

# 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://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:688966>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-05**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**RAZNOLIKA ULOGA GLUTATIONA U BILJAKA**

**THE DIVERSE ROLE OF GLUTATHIONE IN PLANTS**

**SEMINARSKI RAD**

Dino Joli

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate study of molecular biology)

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

Zagreb, 2009.

## **Popis kratica**

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

APX – askorbat peroksidza (ascorbate peroxidase)

ATP – adenozin-trifosfat (adenosine triphosphate)

CAM – crassulacean acid metabolism

CHS – halkon 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)

-EC – -glutamilcistein

-ECS – -glutamilcistein sintetaza

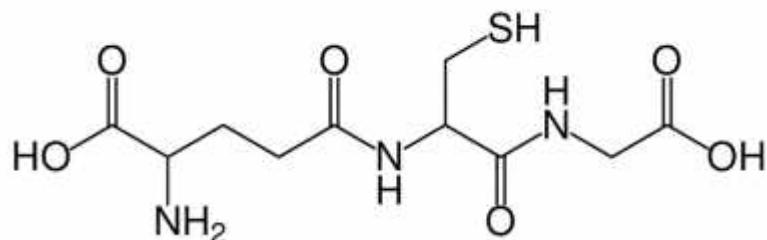
## **Sadržaj**

1.	UVOD .....	1
2.	BIOSINTEZA, REGULACIJA, RASPODJELA IZME U STANI NIH 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

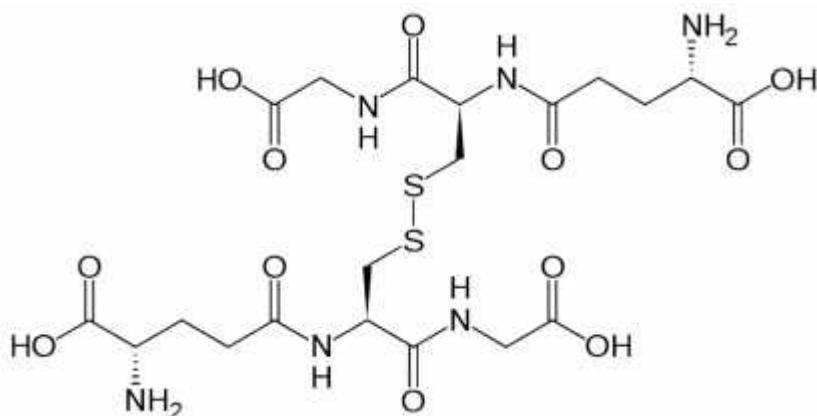
Tolerantnost biljke na odre eni okolišni stres jedan je od glavnih parametara koji odre uju uvjete u kojima biljka može rasti. Faktori koji utje u na toleranciju odre enog stresa direktno utje u na rasprostranjenost biljne vrste u prirodi. Jedan od faktora koji igra glavnu ulogu u mehanizmu smanjenja potencijalne stani ne disfunkcije nastale zbog promjene redoks stanja uslijed stresa je glutation (GSH) (Inzé i Montagu 2002). Sastavni je dio stanica razli itih organizama - bakterija, gljiva, biljaka, životinja... (Prasad i Strzalka 2002) i kao takav ostao o uvan od pojave aerobnog života (May i sur. 1998a). Tijekom aerobnog metabolizma dolazi do pojave razli itih štetnih oksidansa odnosno pojave oksidacijskog stresa. Kako bi se suzbile štete nastale na taj na in i organizmi mogli preživjeti u novim uvjetima, došlo je do razvoja antioksidacijskog sustava kojem pripada i glutation. Javlja se kao odgovor na brojne okolišne uvjete i djeluje na pove anje aktivnosti odre enih metaboli kih puteva kako bi se sanirale posljedice stresa (Meyer i Fricker 2002). Zbog toga predstavlja direktnu vezu izme u okolišnog stresa i nekoliko klju nih 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 ( -glutamilcisteinilglicin) otkrivena je 1935. Radi se o tripeptidu koji je izgra en od tri osnovne aminokiseline - glutamat, cistein i glicin (slika 1). Stabilnost potje e od neobi ne -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 reducirane sumpore u biljkama (Tausz i sur. 2003). Biljne stanice sadrže velike koli ine ne-proteinskih tiola koji su važni antioksidansi i uklju eni 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 stani noj obrani i uvanju tiolnih skupina proteina u reduciranoj obliku. Na taj na in se održava njihova biološka aktivnost (Prasad i Strzalka 2002) odnosno proteini su zašti eni od denaturacije uzrokovane oksidacijom tiolnih skupina uslijed stresa (Noctor i sur. 2002).



