

Raznolika uloga glutationa u biljaka

Jolić, Dino

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:688966>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

RAZNOLIKA ULOGA GLUTATIONA U BILJAKA
THE DIVERSE ROLE OF GLUTATHIONE IN PLANTS

SEMINARSKI RAD

Dino Jolić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate study of molecular biology)

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

Zagreb, 2009.

Popis kratica

APS – adenzin-5'-fosfosulfat (adenosine-5'-phosphosulfate)

APX – askorbat peroksidaza (ascorbate peroxidase)

ATP – adenzin-trifosfat (adenosine triphosphate)

CAM – crassulacean acid metabolism

CHS – halkan sintaza (chalcone synthase)

DHA – dehidroaskorbat

DHAR – dehidroaskorbat reduktaza

GPX – glutation peroksidaza (glutathione peroxidase)

GR – glutation reduktaza

GSH – glutation

GSHS – glutation sintetaza

GSSG – glutation disulfid

GST – glutation-S-transferaza

hGSH – homoglutation

hGSHS – homoglutation sintetaza

hmGSH – hidroksimetilglutation

hmGSHS – hidroksimetilglutation sintetaza

hmPC – hidroksimetilfitohelatin (hydroxymethylphytochelatin)

HMW – visoka molekularna masa (heavy molecular weight)

hPC – homofitohelatin (homophytochelatin)

IAA – indol-3-octena kiselina (indol-3-acetic acid)

LMW – niska molekularna masa (low molecular weight)

MDHA – monodehidroaskorbat

MDHAR – monodehidroaskorbat reduktaza

MRP – multidrug resistance protein

NADPH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

PAL – fenilalanin-amonij-lijaza (phenylalanine ammonia-lyase)

PC – fitohelatin (phytochelatin)

PCS – fitohelatin sintetaza (phytochelatin synthetase)

PSII – fotosistem II (photosystem II)

RNS – reaktivni oblici dušika (reactive nitrogen species)

ROS – reaktivni oblici kisika (reactive oxygen species)

γ -EC – γ -glutamylcistein

γ -ECS – γ -glutamylcistein sintetaza

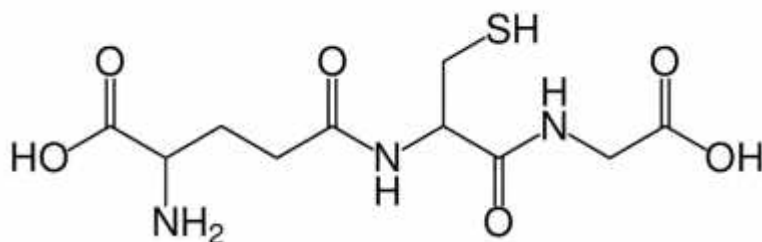
Sadržaj

1. UVOD	1
2. BIOSINTEZA, REGULACIJA, RASPODJELA IZMEĐU STANIČNIH ODJELJAKA, STANICA, BILJNIH ORGANA TE KATABOLIZAM	4
3. HOMOLOZI	9
4. ULOGA.....	10
4.1. Antioksidacijski sustav	11
4.2. Helacija	14
4.3. Konjugacija.....	15
4.4. Krioprotekcija	17
4.5. Asimilacija sumpora	17
4.6. Signalizacija.....	18
5. UPOTREBA I PRIMJENA.....	21
6. LITERATURA.....	22
7. SAŽETAK.....	28
8. SUMMARY	29

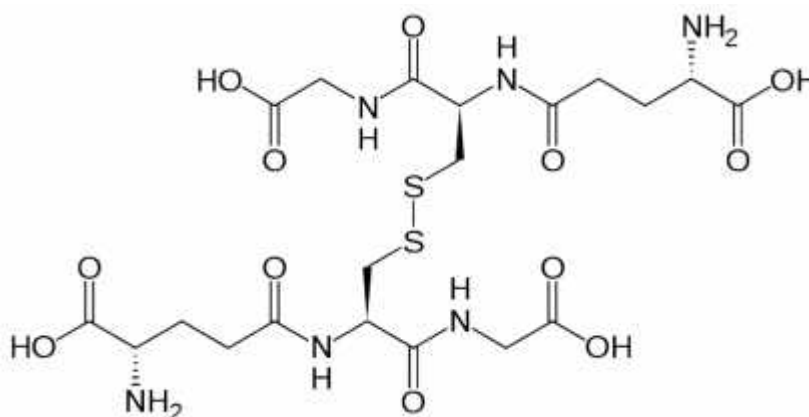
1. UVOD

Tolerantnost biljke na određeni okolišni stres jedan je od glavnih parametara koji određuju uvjete u kojima biljka može rasti. Faktori koji utječu na toleranciju određenog stresa direktno utječu na rasprostranjenost biljne vrste u prirodi. Jedan od faktora koji igra glavnu ulogu u mehanizmu smanjenja potencijalne stanične disfunkcije nastale zbog promjene redoks stanja uslijed stresa je glutathion (GSH) (Inzé i Montagu 2002). Sastavni je dio stanica različitih organizama - bakterija, gljiva, biljaka, životinja... (Prasad i Strzalka 2002) i kao takav ostao očuvan od pojave aerobnog života (May i sur. 1998a). Tijekom aerobnog metabolizma dolazi do pojave različitih štetnih oksidansa odnosno pojave oksidacijskog stresa. Kako bi se suzbile štete nastale na taj način i organizmi mogli preživjeti u novim uvjetima, došlo je do razvoja antioksidacijskog sustava kojem pripada i glutathion. Javlja se kao odgovor na brojne okolišne uvjete i djeluje na povećanje aktivnosti određenih metaboličkih puteva kako bi se sanirale posljedice stresa (Meyer i Fricker 2002). Zbog toga predstavlja direktnu vezu između okolišnog stresa i nekoliko ključnih adaptacijskih odgovora koje su biljke razvile (May i sur. 1998a). Može se koristiti kao marker za oksidacijski stres (Tausz i sur. 2003) jer se za razliku od životinja, u biljkama koristi i za direktnu redukciju peroksida (Inzé i Montagu 2002).

Primarna struktura GSH (γ -glutamilcisteinilglicin) otkrivena je 1935. Radi se o tripeptidu koji je izgrađen od tri osnovne aminokiseline - glutamat, cistein i glicin (slika 1). Stabilnost potječe od neobične γ -glutamilne veze i jake nukleofilne prirode centralnog cisteina (Inzé i Montagu 2002) koji mu daju jedinstvena strukturna svojstva (May i sur. 1998a). Jedan je od najzastupljenijih tiolnih spojeva male molekularne mase (Prasad i Strzalka 2002) te predstavlja glavni spremišni i transportni oblik ne-proteinskog reduciranog sumpora u biljkama (Tausz i sur. 2003). Biljne stanice sadrže velike količine ne-proteinskih tiola koji su važni antioksidansi i uključeni u razne funkcije preko reakcija izmjene tiol/disulfid (Foyer i sur. 1997). Sukladno tome, GSH predstavlja multifunkcionalni metabolit u biljkama (Noctor i sur. 2002) koji zbog prisutnosti -SH skupina sudjeluje u staničnoj obrani i čuvanju tiolnih skupina proteina u reduciranom obliku. Na taj način se održava njihova biološka aktivnost (Prasad i Strzalka 2002) odnosno proteini su zaštićeni od denaturacije uzrokovane oksidacijom tiolnih skupina uslijed stresa (Noctor i sur. 2002).



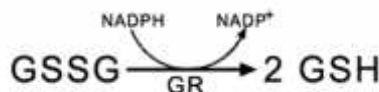
Slika 1. Strukturna formula reduciranog oblika glutationa.
Prema www.wikipedia.org



Slika 2. Strukturna formula oksidiranog oblika glutationa.
Prema www.wikipedia.org

GSH zbog redukcijskog potencijala od -0,23V djeluje kao učinkovit elektron akceptor (Xiang i sur. 2001) i lako se oksidira, od strane slobodnih radikala i drugih oksidansa, u glutathion disulfid (GSSG) (Noctor i sur. 1998) (slika 2). Stabilne proteinske disulfidne veze su rijetke, osim u mirujućem tkivu sjemenki. Biljke održavaju stanične tiolne skupine u reduciranom obliku zbog čega GSH djeluje kao dobar tiolni pufer a sam redoks par kao signal za prenošenje informacija. Stanični omjer GSH/GSSG održava se preko glutathion reduktaze (GR). To je homodimerni flavoprotein (Noctor i sur. 2002) čija je aktivnost jako izražena u kloroplastima ali postoje i citosolni, mitohondrijski, glioksisomalni i peroksisomalni enzimi (Jimenez i sur. 1998). GR katalizira redukciju, disulfidnih veza GSSG u dvije molekule GSH, ovisnu o nikotinamid adenin dinukleotid fosfatu (NADPH) (Noctor i sur. 1998) (slika 3). Učinkovitost kojom se GSSG reducira natrag u GSH (npr. prilikom inaktivacije peroksida) pridonosi njegovoj središnjoj ulozi u antioksidacijskoj obrani (May i sur. 1998a). Glutathion u reduciranom obliku daje sliku stope

redukcije i oksidacije (Noctor i sur. 1998). Oksidirani oblik predstavlja dobar indikator oksidacijskog stresa i upravlja inhibicijom proteina koja je uvjetovana pomanjkanjem vode ili sušom (Dhindsa 1991).



