

Reaktiver Sauerstoff: tödlich und lebensnotwendig

Reactive Oxygen Species (ROS)

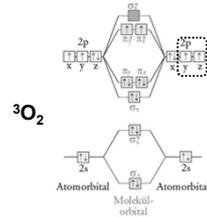
V. E. Weis (AvS mod.)

Elektronenkonfiguration von Triplett Sauerstoff (3O_2) Stabilste (energieärmste) Konfiguration (paralleler Spin der π -Elektronen).

Atomarer Disauerstoff

Sauerstoff ist das einzige gebräuchliche Gas, das vom Magnetfeld angezogen wird. Das bedeutet, es muss **paramagnetisch** sein, also **ungepaarte Elektronen** besitzen (Michael Faraday 1845).

Folglich liegt der Disauerstoff in seinem **Grundzustand** als **Triplett-Sauerstoff** vor (beachte die Spin-Paarungen: ↑↑).



Singulett-Sauerstoff (1O_2) mit antiparallelem Spin der π -Elektronen ($\uparrow\downarrow$) ist um ein Vielfaches instabiler und reaktiver. 1O_2 geht ebenfalls nur schwer kovalente Bindungen ein, reagiert aber mit Radikalen \Rightarrow und wird dann selbst zum Radikal!

Nach der Bindungsordnung (BO = bindende Elektronenpaare - antibindende Elektronenpaare, hier: $4 \cdot (1 + 2^{1/2}) = 2$) müssen die beiden Sauerstoffatome durch eine **Doppelbindung** verbunden sein.

Außerdem folgt aus den beiden ungepaarten Elektronen in den antbindenden π -Orbitalen, dass das Molekül ein **Diradikal** sein muss.

Der **Disauerstoff im Triplett-Zustand** ist also ein **Diradikal mit Doppelbindung**, was in der Lewis-Schreibweise nicht vereinbart werden kann. Diesen Sachverhalt kann man nur am **Molekularorbital-Schema** erkennen.

Durch **Energiezufuhr** von ca. 158 kJ/mol kann es zu einer **Spin-Umkehr** eines der ungepaarten Elektronen kommen, womit der Sauerstoff nun diamagnetisch wäre. Diesen nennt man **Singulett Sauerstoff**. Aus diesem Zustand kann der Singulett-Sauerstoff nicht nur wieder zum Triplett-Sauerstoff deaktiviert werden, auch ein **Übergang in einen weiteren, energieärmeren Singulett-Zustand ist hier möglich**. Hierbei wechselt ein Elektron in das schon vom anderen Elektron besetzte Orbital.

Die **längere Lebensdauer** des energieärmeren Singulett-Sauerstoffes (10^{-4} s im Vgl. zu 10^{-9} s) hängt mit der **verbotenen Spin-Umkehr** zusammen, die Deaktivierung dieses Singulett-Zustandes ist also thermodynamisch gehemmt. Doch dieses Problem wird dadurch gelöst, dass **zwei** Singulett-Sauerstoff-Moleküle miteinander je ein Elektron austauschen. Bei dieser Deaktivierung wird Energie in Form von langwelligem sichtbarem Licht frei (messbar).

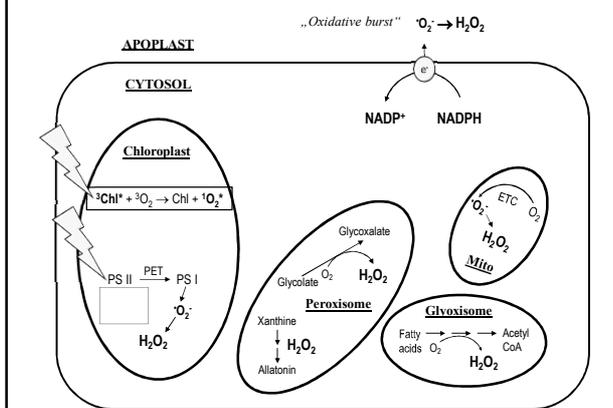
(Didaktik der Chemie Uni Bayreuth, 2010)