**Slika 1.** Strukturna formula reduciranog oblika glutationa.

Prema [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

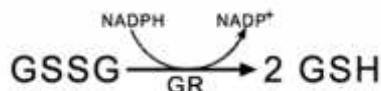


**Slika 2.** Strukturna formula oksidiranog oblika glutationa.

Prema [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

GSH zbog redukcijskog potencijala od -0,23V djeluje kao u inkovit elektron akceptor (Xiang i sur. 2001) i lako se oksidira, od strane slobodnih radikala i drugih oksidansa, u glutation disulfid (GSSG) (Noctor i sur. 1998) (slika 2). Stabilne proteinske disulfidne veze su rijetke, osim u miruju em tkivu sjemenki. Biljke održavaju stani ne tiolne skupine u reduciranim oblicima zbog ega GSH djeluje kao dobar tiolni pufer a sam redoks par kao signal za prenošenje informacija. Stani ni omjer GSH/GSSG održava se preko glutation reduktaze (GR). To je homodimerni flavoprotein (Noctor i sur. 2002) ija 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). U inkovitost kojom se GSSG reducira natrag u GSH (npr. prilikom inaktivacije peroksida) pridonosi njegovoj središnjoj ulozi u antioksidacijskoj obrani (May i sur. 1998a). Glutation u reduciranim oblicima 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.

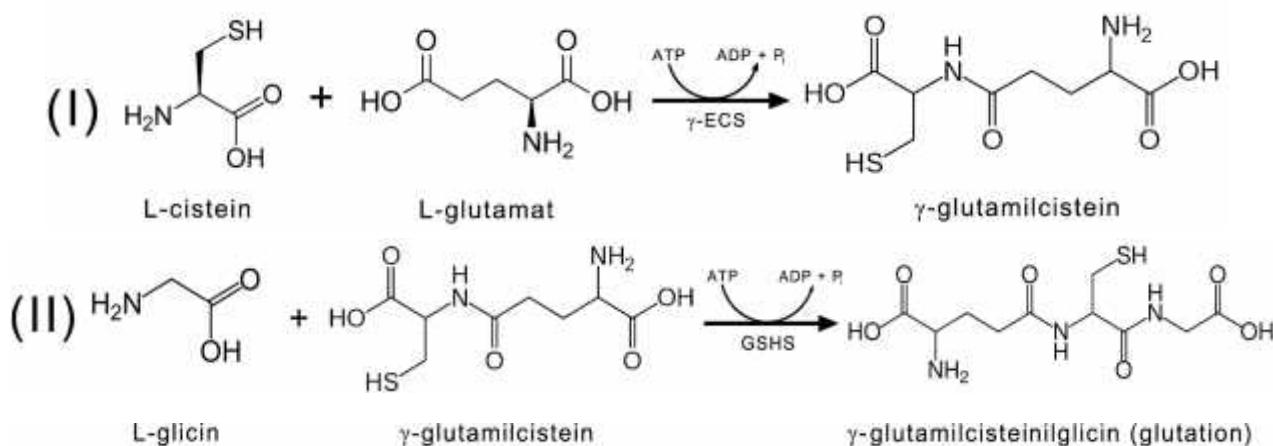
Zaliha glutationa u biljnoj stanici ima dva svojstva - koncentracija i redoks stanje. Koncentracija se mijenja sezonski i dnevno (Noctor i sur. 2002) te je određena nutricionistima i okolišnim imbenicima (Prasad i Strzalka 2002). Količine akumuliranog GSH ovise i o biljnoj vrsti, starosti listova, bazalnoj 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 stanice redoks ravnoteže. Redoks stanje u listovima je konstantno i tek pod vrlo jakim stresom zaliha glutationa padne ispod 90% reduciranih oblika. Iako koncentracija i redoks stanje nisu nužno ovisni jedno o drugome, promjene u redoks stanju mogu biti signal za početak sinteze i ukupne koncentracije GSH (Noctor i sur. 2002).

