloroplastni protein, kodiran u jezgri; uključen u proces sastavljanja enzima Rubisco (količina mu se ne povećava u uvjetima toplinskog stresa)

smHSP – HSP niske molekularne mase; 15-30 kDa

- 5-6 razreda smHSP u biljaka, u drugih eukariota samo jedan
- C-krajevi svih razreda su homologni **α-kristalinima** (proteinima u leći oka u vertebrata)
- poput α-kristalina stvaraju komplekse (200 kDa do 800 kDa)
- sudjeluju u termotoleranciji na način da potiču stabilizaciju proteina i sprečavaju agregaciju
- nisu ovisni o ATP

Uloga specijaliziranih metabolita u toleranciji toplinskog stresa

-indukcija sinteze fenolnih spojeva (npr. flavonoida i fenilpropanoida)

-povećana aktivnost PAL – jedan od mehanizama aklimatizacije na toplinski stres

-karotenoidi – zaštita staničnih struktura u uvjetima djelovanja različitih stresnih čimbenika

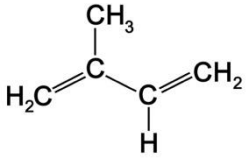
-ksantofil zeaksantin – hidrofoban i stoga uglavnom smješten u perifernom dijelu „antena" gdje štiti membrane od djelovanja ROS

-u uvjetima toplinskog i svjetlosnog stresa ksantofili se raspodjeljuju i u lipidnu fazu tilakoidnih membrana - interakcija s membranskim lipidima smanjuje fluidnost

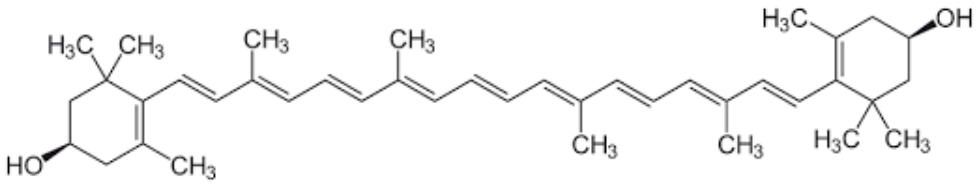
-drugi terpenoidi – npr. α-tokoferol i izopren

-stabiliziraju i štite lipidnu fazu tilakoidnih membrana (i od svjetlosnog stresa)

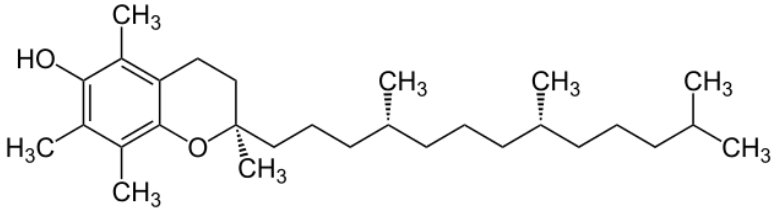
-izopren stupa u direktnu interakciju sa singletnim kisikom



izopren



zeaksantin



α-tokoferol

Uloga biljnih hormona u toleranciji toplinskog stresa

-ABA - porast količine → promjena ekspresije gena
→ indukcija nekoliko HSP, npr. HSP70

-salicilna kiselina – sudjeluje u regulaciji ekspresije gena za HSP70
stabilizira trimere HSF i pomaže vezanje na HSE

HSF – “heat shock” transkripcijski faktori koji se vežu na HSE
HSE – heat shock element

-etilen – promjena produkcije etilena (i njegovih prekursora) ovisna je o biljnoj vrsti

-giberelini i citokinini
npr. u patuljaste pšenice toplinski stres smanjuje sadržaj citokinina; posljedica je niži intenzitet primanja spremišnih tvari u sjemenke

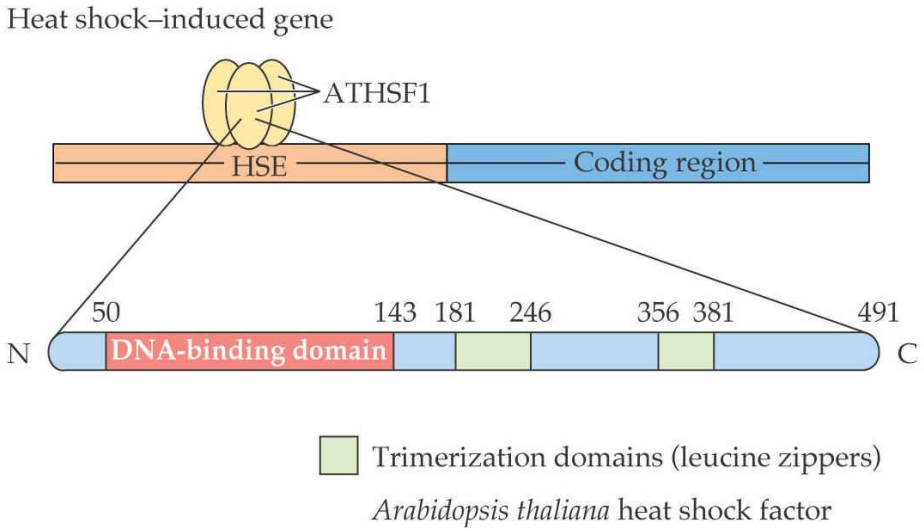
-brasinosteriodi – pospješuju termotoleranciju u rajčice i uljane repice, ali ne u žitarica