„Reaktive“ Sauerstoffspezies (ROS)

- 3O_2 - **Triplett Sauerstoff (Luftsauerstoff), reaktionsträge**
(Reaktivität begrenzt durch Spinpaarung und Reorientierung)
 - $^1O_2^*$ - **Singulett-Sauerstoff; Anregungszustand nach Energiezufuhr (Spin-Umkehr), sehr reaktiv**
 - $\cdot O_2$ - **Superoxidradikal*, sehr reaktiv**
 - $\cdot OH$ - **Hydroxylradikal*, hoch reaktiv (und destruktiv)**
 - H_2O_2 - **Wasserstoffperoxid*, schwach reaktiv**
 - H_2O - **Wasser, sehr reaktionsträge**
- ↓ zunehmender Reduktionsgrad

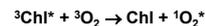
* intermediäre Redoxzustände zwischen O_2 und H_2O

Mögliche Quellen für ROS Bildung in Pflanzenzellen



Singulett Sauerstoff (1O_2)

In Pflanzen ist die **Photosynthese** wichtigste Quelle für 1O_2 . Er entsteht durch Kontakt von „normalem“ Triplett Sauerstoff (3O_2) mit **angeregten Chlorophyllen** im Triplettzustand:



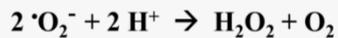
$^3Chl^*$ entsteht durch „verbotene“ Spin-Umkehr eines Elektrons im π -Orbital des Chlorophyll-Rings, z.B.

- bei übermäßiger Lichtanregung der Photosysteme
- bei Belichtung von nicht (an Proteine) gebundenen Chlorophyllen oder **Chlorophyll-Vorstufen** (während der Biosynthese!)

Superoxid und Wasserstoffperoxid

$\cdot\text{O}_2^-$ (Superoxid) ist das primäre Produkt der **Reduktion** von $^1\text{O}_2$ (Singulett Sauerstoff).

Es ist sehr instabil und reagiert rasch zum stabileren H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) weiter - spontan oder enzymatisch katalysiert (mittels Superoxid-Dismutasen, SOD).



Superoxid / Wasserstoffperoxid

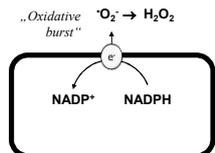
Mögliche Quellen für $\cdot\text{O}_2^-$ bzw. H_2O_2 Bildung in Pflanzenzellen

Intrazelluläre Bildung:

- in Chloroplasten (Photosystem I) bei übermäßigem Lichtangebot
- in Mitochondrien (Atmungskette) bei übermäßigem Substratangebot oder Störungen in der Atmungskette
- H_2O_2 entsteht in Peroxisomen bei Oxidation von Glycolat zu Glyoxylat (\rightarrow Photorespiration)

Induzierte Bildung:

- NADPH-Oxidase an der Plasmamembran



Biologische Wirkungen von ROS

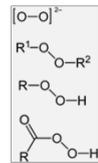
- Bei hohen Konzentrationen:
Reaktion mit Biomolekülen und **Zellschädigung**
- Bei niedrigen Konzentrationen:
Signalwirkung und Beeinflussung der Genexpression
mögliche Auslöser von **programmiertem Zelltod** (PCD)
(nicht einfach Absterben!)