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

## 2. BIOSINTEZA, REGULACIJA, RASPODJELA IZME U STANI NIH ODJELJAKA, STANICA, BILJNIH ORGANA TE KATABOLIZAM

Put sinteze glutationa 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 kompartimentima. 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 -  $\gamma$ -glutamilcistein sintetaza (-ECS) i glutation sintetaza (GSHS) (slika 4).



Slika 4. Reakcije sinteze glutationa prikazane strukturnim formulama

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

-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 -ECS pokazuju 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 kompartimentima 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 staninskih 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 staninskih GSH odredena je složenom komunikacijom između nekoliko metaboličkih faktora (dostupnost cisteina, aktivnosti sintetskih enzima, degradacija, oksidacija, helacija...) isprepletenih sa okolišnim imbenicima (fotoperiod, ksenobiotici, temperatura...) (Inzé i Montagu 2002). Od svih navedenih faktora, u biljaka je sinteza GSH prvenstveno kontrolirana preko enzimske aktivnosti  $\gamma$ -ECS i dostupnosti cisteina (Noctor i sur. 2002).

$\gamma$ -ECS kinetički ograničava i određuje brzinu sinteze preko kolичine prisutnog  $\gamma$ -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 u supstrata (Buchanan i sur. 2002). *In vitro* dokazana inhibicija sinteze GSH, preko nekovalentnog vezanja GSH za  $\gamma$ -ECS (May i sur. 1998a), ne igra veliku ulogu *in vivo*. Unatoč inhibiciji povratnom spregom, *in vivo* sinteza GSH se može nastaviti ili u određenim slučajevima kada GSH premašuje konstantu inhibicije  $\gamma$ -ECS, ali i dodatno stimulirati (Inzé i Montagu 2002). U tim slučajevima je inhibicija nadvanačana ili ukinuta (Noctor i sur. 1998). Kako ne bi došlo do nagomilavanja GSH, favorizirajuće se iznošenje dodatnog GSH iz odredenog staniska kompartimenta. *In vivo* aktivnost  $\gamma$ -ECS regulirana je na nekoliko razina, između ostalog i posttranslacijski tako da je preko razine GSH (Noctor i sur. 2002). Aktivnost GSRS u većini slučajeva ne limitira sintezu GSH ali je dokazano kako ipak ima mali regulatorni utjecaj nakon što se savlada limitirajući korak  $\gamma$ -ECS (Noctor i sur. 1998).

Pored inhibicije enzima -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). U inak nije jednosmjeran; 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 -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 -EC/GSH. U mraku je količina GSH vrlo mala dok je količina -EC povećana. Uslijed osvjetljavanja dolazi do sniženja količine -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 -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 -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

različitim vrstama stresa i aktivaciju odgovarajućeg odgovora na specifični podražaj (May i sur. 1998b). Ovakav model diskriminacije između različitih stresnih podražaja je moguće zbog zamjene modulacije post-transkripcijske i post-translacijske aktivnosti -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 uglavnog 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 u biljaka koje koriste C<sub>3</sub> i C<sub>4</sub> fiksaciju ugljika. Kod listova C<sub>3</sub> 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 C<sub>4</sub> biljaka kao što je kukuruz, postoje međusobni ustani na raspodjelu 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 raspoloženi 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 isključiva 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 njih prijenosnih puteva daje prednost reduciranom obliku (Noctor i sur. 2002).