Slika 3. Jednadžba reakcije kataliziranoj glutation reduktazom.

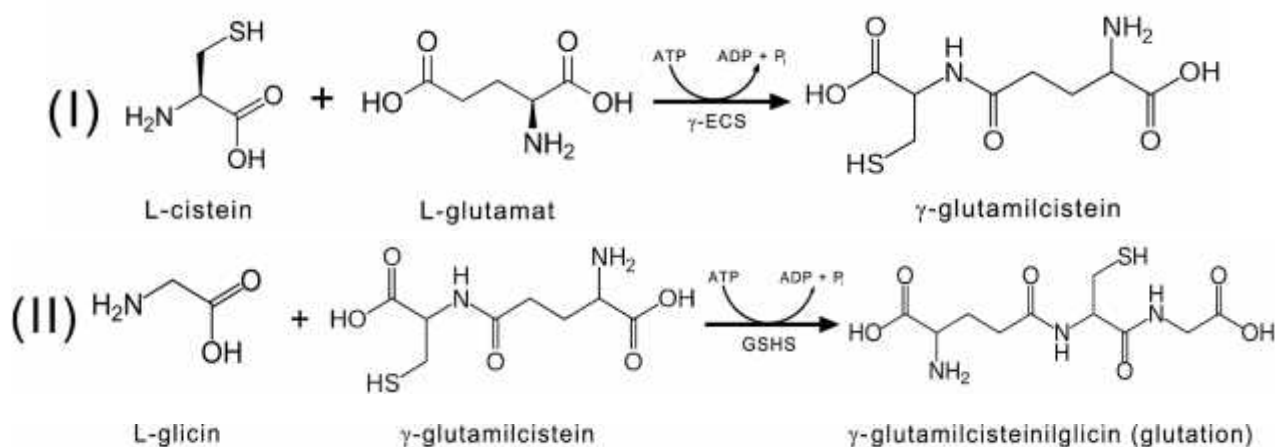
Zaliha glutationa u biljnoj stanici ima dva svojstva - koncentracija i redoks stanje. Koncentracija se mijenja sezonski i dnevno (Noctor i sur. 2002) te je određena nutricionističkim i okolišnim čimbenicima (Prasad i Strzalka 2002). Količine akumuliranog GSH ovise i o biljnoj vrsti, starosti listova, bazalnoj razini GSH i omjeru GSH/GSSG (Smith 1985). Iznosi 3-10 mM što nadmašuje koncentracije ostalih tiolnih spojeva koji sadrže cistein (Prasad i Strzalka 2002).

Redoks stanje GSH, definirano Nernstovom jednadžbom, se nalazi pod strogom homeostatskom kontrolom jer sudjeluje u održavanju glavne stanične redoks ravnoteže. Redoks stanje u listovima je konstantno i tek pod vrlo jakim stresom zaliha glutationa padne ispod 90% reduciranog oblika. Iako koncentracija i redoks stanje nisu nužno ovisni jedno o drugome, promjene u redoks stanju mogu biti signal za povećanje sinteze i ukupne koncentracije GSH (Noctor i sur. 2002).

Zbog svih vitalnih funkcija koje obavlja, nul mutacija gena koji su uključeni u sintezu glutationa je za mnoge organizme letalna što potvrđuje njegovu centralnu važnost. U biljaka, mutanti s malom koncentracijom GSH ispoljavaju znatno niži rast ali se razvijaju u jednakoj mjeri kao jedinke s normalnom koncentracijom. To upućuje na činjenicu da biljke imaju brojne druge sustave koji djeluju na istom putu (Xiang i sur. 2001).

2. BIOSINTEZA, REGULACIJA, RASPODJELA IZMEĐU STANIČNIH ODJELJAKA, STANICA, BILJNIH ORGANA TE KATABOLIZAM

Put sinteze glutaciona sličan je u biljkama, mikroorganizmima, životinjama... i sastoji se od dvije reakcije koje su strogo ovisne o magnezijevim ionima (Prasad i Strzalka 2002). Dolazi do hidrolize adenozin trifosfata (ATP) (Buchanan i sur. 2002) a reakcije se uglavnom događaju u kloroplastu i ne-kloroplastnim kompartmentima. Lokalizirane su u fotosintetskom ali i ne-fotosintetskom tkivu (Noctor i sur. 2002) kao što je npr. korijenje kukuruza (Rüegsegger i Brunold i sur. 1993). Obje reakcije su katalizirane odgovarajućim enzimom - γ -glutamilcistein sintetaza (γ -ECS) i glutation sintetaza (GSHS) (slika 4).



Slika 4. Reakcije sinteze glutaciona prikazane strukturnim formulama

U prvoj reakciji, kataliziranoj γ -ECS, dolazi do sinteze γ -glutamilcisteina (γ -EC) od L-glutamata i L-cisteina (I). U drugoj reakciji, kataliziranoj GSHS, dolazi do sinteze GSH preko adicije glicina na C-terminalni kraj γ -EC koji je prethodno aktiviran ATP-om. Rezultat je stvorena γ -peptidna veza (II) (Noctor i sur. 1998).

γ -ECS postoji samo u jednom obliku dok GSHS ima citoplazmatske i kloroplastne izoforme koje nastaju alternativnim izrezivanjem introna mRNA (Gomez i sur. 2004). Iako svi enzimi posjeduju određeni stupanj homologije, biljna γ -ECS pokazuje vrlo malo homologije s enzimom bakterija, gljiva i sisavaca (Buchanan i sur. 2002, May i Leaver 1994). Kako je njihova

enzimska aktivnost dokazana u fotosintetskom i ne-fotosintetskom tkivu razlika se očituje u tome što je aktivnost u kloroplastu ipak ponešto veća od one u ostalim kompartmentima i stanicama (Noctor i sur. 2002).

S obzirom da se za sintezu GSH koriste glutamat nastao asimilacijom dušika, cistein nastao asimilacijom sumpora i glicin nastao procesom fotorespiracije (Inzé i Montagu 2002), biosinteza GSH predstavlja integraciju nekoliko metaboličkih puteva i staničnih kompartimenata (kloroplast, peroksisom, mitohondrij, citosol...) (Kopriva i Rennenberg 2004). Sinteza GSH je jedini biosintetski put, do sada dokazan, koji koristi intermedijere procesa fotorespiracije (Noctor i sur. 1998). Koncentracija staničnog GSH određena je složenom komunikacijom između nekoliko metaboličkih faktora (dostupnost cisteina, aktivnosti sintetskih enzima međuspojeva, degradacija, oksidacija, helacija...) isprepletenih s okolišnim čimbenicima (fotoperiod, ksenobiotici, temperatura...) (Inzé i Montagu 2002). Od svih navedenih faktora, u biljaka je sinteza GSH prvenstveno kontrolirana preko enzimske aktivnosti γ -ECS i dostupnosti cisteina (Noctor i sur. 2002).

γ -ECS kinetički ograničava i određuje brzinu sinteze preko količine prisutnog γ -EC koji se u drugoj reakciji sinteze konvertira u GSH. Osim što predstavlja ograničavajući korak u sintezi (Inzé i Montagu 2002) djeluje i kao kontrolna točka. Preko nje se ostvaruje fiziološka inhibicija povratnom spregom za spriječavanje akumuliranja ne-fizioloških koncentracija GSH uzrokovanih velikom dostupnošću supstrata (Buchanan i sur. 2002). *In vitro* dokazana inhibicija sinteze GSH, preko nekovalentnog vezanja GSH za γ -ECS (May i sur. 1998a), ne igra veliku ulogu *in vivo*. Unatoč inhibicije povratnom spregom, *in vivo* sinteza GSH se može nastaviti ili u određenim slučajevima kada GSH premašuje konstantu inhibicije γ -ECS, čak i dodatno stimulirati (Inzé i Montagu 2002). U tim slučajevima je inhibicija nadjačana ali ne i ukinuta (Noctor i sur. 1998). Kako ne bi došlo do nagomilavanja GSH, favorizirat će se iznošenje dodatnog GSH iz određenog staničnog kompartimenta. *In vivo* aktivnost γ -ECS regulirana je na nekoliko razina, između ostalog i posttranslacijski također preko razine GSH (Noctor i sur. 2002). Aktivnost GSHS u većini slučajeva ne limitira sintezu GSH ali je dokazano kako ipak ima mali regulatorni utjecaj nakon što se savlada limitirajući korak γ -ECS (Noctor i sur. 1998).