Cytotoxizität von ROS

Peroxidationen:

chemische Reaktion von ROS mit $\text{C}=\text{C}$ zu **Peroxiden**

Zielmoleküle: Cys, Met, His, Trp \rightarrow Proteinschäden
Guanosin \rightarrow DNA-Schäden
Lipide \rightarrow Membranschäden

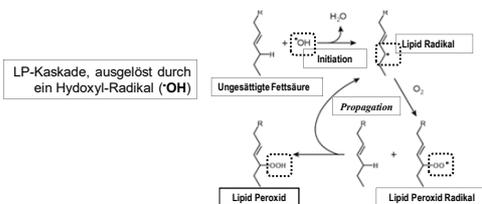


Oxidationen:

Thiolgruppen (-SH) oder Metallgruppen \rightarrow Proteinschäden

Lipid-Peroxidation (LP)

ist eine der wichtigsten Konsequenzen von ROS-Bildung in Zellen. Vor allem vielfach ungesättigte Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids, PUFA*) sind empfindlich für LP.

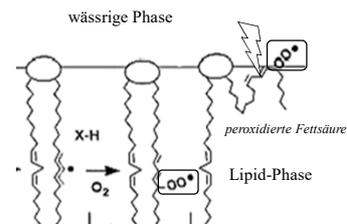


Die LP-Kaskade läuft sehr schnell ab und führt zur Destruktion von Membranen.

Da auch *Lipid-Peroxide selbst* die LP-Kaskade anstoßen, kann sich der Prozess selbst verstärken und unabhängig von der ROS-Quelle weiterentwickeln (*LP-propagation*).

LP führt zu Strukturänderungen der Lipidphase

Dabei wird die oxidierte (polarisierte!) Fettsäure zur wässrigen Phase hin exponiert (an der Membranoberfläche) und dort gespalten.



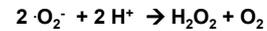
Schutz gegen ROS

- **Vermeidung** (durch Stress-Anpassung und Regulation)
- **Disproportionierung** (Redoxumlagerung)
- **Entgiftung** (durch Radikalfänger)
- **Reduktive Entgiftung** (enzymatisch)

Disproportionierungsreaktionen von Sauerstoff

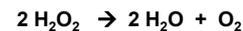
Disproportionierung von Superoxid zu stabilerem Wasserstoffperoxid und Sauerstoff:

Superoxide-Dismutase (SOD)



Disproportionierung von **Wasserstoffperoxid** zu stabilen Produkten, Wasser und Sauerstoff.

Katalase (in Peroxisomen!)



„Radikal-Fänger“ (radical scavenger)

Radikalfänger neutralisieren aggressive Radikale und *vermindern* so deren destruktives Potential:

- durch Aufnahme oder Abgabe von Elektronen; der „scavenger“ wird vorübergehend selbst zum (weniger aggressiven) Radikal
- durch Reduktion des Radikals (Übertragung von H-Atomen) mittels Reduktionsäquivalenten, wie **NAD(P)H**

MERKE: Häufig wirken beide Mechanismen zusammen!

Wichtige biologische Radikalfänger in Pflanzen und Tieren (Auswahl):

β-Carotin (Pro-Vitamin A)

in tierischen Zellen Umwandlung in Retinol = Vitamin A

Tocopherol (Vitamin E)

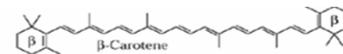
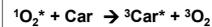
Ascorbat (Vitamin C)

Bildung: Chloroplasten

Nicht-enzymatischer Schutz durch „Radikal-Fänger“ (free radical scavenger)

Beispiel:

Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2^*$) reagiert „thermisch“ an Carotinoiden ab:



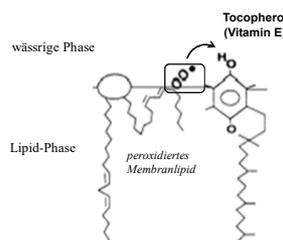
Manche Radikal-Fänger wirken sowohl **direkt** wie auch als **Substrat** von *enzymatischen Reaktionen* z.B.:

- **Tocopherol**
- **Ascorbat**
- (Violaxanthin \Rightarrow Zeaxanthin)

Tocopherol (Vitamin E)

Tocopherol fungiert als *lipophiler „Radikalfänger“* in der Membran.