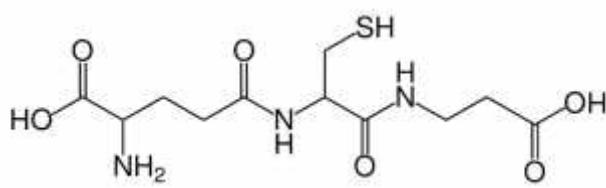
Unutarstani na koncentraciju GSH je različita od kompartimenta do kompartimenta i postoje prijenosi GSH između njih zbog ujednačenja njegove koncentracije (između citosola i kloroplasta). Pored razlika u koncentraciji postoje i razlike u redoks stanju koje su ključne za staničnu signalizaciju kloroplast-citosol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

Prijenos GSH preko ovojnica kloroplasta još nije u potpunosti istražen dok za prijenos u/iz vakuole preko tonoplasta postoji prijenosnik za konjugate glutationa. 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 glutation konjugate gdje se dalje metaboliziraju (Noctor i sur. 2002). Razvoj ovako specifičnog prijenosnika nastao je zbog inhibicijskog učinka kojeg konjugati glutationa imaju na GR, glutation-S-transferazu (GST) i prijenos GSH/GSSG preko plazmatske membrane te potrebe za brzim uklanjanjem iz citosola u druge stanice nekompartimente (Jamai i sur. 1996.).

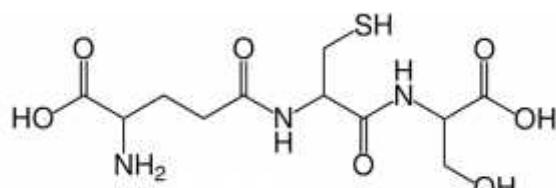
Metabolizam GSH pored sinteze i prijenosa uključuje i njegov katabolizam koji se ostvaruje preko tri puta – katabolički put GSH i GSSG te katabolički put glutation konjugata. Katabolički put GSSG se koristi za detoksifikaciju odnosno varanje u stanje homeostaze prije nastalog stresa. Razlog je povećanje 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 uinkovitije kataboliziranje do početnih supstrata za sintezu GSH. Katabolički put glutation konjugata odvija se u vakuoli i u većini slučajeva dolazi do odcjepljivanja konjugiranog GSH (Noctor i sur. 2002).

### 3. HOMOLOZI

Odreene biljne vrste umjesto GSH sintetiziraju homologne oblike. Vrste iz reda *Fabales* umjesto ili kao dodatak GSH u listovima, korijenu i sjemenkama sadrže tiolni tripeptidni homolog (Klapheck 1988) - homoglutation (hGSH) koji umjesto glicina sadrži -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 -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 lepirnja a (Frendo i sur. 1999).

## 4. ULOGA

Uloge GSH ovise o njegovoj koncentraciji i redoks stanju sveukupne zalihe glutationa 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 estomađava kao promjena u omjeru ili redoks stanju glutationa [GSH/GSH+GSSG] i akumulaciji GSSG. GSH kao antioksidans predstavlja informacijom bogati redoks puffer 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 dolaze 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 povoljnih 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 detoksifikaciju 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 prijenos 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, stani ni ciklus i njegov signalni sustav (stani na 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 opću poznatu koncepciju stresnog odgovora - početna faza popravljanja aklimatizacijskom fazom, uspostava nove ravnoteže ili degradacija sustava ukoliko dođe do neuspješne aklimatizacije (Brunold i sur. 1996). Pojedine faze se mogu prepoznati mjerjenjem 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**

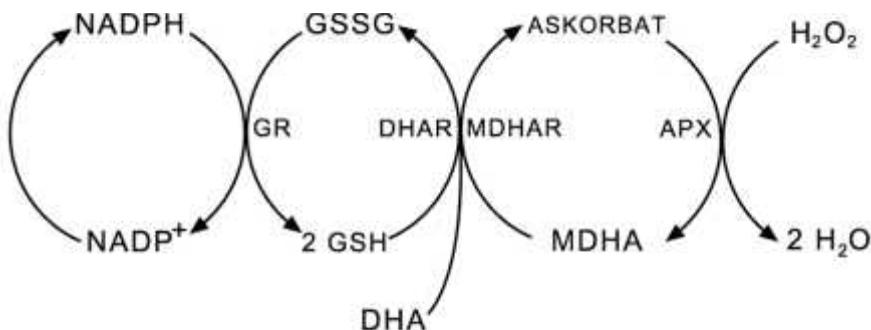
Kao posljedica aerobnog života više biljke parcijalnom redukcijom molekularnog kisika proizvode ROS od kojih su najzastupljeniji superoksidni radikal i vodikov peroksid. ROS nisu isključivo štetni jer njihovom eksplozivnom produkcijom na plazmatskoj membrani biljke provode signale o promjenama koje se 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 uzrokovani je povremenom produkcijom ROS i posljedica je gotovo svih nepovoljnih okolišnih u inaka na biljke (Elstner i Osswald 1994). Povremena produkcija ROS sastavni je dio procesa senescencije (Kar i Feierabend 1984) nakon čega dolazi do gubitka klorofila i proteina, povremene lipidne peroksidacije i propusnosti membrane što naposljetu 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 (-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 tumači kao aklimatizacija na navedeni stres (Tausz