Pored inhibicije enzima γ -ECS povratnom spregom, koncentracija GSH ovisi i o opskrbi sulfata iz tla (Herschbach i Rennenberg 1994). Cistein je u biljkama zbog svoje jake reaktivnosti prisutan u manjim koncentracijama (Rennenberg i Brunold 1994) te se prevodi u GSH (ili homologe) s manje aktivnim tiolnim skupinama. Dostupnost cisteina je ključni limitirajući faktor u sintezi GSH (Noctor i sur. 1998) i sama stopa njegove sinteze korelira sa sintezom GSH (Smith 1985). Učinak nije jednosmjernan; sinteza cisteina može biti regulirana kako bi odgovarala potrebama biosintetskog puta GSH (Noctor i sur. 1998).

Nakon sumpora, sinteza je limitirana dostupnošću dušika. Iako molekula GSH sadrži tri mola dušika u odnosu na samo jedan mol sumpora, sama sinteza ne zahtijeva previše dušika u usporedbi s drugim procesima koji koriste znatno veće količine (npr. sinteza proteina i nukleotida). Fluktuacije u količinama dušika stoga nemaju velik utjecaj na razine GSH (Koprivova i sur. 2000).

Zbog važnosti fotorespiratornog glicina za sintezu GSH, C4 i CAM biljke koje ne provode proces fotorespiracije, moraju osigurati dovoljne količine istog na druge načine. U C4 biljkama u uvjetima povećanog zahtjeva za GSH (povećane produkcije i nakupljanja γ -EC), glicin nastaje iz glikolata u stanicama žilnog ovoja ali u nižim koncentracijama od fotorespiratornog glicina C3 biljaka (Noctor i sur. 1998). Kako je fotorespiracija proces koji je vezan uz osvjetljenje, postoji veza između dostupnosti svjetla i količine γ -EC/GSH. U mraku je količina GSH vrlo mala dok je količina γ -EC povećana. Uslijed osvjetljavanja dolazi do sniženja količine γ -EC a povećava se GSH. Nastala konverzija vezana je uz nagli porast količine glicina i serina jer glicin postaje jedan od glavnih limitirajućih faktora konverzije γ -EC u GSH u mraku (Noctor i sur. 1998). Serin nije toliko ključan jer osim fotorespiracijom nastaje i alternativnim putevima u plastidima (Ho i Saito 2001).

Osim prethodno navedenih načina regulacije postoji i hormonska kontrola. Jasmonska kiselina regulira akumulaciju mRNA γ -ECS i GSHS (Xiang i Oliver 1998) dok tretman apscizinskom kiselinom dovodi do povećanja količine GSH direktno ili indirektno preko novonastalih reaktivnih oblika kisika (ROS) (Jiang i Zhang 2001). Moguće je da fitohormoni djelovanjem u sklopu stresom induciranih diskretnih signalnih puteva, biljkama omogućavaju razlikovanje

različitih vrsta stresa i aktivaciju odgovarajućeg odgovora na specifični podražaj (May i sur. 1998b). Ovakav model diskriminacije između različitih stresnih podražaja je moguć zbog zamijećene modulacije post-transkripcijske i post-translacijske aktivnosti γ -ECS. Ona može postati adaptirana na određeni stres preko različitih senzora stresa i signalnih proteina (Inzé i Montagu 2002).

U različitim stanicama i tkivima nije jednaka stopa sinteze GSH te se najviše koncentracije uglavnom nalaze u listovima (Noctor i sur. 2002). Iz njih se prenosi i raspodjeljuje floemom po plodovima, sjemenkama i korijenju (Leustek i sur. 2000). Sinteza je različita i između biljaka koje koriste C3 i C4 fiksaciju ugljika. Kod listova C3 biljaka najviša koncentracija detektirana je u stanicama trihoma koji obavljaju obrambenu ulogu izlučivanjem štetnih tvari kao što je kadmij. Sadrže višu ekspresiju enzima sinteze cisteina i GSH te je sama razina GSH 2-3 puta viša nego u okolnim bazalnim i epidermalnim stanicama. Kod listova C4 biljaka kao što je kukuruz, postoji međustanična raspodjela GSH metabolizma. GR je lokalizirana isključivo u stanicama lisnog mezofila dok su ostali enzimi, bitni za metabolizam antioksidansa ograničeni na stanice žilnog ovoja ili jednako raspoređeni u obje vrste stanica. Aktivnost GR u stanicama lisnog mezofila se može objasniti nedostatkom reduktanata u stanicama žilnog ovoja što može biti uzrokovano nedostatkom ili nedovoljnom količinom NADPH koji je nužan za redukciju GSSG ili dihidroaskorbata (DHA). Navedeni spojevi koji nastanu oksidacijom u stanicama žilnog ovoja se moraju prenositi u stanice lisnog mezofila kako bi se reducirali. Sinteza GSH je zbog toga isključivo prisutna u stanicama koje sadrže GSH te su stanice žilnog ovoja direktno ovisne o stanicama lisnog mezofila u kojima se obavlja sinteza i redukcija. Dokazano je i aktivno preuzimanje oba oblika glutationa iz okoline ali se preko češćih prijenosnih puteva daje prednost reduciranom obliku (Noctor i sur. 2002).

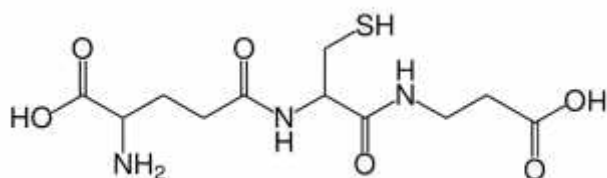
Unutarstanična koncentracija GSH je različita od kompartimenta do kompartimenta i postoji prijenos GSH između njih zbog ujednačenja njegove koncentracije (između citosola i kloroplasta). Pored razlika u koncentraciji postoje i razlike u redoks stanju koje su ključne za staničnu signalizaciju kloroplast-citosol te apoplast-citosol (Noctor i sur. 2002).

Prijenos GSH preko ovojnice kloroplasta još nije u potpunosti istražen dok za prijenos u/iz vakuole preko tonoplasta postoji prijenosnik za konjugate glutaciona. U većini slučajeva se konjugati formiraju u citosolu i zatim prenose u vakuolu preko navedenog prijenosnika ovisnog o magneziju i ATP-u. Aktivnost ovakve vrste prijenosnika i sam prijenos bivaju regulirani okolišnim uvjetima što je u većini slučajeva prisustvo ksenobiotika. Konjugati antocijana i medikarpina se također prenose u vakuolu preko specifičnih prijenosnika za glutacion konjugate gdje se dalje metaboliziraju (Noctor i sur. 2002). Razvoj ovako specifičnog prijenosnika nastao je zbog inhibicijskog učinka kojeg konjugati glutaciona imaju na GR, glutacion-S-transferazu (GST) i prijenos GSH/GSSG preko plazmatske membrane te potrebe za brzim uklanjanjem iz citosola u druge stanične kompartimente (Jamai i sur. 1996.).

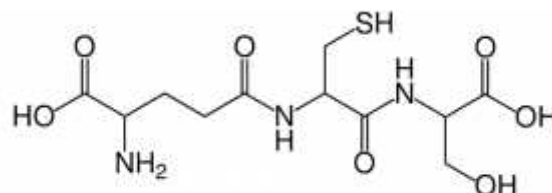
Metabolizam GSH pored sinteze i prijenosa uključuje i njegov katabolizam koji se ostvaruje preko tri puta – kataboličkog puta GSH i GSSG te kataboličkog puta glutacion konjugata. Katabolički put GSSG se koristi za detoksikaciju odnosno vraćanje u stanje homeostaze prije nastalog stresa. Razlog je povećanje koncentracije GSSG do razina koje su inkompatibilne s ostalim metaboličkim reakcijama. Katabolički put GSH, dobro poznat kod životinja, koristi se za remobilizaciju cisteina iz molekule GSH. U biljaka se događa u uvjetima pomanjkanja sumpora ili tijekom pohranjivanja u sjemenke. Kataboliziranje se događa postupno i u nekoliko koraka koji još nisu dobro poznati. Temelji se na kidanju dviju peptidnih veza pomoću dipeptidaza. Biljke koriste homologan proces uz postojanje dodatnih enzima koji omogućavaju učinkovitije kataboliziranje do početnih supstrata za sintezu GSH. Katabolički put glutacion konjugata odvija se u vakuoli i u većini slučajeva dolazi do odcjepljivanja konjugiranog GSH (Noctor i sur. 2002).

3. HOMOLOZI

Određene biljne vrste umjesto GSH sintetiziraju homologne oblike. Vrste iz reda *Fabales* umjesto ili kao dodatak GSH u listovima, korijenju i sjemenkama sadrže tiolni tripeptidni homolog (Klapheck 1988) - homoglutation (hGSH) koji umjesto glicina sadrži β -alanin. Vrste iz porodice *Poaceae* sadrže hidroksimetilglutation (hmGSH) gdje je glicin zamijenjen serinom (slika 5 i 6). Dokazano je i postojanje trećeg razreda homologa GSH u kukuruza gdje je glicin zamijenjen glutamatom ali njegova funkcija još nije poznata (Buchanan i sur. 2002).