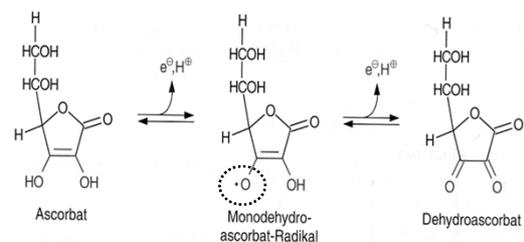
Mittels einer **Tocopherol-Peroxidase** ermöglicht es die Rückführung der Lipid-Peroxidation (an der Membranoberfläche).



Tocopherol (in der Lipid-Phase) übernimmt das freie Elektron vom Lipid-Radikal an der Membranoberfläche, **wird dadurch selbst zum Radikal** und wird über den **Ascorbat-Glutathion-Zyklus** (auf der Stroma-Seite) regeneriert, was letztlich NADPH verbraucht.

Ascorbat (Vitamin C)

eines der wichtigsten Reduktionsmittel zur Entgiftung von H_2O_2



Die Oxidation von Ascorbat zu Dehydroascorbat verläuft über die Zwischenstufe des Monodehydroascorbat-Radikals (vgl. Plastochinon = PQ, im Q-Zyklus).

Glutathion als wichtiger Redox-Puffer in Zellen

Biosynthese (zweistufige Reaktion):

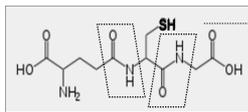
1. Glu + Cys + ATP $\xrightarrow{\text{GCL (L-Ligase)}}$ γ -Glu-Cys
2. γ -Glu-Cys + Gly + ATP $\xrightarrow{\text{GS (S-Synthase)}}$ γ -Glu-Cys-Gly

Glutathion ist ein redox-aktives **Tripeptid**



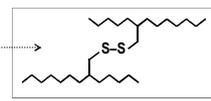
Im oxidierten Zustand bilden zwei Glu-Moleküle ein Dimer über eine **intermolekulare Schwefelbrücke**.

reduziertes Glutathion (GSH)



γ -Glu-Cys-Gly (Peptidbindungen gestrichelt)

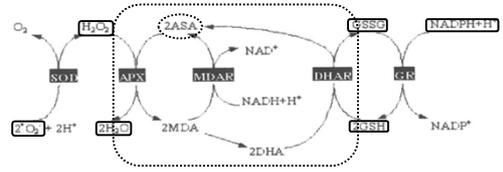
$2e^-, 2H^+$



oxidiertes Glutathion (GSSG)

Ascorbat-Glutathion-Zyklus

Reduktive **Entgiftung** von Superoxid bzw. Wasserstoffperoxid



1. **Disproportionierung** von Superoxid zu Wasserstoffperoxid (enzymatisch, durch **SOD**)
2. **Reduktion** von Wasserstoffperoxid mittels Ascorbat (ASA) zu Wasser (enzymatisch, durch **APX**) das dabei zu Mono-Dehydro-Ascorbat (MDA) oxidiert wird.
3. **Regeneration** von Ascorbat (ASA) durch **NADH** (enzymatisch, durch **MDA-Reduktase**) und/oder GSH (*reduziertes Glutathion*), enzymatisch (durch DHA-Reduktase).
4. Regeneration von GSH aus GSSG (oxidiertem Glutathion) mittels **NADPH** (enzymatisch, mittels Glutathion-Reduktase, **GR**).