i sur. 2003) i poja avanje antioksidacijskog sustava (Polle i Rennenberg 1992). Osim koncentracije GSH koja se može ali i ne mora pove ati, dolazi do promjene omjera redoks stanja više prema GSSG (Tausz i sur. 2003). Ukoliko do e do opadanja razine GSH biljka postaje osjetljiva na oksidacijski stres. U slu ajevima kada se to nije dogodilo unato padu razine GSH, dolazi do nagle produkcije ostalih antioksidansa koji kompenziraju nedostatak GSH i sprje avaju preveliku osjetljivost. Glavna determinanta otpornosti na oksidacijski stres nije koli ina 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) mogu avaju uklanjanje perokksida direktno pomo u GSH što nije naju inkovitiji na in. Biljne GPX ne sadrže selen kao peroksidaze sisavaca i kataliziraju isklju ivo GSH-ovisnu redukciju perokksida vrlo malom brzinom u odnosu na brzinu nastajanja perokksida (Noctor i sur. 2002). Unato slaboj konstitutivnoj ekspresiji i maloj aktivnosti, induciraju se oksidacijskim stresom i u kloroplastima. Mnogo su važnije u drugim podru jima oksidacijskog metabolizma gdje uklanjaju lipidne ili alkilne perokside (znatno bolje od vodikovog perokksida) i sprije avaju oksidativnu degradaciju molekule DNA. GST koje jednako tako mogu biti inducirane oksidacijskim stresom, odnosno prisustvom ROS, imaju sli an mehanizam djelovanja kao GPX u redukciji ROS (Inzé i Montagu 2002).

Zbog velikih koli ina askorbata, GSH i NADPH koje su prisutne u biljnoj stanici, glutation-askorbatni ciklus (Beck-Halliwel-Asada ciklus) predstavlja glavni na in uklanjanja suviška perokksida (Brunold i sur. 1996) i superokksida (slika 7). Prvenstveno se doga a 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 kompartimentu.



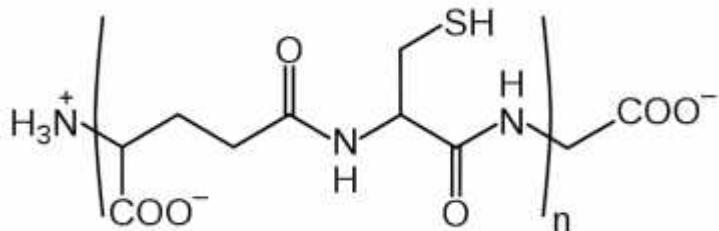
Slika 7. Shema glutation-askorbatnog ciklusa.

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 tako je 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, disproporcionalira 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 brzoj ne-enzimskoj redukciji DHA od strane GSH pri lužnatoj pH vrijednosti, enzimski katalizirane reakcije su mnogo brže i događaju se još (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 tako je slijedi općeniti sustav stresnog odgovoara može se pratiti preko navedenih redoks parova. Zbog povećanja količine ROS (Vranova i sur. 2002) dolazi do većeg udara na ovaj ciklus. Događaju 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 enzimske 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 tako je u određenoj mjeri sudjeluje u oksidacijskom stresu. Iako potiče sintezu GSH (ali ne i promjeni u redoks stanju) nema direktnog djelovanja GSH na zaštitu od ozona. Razlog tome je što ozon ulazi preko puti 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 pomoći u GSH (Noctor i sur. 1998).