Slika 5. Strukturna formula hGSH.



Slika 6. Strukturna formula hmGSH.

Postojanje i raspodjela homologa GSH uvjetovani su specifičnošću njihovih sintetaza (Matamoros i sur. 1999). Specifične GSHS, odnosno homoglutation sintetaze (hGSHS), mahunarki mogu koristiti glicin za formaciju GSH ili β -alanin za formaciju hGSH (Noctor i sur. 2002). Nedavno je dokazano kako su GSHS i hGSHS mahunarki kodirani odvojenim genima. Divergencija u specifičnosti se dogodila zbog duplikacije gena poslije evolucijske divergencije lepirnjača (Frendo i sur. 1999).

4. ULOGA

Uloge GSH ovise o njegovoj koncentraciji i redoks stanju sveukupne zalihe glutaciona koje su zajedno kontrolirane kompleksnom integracijom biosinteze, degradacije, oksidacije, redukcije, prijenosa... (Noctor i sur. 2002). Zbog kemijske reaktivnosti tiolnih skupina pogodan je za niz biokemijskih uloga u svim organizmima (Shao i sur. 2008). Iako je bitan za nekoliko "normalnih" metaboličkih funkcija, u prvom redu služi za zaštitu biljke od okolišnog stresa (Xiang i sur. 2001). Veliku važnost ima nukleofilna priroda tiolnih skupina za stvaranje merkaptidnih veza i reakciju s određenim elektrofilima (Shao i sur. 2008). Utjecaj okolišnog stresa na biljku se često odražava kao promjena u omjeru ili redoks stanju glutaciona [GSH/GSH+GSSG] i akumulaciji GSSG. GSH kao antioksidans predstavlja informacijom bogati redoks pufer koji je bitan za redoks signalizaciju u integraciji staničnih komponenata (Shao i sur. 2008).

GSH kao antioksidans prvenstveno djeluje na uklanjanje peroksida i ROS u uvjetima oksidacijskog stresa (Buchanan i sur. 2002). To potvrđuje strategija otpornih biljaka kao što su klijanci riže koji za vrijeme submerznog rasta imaju vrlo slabo razvijenu antioksidativnu obranu. Kada klijanci dođu u dodir s atmosferom, do tada inertne zalihe GSH neutraliziraju radikale nastale u prvoj fazi naglog oksidacijskog stresa i dopuštaju razvoj ostalih sustava zaštite. Prije se smatralo kako je GSH dovoljan za dostizanje maksimalne otpornosti na smrzavanje što se pokazalo krivim jer GSH nema veliku ulogu u zaštiti biljke od niskih temperatura (Brunold i sur. 1996). Već je navedeno kako GSH ima ulogu glavnog staničnog spremišnog oblika sumpora i regulira njegovu raspodjelu po organima (Inzé i Montagu 2002, Noctor i sur. 1998). Bitan je za zaštitu biljke od povećanih koncentracija teških metala (May i sur. 1998a), direktno preko djelovanja GST ili indirektno preko njegove integracije u fitohelatine (Buchanan i sur. 2002, Xiang i Oliver 1998). Obavlja detoksikaciju ksenobiotika, aktivira i konjugira fitohormone i fenilpropanoide u procesu biosinteze i akumulacije antocijana, djeluje na sintezu različitih proteina (Matamoros i sur. 1999). Regulira fotosintetske enzime i prienos elektrona u primarnim reakcijama fotosinteze, u visokim koncentracijama pronađen je i u jezgri gdje osigurava otpornost molekule DNA na biotički i abiotički stres. Regulira gensku ekspresiju obrambenih

gena, stanični ciklus i njegov signalni sustav (stanična proliferacija) preko vlastitog redoks stanja (May i sur. 1998a)...

Za vrijeme raznih oblika okolišnog stresa dolazi do indukcije GSH, pri čemu dinamika promjene količine GSH prati opće poznatu koncepciju stresnog odgovora - početna faza popraćena aklimatizacijskom fazom, uspostava nove ravnoteže ili degradacija sustava ukoliko dođe do neuspješne aklimatizacije (Brunold i sur. 1996). Pojedine faze se mogu prepoznati mjerenjem razine i redoks stanja GSH zbog čega on može služiti i kao stresni marker. Prvo dolazi do promjene redoks stanja GSH i aklimatizacije. Ukoliko je aklimatizacija uspješna dolazi do porasta koncentracije glutationa i enzimske aktivnosti što rezultira većom količinom i regeneracijom GSH. Ukoliko je aklimatizacija neuspješna događa se progresivna degradacija i oksidacija zaliha GSH (Tausz i sur. 2003).

4.1. Antioksidacijski sustav

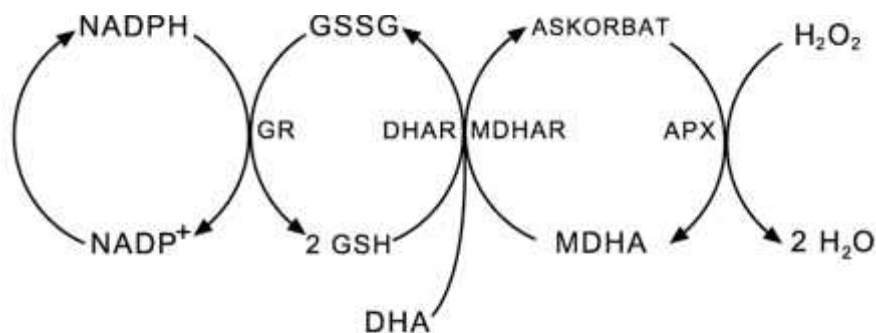
Kao posljedica aerobnog života više biljke parcijalnom redukcijom molekularnog kisika proizvode ROS od kojih su najzastupljeniji superoksidni radikal i vodikov peroksid. ROS nisu isključivo štetni jer njihovom eksplozivnom produkcijom na plazmatskoj membrani biljke provode signale o promjenama koje se događaju u njihovom okolišu. Djeluju kao sekundarni glasnici u mnogim procesima koji su povezani s biljnim rastom i razvojem (Shao i sur. 2008). Oksidacijski stres uzrokovan je povećanom produkcijom ROS i posljedica je gotovo svih nepovoljnih okolišnih učinaka na biljke (Elstner i Osswald 1994). Povećana produkcija ROS sastavni je dio procesa senescencije (Kar i Feierabend 1984) nakon čega dolazi do gubitka klorofila i proteina, povećane lipidne peroksidacije i propusnosti membrana što naposljetku dovodi do pada fotosintetskog kapaciteta (Thompson i sur 1987).

Antioksidacijski sustav s nizom antioksidansa predstavlja dobro rješenje protiv ROS i fitotoksične peroksidacije. Iako je vitamin C (askorbinska kiselina) najpotentniji antioksidans, bitni su vitamin E (α -tokoferol) i GSH o kojem ovisi regeneracija vitamina C (Schmidt i Kunert 1986). Dokazano je kako dolazi do nakupljanja GSH tijekom oksidacijskog stresa (Noctor i sur. 1998). Povećane koncentracije u listovima se tumače kao aklimatizacija na navedeni stres (Tausz

i sur. 2003) i pojačavanje antioksidacijskog sustava (Polle i Rennenberg 1992). Osim koncentracije GSH koja se može ali i ne mora povećati, dolazi do promjene omjera redoks stanja više prema GSSG (Tausz i sur. 2003). Ukoliko dođe do opadanja razine GSH biljka postaje osjetljiva na oksidacijski stres. U slučajevima kada se to nije dogodilo unatoč padu razine GSH, dolazi do nagle produkcije ostalih antioksidansa koji kompenziraju nedostatak GSH i sprječavaju preveliku osjetljivost. Glavna determinanta otpornosti na oksidacijski stres nije količina nego sposobnost regeneracije GSH. To se postiže prekomjernom produkcijom GR i štiti biljku od oksidacijskog stresa i fotoinhibicije u kloroplastima (Noctor i sur. 1998).

Glutation peroksidaze (GPX) omogućavaju uklanjanje peroksida direktno pomoću GSH što nije najučinkovitiji način. Biljne GPX ne sadrže selen kao peroksidaze sisavaca i kataliziraju isključivo GSH-ovisnu redukciju peroksida vrlo malom brzinom u odnosu na brzinu nastajanja peroksida (Noctor i sur. 2002). Unatoč slaboj konstitutivnoj ekspresiji i maloj aktivnosti, induciraju se oksidacijskim stresom i u kloroplastima. Mnogo su važnije u drugim područjima oksidacijskog metabolizma gdje uklanjaju lipidne ili alkilne perokside (znatno bolje od vodikovog peroksida) i sprječavaju oksidativnu degradaciju molekule DNA. GST koje jednako tako mogu biti inducirane oksidacijskim stresom, odnosno prisustvom ROS, imaju sličan mehanizam djelovanja kao GPX u redukciji ROS (Inzé i Montagu 2002).