REGULACIJA EKSPRESIJE HSP

-promotori gena koji kodiraju HSP imaju regiju HSE (heat shock element); s njom stupaju u interakciju proteini HSF (heat shock transcription factors)

-porast ekspresije HSP u uvjetima toplinskog stresa
→ kontroliran transkripcijskim faktorima HSF

HSF - konstitutivna ekspresija, ali aktivacija (pretvorba monomernog u aktivni oligomerni oblik) samo u uvjetima toplinskog stresa



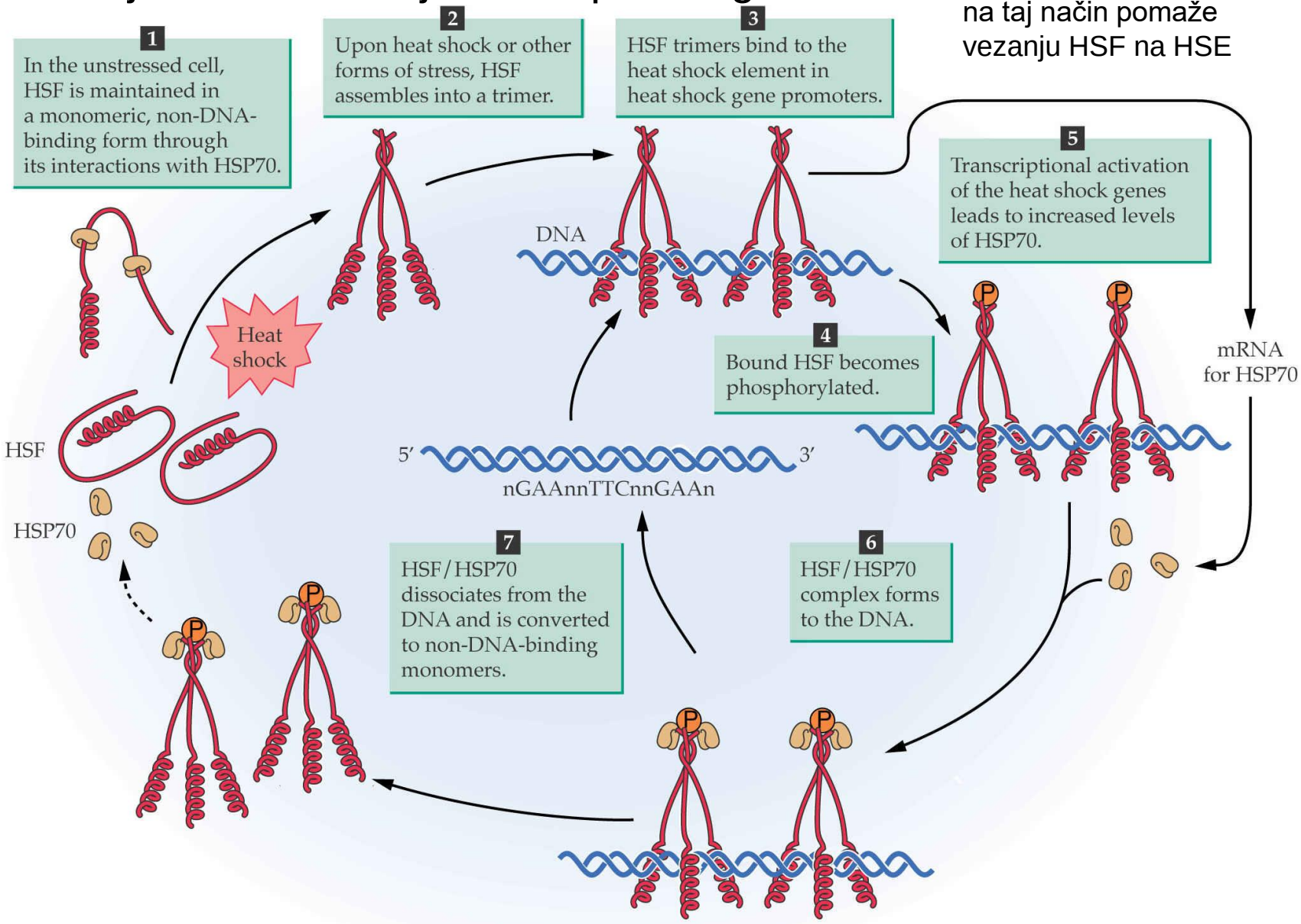
-mnogi HSE sadrže sekvencu
5'-CTnGAAnnTTCnAG-3'