ROS scavenging pathways in plant cells

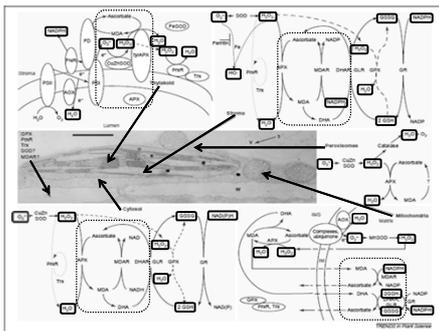
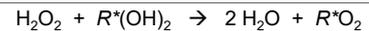


Figure from Mittler et al., 2004, Trends in Plant Science

Peroxidasen katalysieren die Oxidation von Substraten durch Wasserstoffperoxid

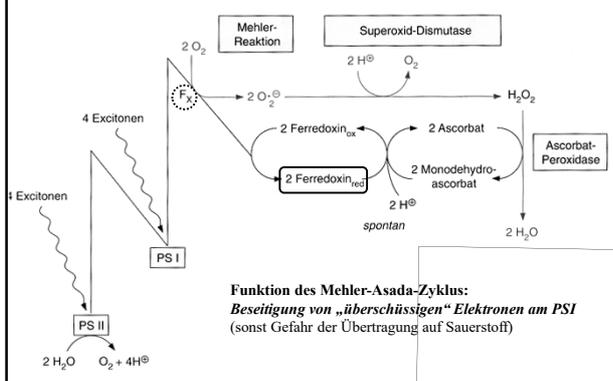


Dabei entstehen radikalische Zwischenprodukte (R^*)

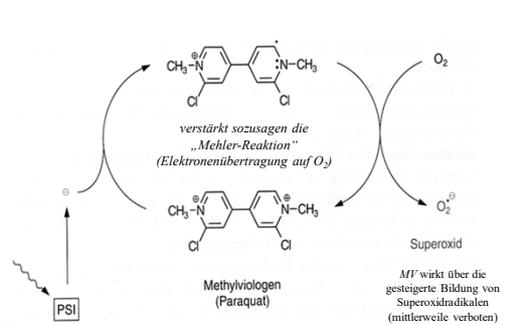
Beispiele:

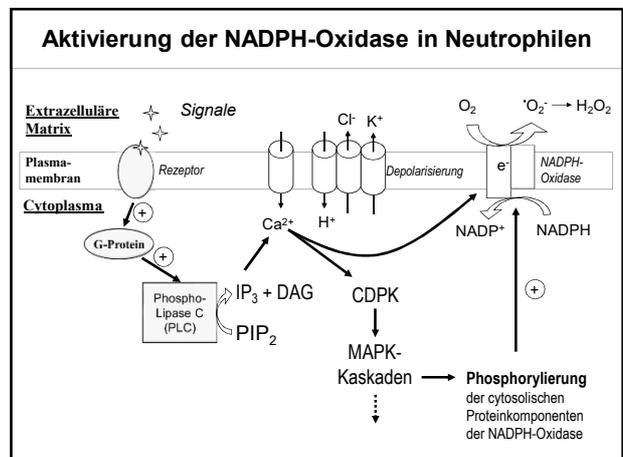
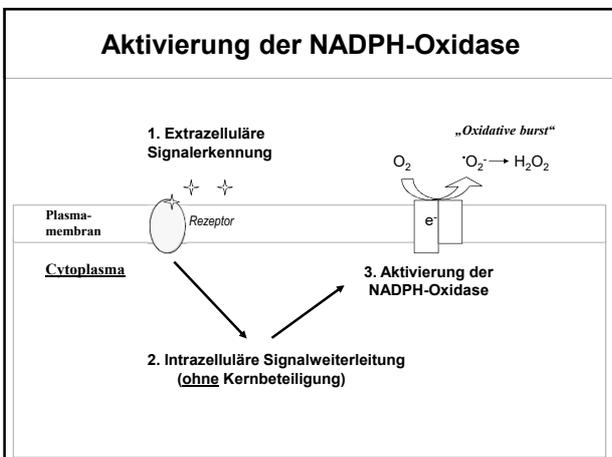
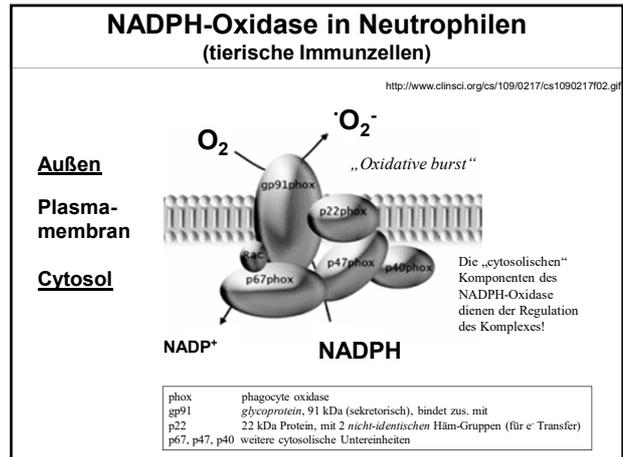
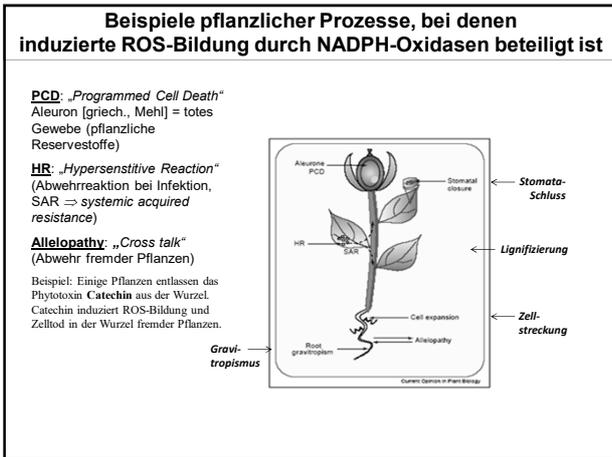
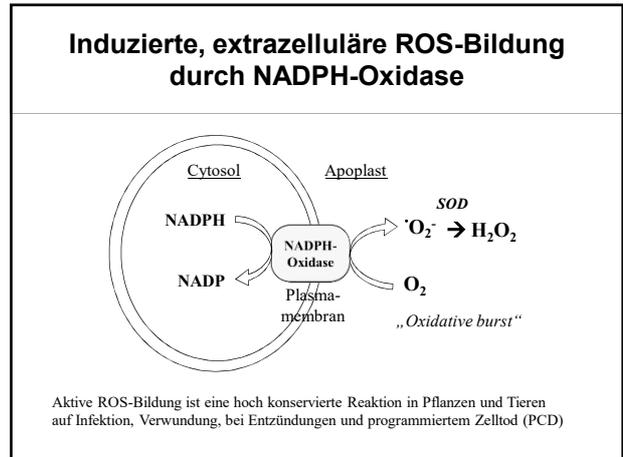
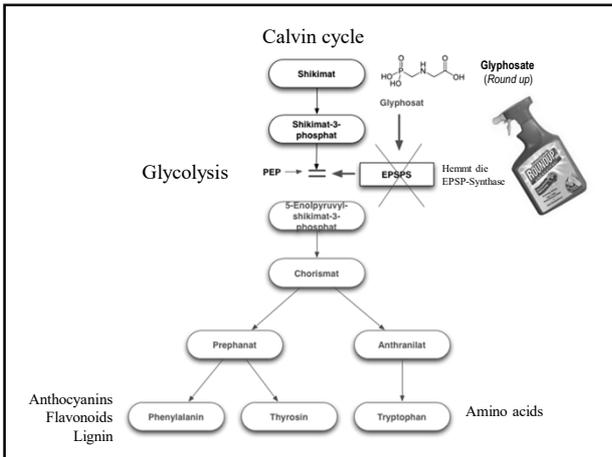
- **Ascorbat-Peroxidase (APX):**
Entgiftung von Wasserstoffperoxid, z.B. im Ascorbat-Glutathion-Zyklus
- **Gujacol-Peroxidasen (Zellwand):**
Polymerisationen von Phenolen, z.B. von Lignin-Vorläufermolekülen