Zbog velikih količina askorbata, GSH i NADPH koje su prisutne u biljnoj stanici, glutation-askorbatni ciklus (Beck-Halliwel-Asada ciklus) predstavlja glavni način uklanjanja suviška peroksida (Brunold i sur. 1996) i superoksida (slika 7). Prvenstveno se događa u plastidima (Noctor i Foyer 1998) ali postoji i u citoplazmi, mitohondrijima i peroksisomima (Tausz i sur. 2003). Izrazita aktivnost ciklusa u kloroplastima najvjerojatniji je uzrok nedostatka aktivnosti katalaze u istom kompartmentu.



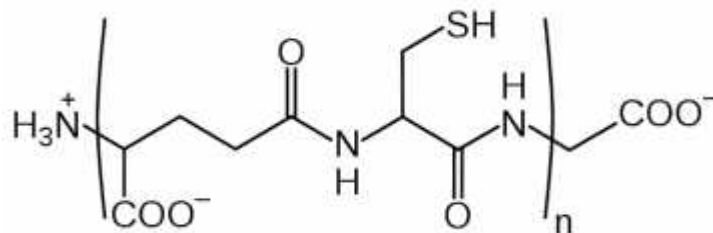
Slika 7. Shema glutation-askorbatnog ciklusa.

Glavna uloga GSH u ovom ciklusu je reredukcija askorbata iz monodehidroaskorbata (MDHA). Askorbat peroksidaza (APX) reducira peroksid u vodu oksidacijom askorbata. Redukcija GSSG uz utrošak NADPH u kloroplastima također rješava „pritisak“ elektrona. Time se umanjuje nastanak ROS u fotosistemima te održava normalna dinamika uspostavljanja transtilakoidnog pH gradijenta (Foyer i sur. 1997). Ukoliko se MDHA brzo ne ukloni iz stanice, disproportionira se na dehidroaskorbat (DHA) i askorbat (Brunold i sur. 1996). Pri lužnatoj pH vrijednosti GSH može reducirati DHA u ne-enzimskoj (Winkler 1992) i enzimski kataliziranoj reakciji. Unatoč brznoj ne-enzimskoj redukciji DHA od strane GSH pri lužnatoj pH vrijednosti, enzimski katalizirane reakcije su mnogo brže i događaju se češće (Noctor i sur. 1998). Promjene u radu glutation-askorbatnog ciklusa vidljive su u dva od tri redoks para - DHA/askorbat i GSH/GSSG. Kako ciklus također slijedi općeniti sustav stresnog odgovora može se pratiti preko navedenih redoks parova. Zbog povećanja količine ROS (Vranova i sur. 2002) dolazi do većeg udara na ovaj ciklus. Događa se promjena omjera GSH/GSSG više prema GSSG (Noctor i sur. 2002) što odgovara inicijalnoj fazi stresnog odgovora. U aklimatizacijskoj fazi dolazi do povećanja antioksidansa i enzimске aktivnosti te uspostavljanja nove ravnoteže (Tausz i sur. 2003). Sveukupna koncentracija antioksidansa ostaje jednaka zbog neprestanog trošenja i regeneracije a mijenjaju se obrtni brojevi enzima za GSH (Masi i sur. 2002).

Ozon također u određenoj mjeri sudjeluje u oksidacijskom stresu. Iako potiče sintezu GSH (ali ne i promjenu u redoks stanju) nema direktnog djelovanja GSH na zaštitu od ozona. Razlog tome je što ozon ulazi preko puči listova i djeluje na produkciju ROS u apoplastu gdje GSH uopće nema ili je prisutan u vrlo malim količinama (Vanacker i sur. 1998). GSH i u ovom slučaju djeluje indirektno jer ozon oksidira askorbat koji se rereducira pomoću GSH (Noctor i sur. 1998).

4.2. Helacija

Glavni mehanizam detoksikacije teških metala temelji se na separaciji od staničnog metabolizma, vezanju u komplekse i prijenosu u druge stanične odjeljke (u biljnim stanicama najčešće u vakuolu). Fitohelatini (γ -glutamilpolipeptidi, poli-(γ -glutamilcistenil)glicin, Cd-peptidi, PC), derivati GSH i njegovih homologa (Brunold i sur. 1996), su helatori teških metala. Sudjeluju u njihovoj detoksikaciji ali nisu glavni izvor otpornosti u prirodnim uvjetima (slika 8). Glutamat se nalazi na N-terminalnoj poziciji s cisteinom vezanim na njegovu γ -COOH. Između njih nastaje neobična γ -peptidna veza zahvaljujući kojoj su fitohelatini otporni na razne peptidaze. C-terminalna aminokiselina dijeli fitohelatine u pet skupina a pronađena je i šesta (Prasad i Strzalka 2002).



Slika 8. Molekula fitohelatina prikazana strukturnom formulom, $n = 2-11$.
Prema www.wikipedia.org

Fitohelatin se sintetizira u citosolu kataliziranom polimerizacijom GSH. Enzim koji katalizira reakciju je fitohelatin sintaza (γ -glutamilcisteindipeptidil transpeptidaza, PCS). Katalizira transport γ -EC skupine GSH donora na akceptorsku molekulu GSH ili kraći lanac fitohelatina ($n=2$). Većina fitohelatina koji se sintetiziraju kao odgovor na teške metale sastoje se od ponavljajućih γ -glutamilcisteina s C-terminalnim glicinom (Prasad i Strzalka 2002). Sukladno postojanju homologa glutationa, u različitim biljnim vrstama postoje i homolozi fitohelatina. γ -EC donorsko mjesto fitohelatin sintaze je izrazito specifično za GSH dok akceptorsko γ -EC mjesto može vezati i druge tripeptide kao što su hGSH i hmGSH (Klapheck i sur. 1995). Homolozi fitohelatina biljnih vrsta reda *Fabales* su homofitohelatini (hPC) dok vrste porodice *Poaceae* sadrže hidroksimetilfitohelatine (hmPC) (Buchanan i sur. 2002).

Fitohelatini mogu helirati teške metale zbog visokog udjela cisteina u svojim molekulama. Direktno vežu Cd i Cu dok Pb i Hg u kompeticiji s Cd. Ovisno o metalu s kojim su stupili u asocijaciju, nastaju kompleksi niske molekularne (LMW) ili kompleksi visoke molekularne mase (HMW). Znatno povećanje u njihovoj molekularnoj masi uzrokovano je prisutnošću S^{2-} iona (Prasad i Strzalka 2002). Takvi kompleksi (najčešće LMW) dopijevaju preko prijenosnika ovisnog o magneziju i ATP-u, u vakuolu gdje se dalje metaboliziraju i sudjeluju u procesu biomineralizacije (Buchanan i sur. 2002).

Prisustvo teških metala djeluje na dodatnu sintezu i povećanje enzimске aktivnosti PCS u odnosu na njezinu konstitutivnu ekspresiju (Xiang i sur. 2001). Metali imaju različite sposobnosti indukcije PCS (Prasad i Strzalka 2002) a stimulacija PCS je metalno specifična. Pri jednakoj vanjskoj koncentraciji teških metala, metali s većim afinitetom za tiolnu skupinu su bolji stimulatori od metala s afinitetom za karboksilnu skupinu (Brunold i sur. 1996). Autori imaju različita stajališta o mehanizmu indukcije PCS metalima. Jedni smatraju kako je za indukciju kadmijem bitno stvaranje GSH-Cd kompleksa. Ti se kompleksi vežu za aktivni centar PCS dok se drugi metali vežu za različite produkte PCS reakcije i onda djeluju na PCS. Drugi autori smatraju da metali induciraju PCS isključivo u slobodnom obliku ili drugačijim kompleksima. Pod utjecajem stresa dolazi do potrošnje citosolnog GSH za sintezu fitohelatina. Padom količine GSH induciraju se γ -ECS i GS što rezultira intenzivnom produkcijom GSH. Prisustvo teških metala na taj način indirektno djeluje na regulaciju stope sinteze prekursora GSH. Zbog toga su stopa asimilacije reduciranog sumpora, odgovarajuća opskrba cisteinom i količina GSH kritični i limitirajući faktori sinteze PC i stjecanja PC uvjetovane otpornosti na teške metale (Prasad i Strzalka 2002).

4.3. Konjugacija

U biljnim i životinjskim stanicama detoksikacija štetnih tvari je vrlo slična i može se svesti na četiri glavna koraka - aktivacija, konjugacija, eliminacija i transformacija/degradacija. Prethodno aktivirana, štetna tvar se konjugira kovalentnim vezanjem na hidrofilnu molekulu. Uklanjanje stvorenog konjugata iz citosola u druge unutarstanične odjeljke ili izvanstanične prostore vrši se

pomoću prijenosnika. Konjugat se transformira u neštetni oblik ili potpuno degradira. U biljkama se štetni spojevi najčešće upućuju prema vakuoli (Bartholomew i sur. 2002).