HSF u uročnjaka AtHSF1
-oligomerizacija u trimerni oblik

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

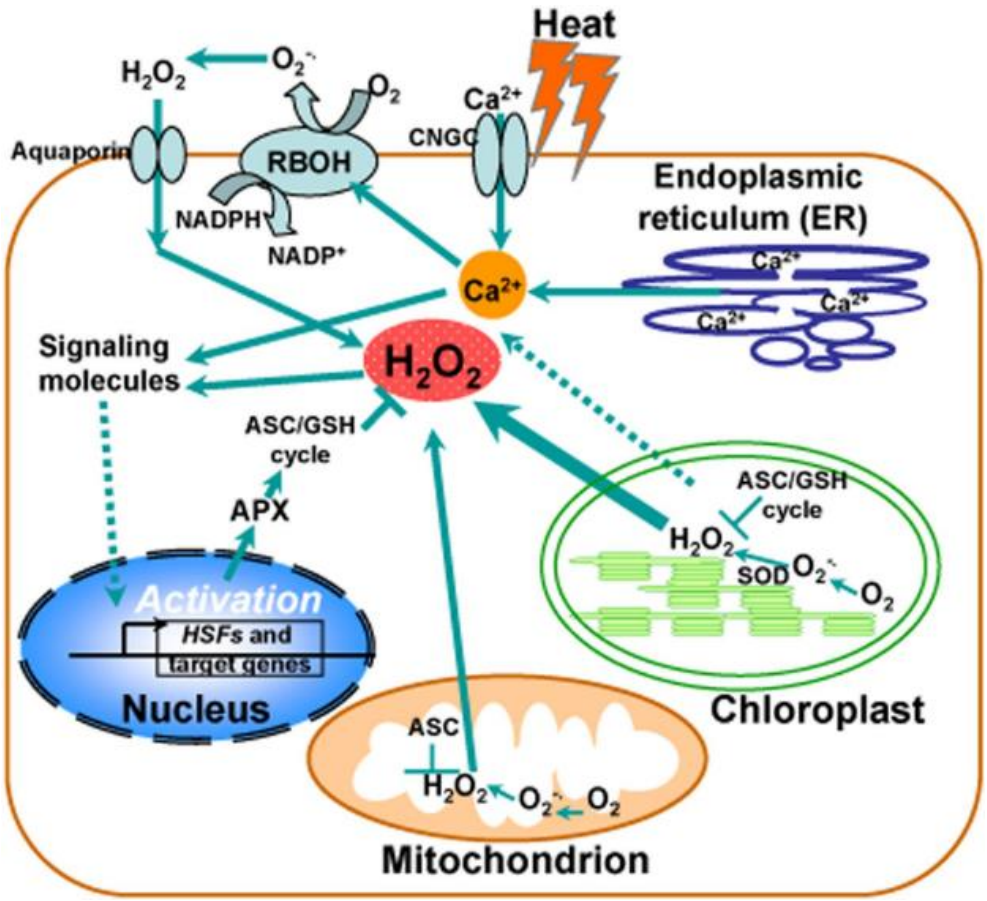
Trimerizacija – samo u uvjetima toplinskog stresa

-salicilna kiselina – stabilizira trimerni oblik HSF i na taj način pomaže vezanju HSF na HSE



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

Nastanak ROS i uloga u toleranciji toplinskog stresa



Sun A-Z and Guo F-Q (2016) Chloroplast retrograde regulation of heat stress responses in plants. Front. Plant Sci. 7:398