Der „Mehler – Asada“-Zyklus vereint die lichtgetriebene Bildung und „Entgiftung“ von ROS



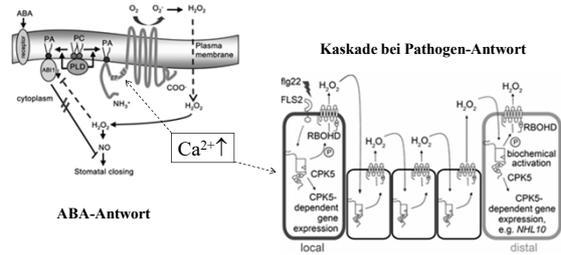
Lichtgetriebene ROS-Bildung durch das „Totalherbizid“ Methylviologen, MV = Paraquat („Gramaxone“)





Aktivierung der NADPH-Oxidase in Pflanzen

RBOH = reactive burst oxidase homologs A-J (10 Isoformen in Arabidopsis!)



Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, Li M, Yan M, Wang R, Wang L, Wei H, Zhang W, Wang X. (2009). Phospholipase D α and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell*, Aug; 21(8):2357-77.

Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassig R, Wite CP, Schulze WX, Romeis T. (2013) Calcium-dependent protein kinase/ NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *PNAS USA*, May 21;110(21):8744-9.

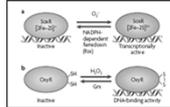
ROS Signalling

- **ROS** sind *extrem kurzlebig* (ms – s Bereich) und die toxischen Wirkungen daher *relativ unspezifisch!*
- Dennoch sind auch **ROS-spezifische Signale** nachweisbar.
- **ROS erzeugen „second messenger“** durch schnelle Oxidation von besonders empfindlichen Zellwand-Komponenten, Proteinen und Lipiden (aktuelles Forschungsgebiet!)

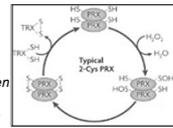
ROS Signalling

Beispiele:

1. **oxidative Modulation von Transkriptionsfaktoren (TF)**
(vergleiche Beispiele ROS-regulierter, mikrobieller TFs)



2. **oxidative Modulation von Regulatoren**
(z.B. Schema rechts)
Peroxisredoxine (PRX) und Thioredoxine (TRX) sind kleine Cystein-haltige Regulator-Proteine, die durch Redox-Wechsel von Thiolgruppen reversibel geschaltet werden



3. „Oxilipine“ (oxidierte Lipide) als **second messenger**
(Beispiele rechts)
„Oxilipine“ sind in Pflanzen oft Derivate der Linolsäure, wie Jasmonsäure = JA (in Tieren der Arachidonsäure).

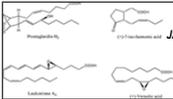
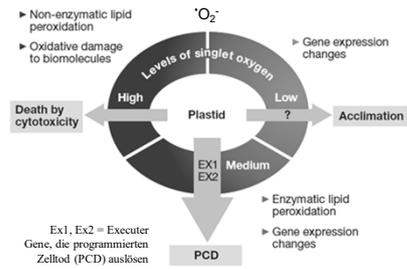


Abb. verändert aus: B. D'Autreaux et al., 2007, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 8, 813 pp.

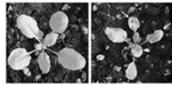
ROS signalling versus cytotoxicity



Aus: C. Kim et al. (2008) *EMBO J.* 9 (5)

Zusammenhang zwischen ROS und PCD „programmed cell death“

Programmed Cell Death - a Response to High Light, UV and Drought Stress in Plants
Witaszyńska & Karpinski (March 2013)



ROS → Aktivierung von „Executer“-Genen → **Schneller PCD**
(Plastid → Nukleus signaling)

ROS → „Executer“-defiziente Mutante → **Membranschäden „nekrotischer Zelltod“**

EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of Arabidopsis thaliana
Lee et al. (PNAS 2007)