Biljke su u mogućnosti detoksicirati ili inaktivirati mnoge spojeve - ksenobiotike kao što su razni herbicidi, endogeno nastale toksine, hormone, široki spektar agrokemikalija... formiranjem konjugata GSH (Buchanan i sur. 2002). Enzim koji katalizira konjugaciju GSH s različitim elektrofilima je GST. Prisutna je u biljkama, životinjama, gljivama i nekim bakterijama (Sanderman 1994). Vrlo je raznolika i specifična u višim biljkama te se ubraja u veliku i heterogenu skupinu proteina. Zajednički im je mehanizam djelovanja preko nukleofilnog napada sumporovog atoma GSH na elektrofilni centar njihovih supstrata (Noctor i sur. 2002, DeRidder i Goldsbrough 2006). Autori smatraju kako je ovakav polarni reakcijski produkt na neki način označen i preodređen za sekreciju u apoplast ili vakuolu gdje se hidrolizira do konjugata cisteina. Prijenos se ostvaruje preko GSH prijenosnika ABC tipa (Marrs 1996). GST detoksiciraju ksenobiotike mehanizmom koji sadrži tri koraka za razliku od općenitog s četiri koraka (Davies i Caseley 1999). Također dolazi do povećanja razine GSH i indukcije *multidrug resistance* proteina (MRP) koji djeluju kao prijenosnici GSH (Martinoia i sur. 2002). Pored konjugacije sa štetnim spojevima, u uvjetima *in vitro* dokazana je i konjugacija GSH s auksinom. Iako sam GSH-IAA konjugat još nije identificiran, moguća uloga je modulacija hormonske aktivnosti ili nastanak spremišnog oblika hormona (Bilang i sur. 1993).

GST su osim stresno-specifične i općenite indukcije oksidacijskim stresom, inducirane i *safenerima* (Dixon i sur. 2002). To su sintetičke molekule koje induciraju otpornost na herbicide preko povećanja ekspresije GST u žitarica. Otpornost pojedinih jednosupnica na herbicide povezana je s ekspresijom GST u listovima (Hatton i sur. 1999), konstitutivnom ekspresijom u korijenu i dominantno u izdanku (DeRidder i Goldsbrough 2006) ili ekspresijom u koleoptili (Zhang i Riechers 2004). U dvosupnica je preko istog tretmana safenerima, ekspresija GST lokalizirana isključivo u korijenu i u nedovoljno visokim koncentracijama da bi osigurala otpornost na herbicide (DeRidder i Goldsbrough 2006).

4.4. Krioprotekcija

Uloga GSH kao krioprotektanta potječe od činjenice kako otpornost na smrzavanje zahtijeva povećanje učinkovitosti antioksidacijskog sustava. Pri niskim temperaturama dolazi do ograničenje metabolizma stanica listova što uzrokuje probleme u funkcionalnosti i regulaciji fotosinteze. Povećava se stopa prijenosa elektrona na molekule kisika i uvjetuje veća produkcija ROS. Postoji hipoteza prema kojoj sposobnost GSH u sprječavanju formacije ireverzibilnih sumpornih veza i očuvanju proteina u aktivnom stanju treba doprinijeti toleranciji na smrzavanje (Inzé i Montagu 2002). Hipoteza može biti potvrđena činjenicom kako su cikličke interkonverzije ditiola i disulfida, pogotovo na niskim temperaturama, ključne za staničnu obranu (Foyer i sur. 1991). Novija istraživanja su dokazala korelaciju razine lisnog GSH s otpornosti na smrzavanje u kukuruza (Kocsy i sur. 2001) preko jake indukcije transkriptata γ -ECS (Gomez i sur. 2004). Tretiranje s herbicidima, safenerima i drugim tvarima koje dovode do povećanje razine GSH, također mogu dovesti do uspješne aklimatizacije i otpornosti na smrzavanje u kukuruza (Kocsy i sur. 2001).

4.5. Asimilacija sumpora

Osim što GSH integrira i ovisi o asimilacijskom putu sumpora u biljkama, direktno sudjeluje u njemu i ima određeni stupanj kontrole. Kako bi sulfat mogao ući u asimilacijski put, aktivira se preko enzima ATP sulfurilaze u adenzin-5'-fosfosulfat (APS). Od APS postoje 2 moguća puta koji opisuju ulazak sulfata u redukcijski put. Jedan opisuje kako se sulfatna skupina s APS prenosi na reduciranu tiolnu komponentu, odnosno GSH, u reakciji kataliziranoj APS sulfotransferazom (Buchanan i sur. 2002). Drugi i noviji put upućuje na APS reduktazu koja za supstrat uzima APS i GSH kao izvor elektrona za redukciju. Osim općenite uloge reduktanta djeluje i kao signalna molekula. Prikazuje stanje sumpora u korijenu te pokreće promjene u njegovoj genskoj ekspresiji što dovodi do promjena u samom putu asimilacije sumpora kao dijela vlastitog metabolizma (Kopriva i Rennenberg 2004).

4.6. Signalizacija

Tiolni metabolizam dokazan je u inficiranom i meristemskom tkivu nodula različitih mahunarki kao što su soja (*Glycine max*) i grah (*Phaseolus vulgaris* i *Vigna radiata*). Iako je u njihovim listovima izrazito zastupljen hGSH umjesto redovitog GSH (Matamoros i sur. 1999), velike koncentracije oba tiolna tripeptida lokalizirane su u tkivima nodula (Escuredo i sur. 1996). Radi se o većim koncentracijama nego u listovima i velikoj aktivnosti enzima sinteze navedenih spojeva. Obrazac rasprostranjenosti pojedinog tripeptida, utvrđen je pronalaskom GSH i hGSH sintetaza u nodulima dok se u listovima nalazi samo hGSHS. Sve prethodno navedeno i postojanje glutation-askorbatnog ciklusa u nodulima, daje naslutiti kako su oba tiola uključena u fiksaciju dušika i obranu procesa od utjecaja ROS (Dalton i sur. 1986, Groten i sur. 2005).

Osim što djeluje u sklopu obrambenog sustava zajedno s nekoliko spojeva kao što su reaktivni oblici dušika (RNS), ROS, tioli male molekularne mase, GSH i hGSH su bitni za pravilnu signalizaciju i uspješnu uspostavu simbiotskog odnosa između rizobija (*Rhizobium*) i mahunarki. Mora se uspostaviti kompatibilna interakcija kako bi došlo do razvoja novih korijenskih struktura za fiksaciju atmosferskog dušika u uvjetima manjka dušika (Pauly i sur. 2006). Sintaza GSH je bitna za pravilni razvoj korijenskih nodula (Harrison i sur. 2005) jer je pri uspostavljanju simbioze između *Medicago trunculata* i *Sinorhizobium meliloti*, uslijed pomanjkanja GSH bila inhibirana formacija korijenskih nodula (Frendo i sur. 2005). Tiolni tripeptidi su vjerojatno zastupljeni u velikim koncentracijama u tkivima nodula zbog toga što je jedan dio mikrosimbiontskog podrijetla a ne samo biljnog (Pauly i sur. 2006).

Napad patogena dovodi do povećanja unutarstanične koncentracije GSH i GSH-ovisne indukcije fenilalanin-amonijske lijaze (PAL) i halkon sintaze (CHS). Samo povećanje unutarstanične koncentracije GSH nije regulator odgovora na napad patogena i primarni signal za povećanje produkcije fitoaleksina u borbi protiv njih (Edwards i sur. 1991). Unatoč tome, utjecaj napada patogena je specifičan za GSH i ne djeluje na ostale antioksidanse male molekularne mase. Dolazi do jake indukcije i brze akumulacije. Povećanje razine GSH ne događa se samo u stanicama koje su direktno napadnute nego i u okolnim stanicama. Tamo predstavlja spremnu obranu na jaku štetu uzrokovanu ROS i promjenom redoks stanja (Noctor i sur. 2002). Iako primarni signal predstavlja prisustvo ROS (pogotovo peroksida) a ne GSH, zanimljivo je kako

GSH može oponašati taj signal. U ovom primjeru oksidans i antioksidans zapravo prenose isti signal (May i sur. 1998a). Kako povećanje GSH može biti jedan od načina prenošenja signala peroksida, moguće je da njegovo povećanje u uvjetima kada peroksid nije prisutan, može biti protumačeno kao sličan signal (Shi i sur. 1994).