Primjer prilagodbe na toplinski stres

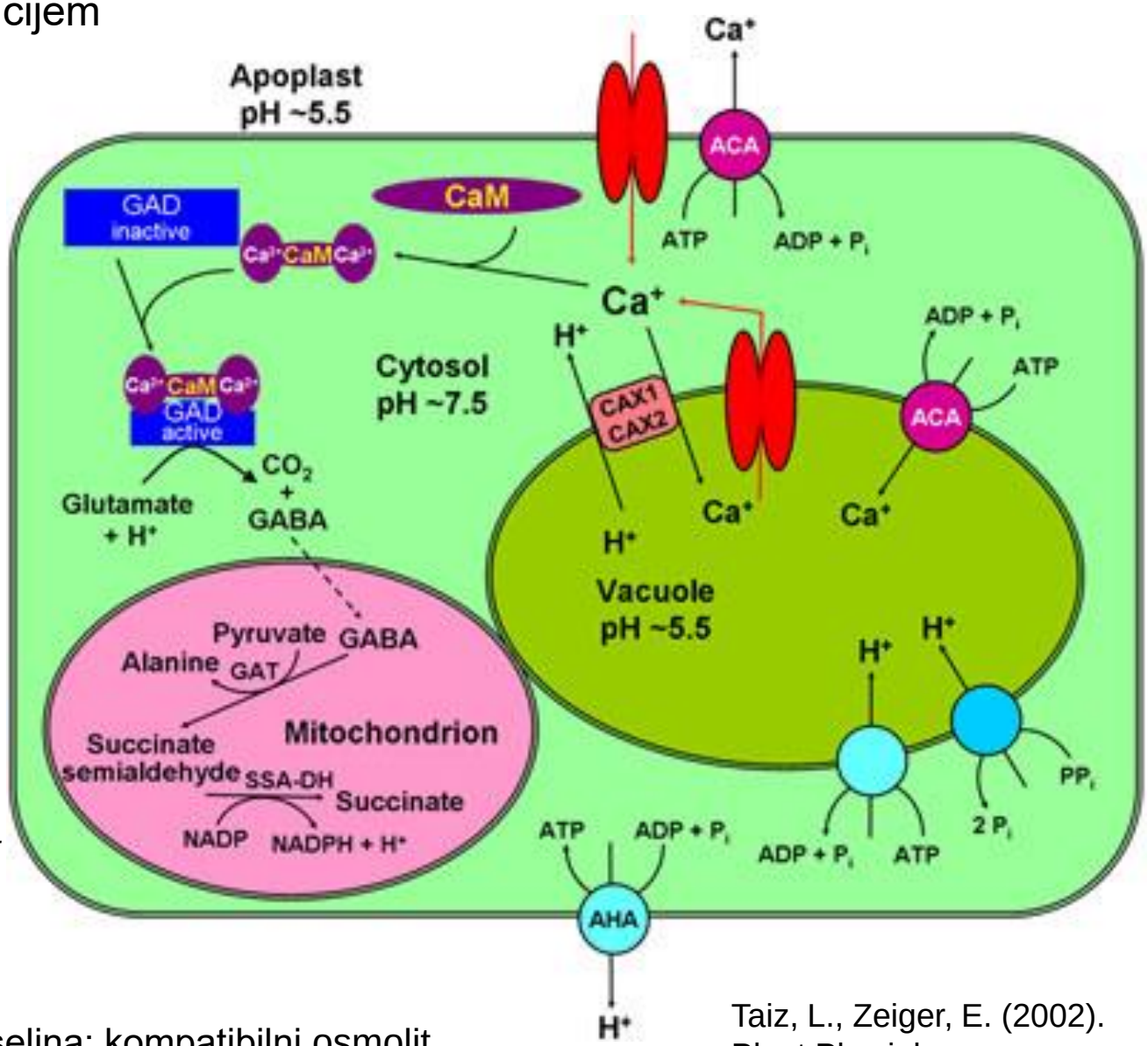
-posredovan staničnim kalcijem

-toplinski stres – pad pH vrijednosti citosola (zbog promjene aktivnosti H^+-ATP-aze) i porast citoplazmatskog Ca

-Ca aktivira CaM, koji se tada veže uz GAD i pretvara ju iz inaktivne u aktivni oblik

→ pretvorba glutamata u GABA

Uloga GABA: konzumiranje protona i stabilizacija pH vrijednosti te kompatibilni osmolit



GABA – γ-amino-maslačna kiselina; kompatibilni osmolit
GAD – glutamat dekarboksilaza; CaM - kalmodulin

Taiz, L., Zeiger, E. (2002). Plant Physiology. www.plantphys.com

LITERATURA

Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2015). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists. Wiley Blackwell.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. Environmental and Experimental Botany, 61(3), 199-223.

Mathur, S., Agrawal, D., Jajoo, A. (2014). Photosynthesis: response to high temperature stress. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 137, 116-126.