Već se kod uloge GSH u stvaranju meristemskog tkiva nodula i korijenskog sustava u simbiotskom odnosu može naslutiti kako GSH ima određeni utjecaj na stanični ciklus (Noctor i sur. 2002). U vrsta roda *Arabidopsis* dokazano je kako razina GSH odlučuje hoće li stanica prijeći iz G1 u S fazu staničnog ciklusa odnosno započeti proces diferencijacije ili ući u mirovanje ili čak smrt (May i sur. 1998a). Kako je razina GSH bitna za prolazak stanice kroz S fazu staničnog ciklusa (Poot i sur. 1995), snižavanjem koncentracije GSH bi se stanica mogla zadržati u G1 fazi (Russo i sur. 1995). Osim važnosti za pojedine faze staničnog ciklusa, postoji korelacija razine GSH s proliferacijskim kapacitetom stanica apikalnog meristema vrsta roda *Arabidopsis*. Već je rečeno kako redoks parovi mogu djelovati kao signalna veza između okoliša i biljke. Na taj način dovode do morfološke adaptacije preko promjene obrasca stanične diobe u primarnom korijenovom apikalnom meristemu. Postoji veza između dužine stanice trihoblasta (korijenove dlačice) i unutarstanične redoks homeostaze. Preko takvog redoks mehanizma korijen može smanjiti bočni rast (broj korjenovih dlačica) i nastaviti „istraživati“ tlo u oksidirajućim nepovoljnim uvjetima ili, ukoliko je okolina pogodna, pojačati bočni rast i povećati broj korjenovih dlačica (May i sur. 1998a).

Redoks par GSH/GSSG pored gena vlastitih sintetaza regulira ekspresiju niza gena u prokariota i eukariota. Kako su nezamjenjivi s ostalim redoks parovima radi se o specifičnoj regulaciji (Noctor i sur. 2002). Za vrijeme fotoinhibicije GSH djeluje na signalni put, iz fotosistema 2 (PSII) u jezgru, za aktivaciju citosolne obrane od oksidacijskog stresa (May i sur. 1998a). Djeluje i kao dodatni signal tijekom svjetlosnog stresa - kao veza između svjetla i zalihe D1 proteina. D1 protein se oštećuje uslijed raspada PSII što dovodi do promjene redoks potencijala u kloroplastu (Link i sur. 1997). Pored djelovanja na kloroplastne proteine djeluje i na izrezivanje introna kloroplastne RNA preko regulacije aktivnosti određenih endoribonukleaza (Liere i Link 1997).

Osim redoks para i GSH, GSSG posjeduje također određene karakteristike signala. Djeluje na stvaranje miješanih disulfida preko spontane oksidacije sulfhidrilnih skupina, poznato kao proces tiolacije (od engl. *thiolation*, tj. uvođenje tiolne skupine u organski spoj). Formacija reverzibilnih disulfidnih veza važan je mehanizam moduliranja aktivnosti proteina i bitan početni signalizacijski događaj. Reverzibilna tiolacija štiti tiolne skupine ključnih proteina od ireverzibilne inaktivacije tijekom oksidacijskog stresa. Postoji vrlo malo proteina koji se mogu reverzibilno tiolirati. U tu skupinu spadaju neki ključni sjemeni proteini koji se tioliraju u kasnijim razvojnim stupnjevima sjemenke a detioliraju tijekom imbibicije (Butt i Ohrlogge 1991). Suhe sjemenke iz toga razloga imaju više glutaciona od drugih tkiva a većina zalihe nalazi se u obliku GSSG. Tiolacija proteina u suhoj sjemenci sveukupno ima tri razloga - označavanje proteina za degradaciju preko oksidacije ključnih ogranaka cisteina, zaštita proteina i GSH od degradacije procesom tiolacije i provođenje signala koji uvjetuju stanje mirovanja (Noctor i sur. 2002).

5. UPOTREBA I PRIMJENA

Zbog raznih funkcija i učinaka GSH, mogu se konstruirati transgene biljke koje će preko njegove povećane koncentracije dobiti bolju zaštitu (Tausz i sur. 2004). Pri tome treba imati na umu da manipulacija samo jedne komponente GSH antioksidacijskog sustava neće nužno povećati otpornost biljke nego ju učiniti još osjetljivijom (Creissen i sur. 1999). Poboljšanje zaštite može se postići povećanjem konstitutivne razine svih komponenti i unošenjem gena enzima biosinteze GSH (May i sur. 1998b). Obogaćenje GSH neće samo utjecati na fiziološke procese u listovima nego će biti od koristi cijeloj biljci. Inhibicija povratnom spregom γ -ECS od strane GSH ili NADPH-ovisna inhibicija GR u kloroplastnoj stromi može se nadjačati povećanom ekspresijom navedenih enzima. Zanimljivo je da sinteza GSH povećana na ovaj način neće ograničiti dodatnu indukciju sinteze stresnim podražajima.

S obzirom na prethodni model, GSH se iskorištava na razne načine u bioindustrijskoj proizvodnji. Uglavnom prevladava dvojako zanimanje za GSH kao pojačivač okusa (stupa u interakciju s prekursorima molekula i njima samima koje su odgovorne za određeni okus hrane) i antikancerogenog djelovanja hrane te jednostavnog tripeptidnog modela za biotehnološku produkciju heterolognih tripeptida u kulturi biljnog tkiva. Biljke obogaćene GSH mogu predstavljati koristan izvor GSH za industrijske potrebe. Danas je moguće postići konstitutivnu i iznadprosječnu proizvodnju GSH, optimiziranjem uvjeta u kulturi tkiva iz transformiranih biljaka. Na taj način GSH dobiva još širu primjenu u postizanju otpornosti na gljivične infekcije, poboljšanju tolerancije stresa biljnih vrsta stvorenih mikropropagacijom, transformiranom drveću (topola) za ekodetoksikaciju preko zarobljivanja ksenobiotičkog zagađivača, sintezi fitohelatina za biološko obnavljanje siromašnog tla (bioremedijacija) uklanjanjem teških metala... (Noctor i sur. 1998).

6. LITERATURA

- Bartholomew DM, Van Dyk DE, Lau S-MC, O'Keefe DP, Rea PA, Viitanen PV (2002) Alternate energy-dependant pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. *Plant Physiology* **130**, 1562-1572.
- Bilang J, Macdonald H, King PJ, Sturm A (1993) A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione S-transferase. *Plant Physiology* **102**, 29-34.
- Brunold C, Rügsegger A, Brändle R (1996) Stress bei Pflanzen: Ökologie, Physiologie, Biochemie, Molekularbiologie. Verlag Paul Haupt, Bern-Stuttgart-Wien.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2002) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Wiley, John & Sons, Incorporated.
- Butt AD, Ohlrogge JB (1991) Acyl carrier protein is conjugated to glutathione in spinach seed. *Plant Physiology* **96**, 937-942.
- Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H, Pastori G, Wellburn F, Baker N, Wellburn A, Mullineaux P (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *The Plant Cell* **11**, 1277-1291.
- Dalton DA, Russell SA, Hanus FJ, Pascoe GA, Evans HJ (1986) Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Plant Physiology* **96**, 3811-3815.
- Davies J, Caseley JC (1999) Herbicide safeners: a review. *Pesticide Science*. **55**, 1043-1058.
- DeRidder BP, Goldsbrough PB (2006) Organ-specific expression of glutathione S-transferases and the efficacy of herbicide safeners in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **140**, 167-175.
- Dhindsa RS (1991) Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant Physiology* **95**, 648-651.
- Dixon DP, Lanthorn A, Edwards R (2002) Plant glutathione transferases. *Genome biology* **3**, 1-10.
- Edwards R, Blount JW, Dixon RA (1991) Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures. *Planta* **184**, 403-409.

- Elstner EF, Osswald W (1994) Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh B Biology* **102B**, 131-154.
- Escuredo PR, Minchin FR, Gogorcena Y, Iturbe-Ormaetxe I, Klucas RV, Becana M (1996) Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. *Plant Physiology* **110**, 1187-1195.
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* **100**, 241-254.
- Foyer CH, Lelandais M, Galap C, Kuner KJ (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiology* **97**, 863-872.
- Frendo P, Harrison J, Norman C, Hernandez Jimenez MJ, Van de Syde G, Gilabert A, Puppo A (2005) Glutathione and homogluthione play a critical role in nodulation process of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 254-259.
- Frendo P, Gallesi D, Turnbull R, Van de Syde G, Herouart D, Puppo A (1999) Localization of glutathione and homogluthione in *Medicago truncatula* is correlated to a differential expression of genes involved in their synthesis. *Plant Journal* **17**, 215-219.
- Gomez LD, Vanacker H, Buchner P, Noctor G, Foyer CH (2004) Intracellular distribution of glutathione synthesis in maize leaves and its response to short-term chilling. *Plant Physiology* **134**, 1662-1671.
- Groten K, Vanacker H, Dutilleul C, Bastian F, Bernard S, Carzaniga R, Foyer CH (2005) The roles of redox processes in pea nodule development and senescence. *Plant, Cell and Environment* **28**, 1293-1304.
- Harrison J, Jamet A, Muglia CI, Van de Syde G, Aguilar OM, Puppo A, Frendo P (2005) Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **187**, 168-174.
- Hatton PJ, Cummins I, Cole DJ, Edwards R (1999) Glutathione transferases involved in herbicide detoxification in the leaves of *Setaria faberi* (giant foxtail). *Plant Physiology* **105**, 9-16.
- Herscbach C, Rennenberg H (1994) Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulfate and sulfate transport in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* **45**, 1069-1076.

- Ho CL, Saito K (2001) Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* **20**, 243-259.
- Inzé D, Montagu MV (2002) *Oxidative Stress in Plants*. Taylor & Francis, London and New York.
- Jamai A, Tommasini R, Martinoia E, Delrot S (1996) Characterisation of glutathione uptake in broad bean leaf protoplasts. *Plant Physiology* **11**, 1145-1152.
- Jiang M, Zhang J (2001) Effects of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1265-1273.
- Jiménez A, Hernandez JA, Pastori G, del Rio LA, Sevilla F (1998) Role of ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisome in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology* **118**, 1327-1335.
- Kar M, Feierabend J (1984) Metabolism of activated oxygen in detached wheat and rye leaves and its relevance to the initiation of senescence. *Biochemical Society Transactions* **160**, 385-391.
- Klapheck S (1988) Homoglutathione: isolation, quantification, and occurrence in legumes. *Plant Physiology* **74**, 727-732.
- Klapheck S, Schlunz S, Bergmann L (1995) Synthesis of phytochelatins and homophytochelatins in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* **107**, 2515-2521.
- Kocsy G, Galiba G, Brunold C (2001) Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Plant Physiology* **113**, 158-164.
- Kopriva S, Rennenberg H (2004) Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany* **55**, 404.
- Koprivova A, Suter M, Op den Camp R, Brunold C, Kopriva S (2000) Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**, 737-746.
- Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 141-165.
- Liere K, Link G (1997) Chloroplast endoribonuclease p54 involved in RNA 3'-end processing is regulated by phosphorylation and redox state. *Nucleic Acids Research* **25**, 2403-2408.

- Link G, Tiller K, Baginsky S (1997) Glutathione, a regulator of chloroplast transcription. U: Hatzios KK, Urednik. *Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants*. NATO ASI series. Kluwer Academic Publishers.
- Marrs KA (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 141-165.
- Martinoia E, Klein M, Geisler M, Bovet L, Forestier C, Kolukisaoglu U, Müller-Röber B, Schulz B (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters: more than just detoxifiers. *Planta* **214**, 345-355.
- Masi A, Ghisi R, Ferretti M (2002) Measuring low-molecular-weight thiols by detecting the fluorescence of their SBD-derivates: application to studies of diurnal and UV-B induced changes in *Zea mays* L. *Journal of Plant Physiology* **159**, 499-507.
- Matamoros MA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Becana M (1999) Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiology* **121**, 879-888.
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inzé D (1998a) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* **49**, 649-667.
- May MJ, Vernoux T, Sanchez-Fernandez R, Van Montagu M, Inzé D (1998b) Evidence for posttranscriptional activation of γ -glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Plant Biology* **95**, 12049-12054.
- May MJ, Leaver CJ (1994) *Arabidopsis thaliana* γ -glutamylcysteine synthetase is structurally unrelated to mammalian, yeast and *E. coli* homologs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**, 10059-10063.
- Meyer AJ, Fricker MD (2002) Control of demand-driven biosynthesis of glutathione in green *Arabidopsis* suspension culture cells. *Plant Physiology* **130**, 1927-1937.
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany* **53**, 372.
- Noctor G, Arisi A-CM, Jouanin L, Kunert K-J, Rennenberg H, Foyer CH (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* **49**, 623-647.

- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249-279.
- Pauly N, Pucciariello C, Mandon K, Innocenti G, Jamet A, Baudouin E, Hérouart D, Frendo P, Puppo A (2006) Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1769-1776.
- Polle A, Rennenberg H (1992) Field studies on Norway spruce trees at high altitudes. II. Defence systems against oxidative stress in needles. *New Phytologist* **121**, 635-642.
- Poot M, Teubert H, Rabinovitch PS, Kavanagh TJ (1995) De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *Journal of Cell Physiology* **163**, 555-560.
- Prasad MNV, Strzalka K (2002) Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 37-58.
- Rennenberg H., Brunold C., 1994. Significance of glutathione metabolism in plants under stress. *Press Botany* **55**, 142-153.
- Rüegsegger A, Brunold C (1993) Localization of γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activity on maize seedlings. *Plant Physiology* **101**, 561-566.
- Russo T, Zambrano N, Esposito F, Ammendola R, Cimino F, Fiscella M, Jackman J, O'Connor M, Anderson CW, Apella E (1995) A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 29386-29391.
- Sandermann H (1994) Higher-plant metabolism of xenobiotics: the green liver concept. *Pharmacogenetics* **4**, 225-241.
- Schmidt A, Kunert KJ (1986) Lipid peroxidation in higher plants: The role of glutathione reductase. *Plant Physiology* **82**, 700-702.
- Shao H-B, Chu L-Y, Kang C-M (2008) Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences* **4**, 8-14.
- Shi MM; Kugelman A, Iwamoto T, Tian L, Forman HJ (1994) Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces γ -glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 26512-26517.

- Smith IK (1985) Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiology* **79**, 1044-1047.
- Tausz M, Šircelj H, Grill D (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany* **55**, 404.
- Tausz M, Gullner G, Kömives T, Grill D (2003) Role of thiols in plant adaptation to environmental stress. U: Abrol Yp, Ahmad A, urednici. *Sulphur in plants*. Dordrecht: Kluwer, 221-244.
- Thompson JE, Ledge RL, Barber RF (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist* **105**, 317-344.
- Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH (1998) Pathogen-induced changes in the antioxidant status in the apoplast of barley leaves. *Plant Physiology* (in press).
- Vranova E, Inzé D, Van Breusegen F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1227-1236.
- Winkler BS (1992) Unequal evidence in support of the non-enzymatic redox coupling between glutathione/glutathione disulphide and ascorbic acid/dehydroascorbic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* **117**, 287-290.
- Xiang C, Werner BL, Christensen EM, Oliver DJ (2001) The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiology* **126**, 564-547.
- Xiang C, Oliver DJ (1998) Glutathione metabolism genes coordinately to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**, 1539-1550.
- Zhang Q, Riechers DE (2004) Proteomic characterization of herbicide safener-induced proteins in the coleoptile of *Triticum tauschii* seedlings. *Proteomics* **4**, 517-523.
- www.wikipedia.org

7. SAŽETAK

Tiolni tripeptid glutation ima važnu ulogu u antioksidacijskom sustavu obrane biljne stanice kao i mnoge druge uloge u staničnoj zaštiti, metabolizmu sumpora i povećanju otpornosti na određeni abiotički stres. Djeluje kao redoks pufer koji sudjeluje u prenošenju staničnih informacija i prisutan je u gotovo svim organizmima. Preko redoks signalizacije povezuje i integrira različite stanične odjeljke i biljna tkiva. Funkcije koje obavlja ovise o koncentraciji i/ili redoks stanju zaliha glutationa u listovima. Promjena tih svojstava djeluje kao signal koji pokreće adaptacijske odgovore biljaka na vanjske uvjete. Ukupna razina glutationa određena je kompleksnom interakcijom između biosinteze, trošenja, degradacije, oksidacije/redukcije i prijenosa. Tijekom aerobnog života parcijalnom redukcijom kisika nastaju reaktivni oblici kisika. Dolazi do pojave oksidacijskog stresa a glutation kao antioksidans može zaštititi stanice viših biljaka od oksidacijskih oštećenja. Uklanja različite reaktivne oblike kisika, enzimski kataliziranim reakcijama ili drugim načinima. Direktno i indirektno preko fitohelatina, sudjeluje u uklanjanju teških metala iz stanica. Stupa u interakciju sa širokim spektrom štetnih endogenih i egzogenih spojeva prilikom čega ih inaktivira. Kao krioprotektant osigurava određeni stupanj otpornosti na smrzavanje i aktivno sudjeluje u asimilaciji sumpora. Djeluje na rast i razvoj viših biljaka, modificirajući mitozu i regulirajući gensku ekspresiju povezanu s određenim stresnim odgovorima.

8. SUMMARY

The tripeptide thiol glutathione plays a pivotal role in plant cell antioxidant defense system as well as numerous other roles in cellular defense, sulfur metabolism and exerting abiotic stress tolerance. Present in almost all organisms, acts as a redox buffer which partakes in information transport of cells. Glutathione is an important redox signaling component which interacts and integrates various cellular compartments and plant tissues. All functions depend or impact on concentration and/or redox state of leaf glutathione pools. Changes in these parameters act as signals that trigger adaptive responses in plants to environmental conditions. Total glutathione levels are defined by a complex interplay between biosynthesis, utilization, degradation, oxidation/reduction and transport. As a consequence of aerobic life, reactive oxygen species are formed by the partial reduction of oxygen. Oxidative stress occurs and glutathione as an antioxidant, can protect higher plant cells from oxidative damage. The remediation of reactive oxygen species is attained through an enzymatic and non-enzymatic pathway. It engages in the direct or indirect, through phytochelatin, elimination of heavy metals in cells, yields a certain stage of chilling tolerance as a crioprotectant and actively participates in sulfur assimilation. Glutathione influences higher plant growth and development by modifying mitosis and regulating genetic expression associated with certain stress responses.