## 4.2. Helacija

Glavni mehanizam detoksikacije teških metala temelji se na separaciji od stani nog metabolizma, vezanju u komplekse i prijenosu u druge stani ne odjeljke (u biljnim stanicama naj eš e u vakuolu). Fitohelatini (-glutamilpolipeptidi, poli(-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 -COOH. Izme u njih nastaje neobi na -peptidna veza zahvaljuju i kojoj su fitohelatini otporni na razne peptidaze. C-terminalna aminokiselina dijeli fitohelatine u pet skupina a prona ena je i šesta (Prasad i Strzalka 2002).



**Slika 8.** Molekula fitohelatina prikazana strukturnom formulom, n = 2-11.  
Prema [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

Fitohelatin se sintetizira u citosolu kataliziranim polimerizacijom GSH. Enzim koji katalizira reakciju je fitohelatin sintaza (-glutamilcisteindipeptidil transpeptidaza, PCS). Katalizira transport -EC skupine GSH donora na akceptorsku molekulu GSH ili kra i lanac fitohelatina (n=2). Ve ina fitohelatina koji se sintetiziraju kao odgovor na teške metale sastoje se od ponavljanju ih -glutamilcisteina s C-terminalnim glicinom (Prasad i Strzalka 2002). Sukladno postojanju homologa glutationa, u razliitim biljnim vrstama postoje i homolozi fitohelatina. -EC donorsko mjesto fitohelatin sintaze je izrazito specifično za GSH dok akceptorsko -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 pove anje u njihovoj molekularnoj masi uzrokovano je prisutnoš u S<sup>2-</sup> iona (Prasad i Strzalka 2002). Takvi kompleksi (naj eš e LMW) dospijevaju preko prijenosnika ovisnog o magneziju i ATP-u, u vakuolu gdje se dalje metaboliziraju i sudjeluju u procesu biominerализације (Buchanan i sur. 2002).

Prisustvo teških metala djeluje na dodatnu sintezu i pove anje enzimske aktivnosti PCS u odnosu na njezinu konstitutivnu ekspresiju (Xiang i sur. 2001). Metali imaju razli ite sposobnosti indukcije PCS (Prasad i Strzalka 2002) a stimulacija PCS je metalno specifi na. Pri jednakoj vanjskoj koncentraciji teških metala, metali s ve im afinitetom za tiolnu skupinu su bolji stimulatori od metala s afinitetom za karboksilnu skupinu (Brunold i sur. 1996). Autori imaju razli ita 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 razli ite produkte PCS reakcije i onda djeluju na PCS. Drugi autori smatraju da metali induciraju PCS isklju ivo u slobodnom obliku ili druga ijam kompleksima. Pod utjecajem stresa dolazi do potrošnje citosolnog GSH za sintezu fitohelatina. Padom koli ine GSH induciraju se -ECS i GS što rezultira intenzivnom produkcijom GSH. Prisustvo teških metala na taj na in indirektno djeluje na regulaciju stope sinteze prekursora GSH. Zbog toga su stopa asimilacije reducirano sumpora, odgovaraju a opskrba cisteinom i koli ina GSH kriti ni i limitiraju i 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 sli na i može se svesti na etiri 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 unutarstani ne odjeljke ili izvanstani ne prostore vrši se

pomo u prijenosnika. Konjugat se transformira u neštetni oblik ili potpuno degradira. U biljkama se štetni spojevi naj eš e upu uju prema vakuoli (Bartholomew i sur. 2002).

Biljke su u mogu nosti 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 razli itim elektrofilima je GST. Prisutna je u biljkama, životinjama, gljivama i nekim bakterijama (Sanderman 1994). Vrlo je raznolika i specifi na u višim biljkama te se ubraja u veliku i heterogenu skupinu proteina. Zajedni ki 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 na in ozna en i preodre en 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 op enitog s etiri koraka (Davies i Caseley 1999). Tako er dolazi do pove anja 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, mogu a uloga je modulacija hormonske aktivnosti ili nastanak spremišnog oblika hormona (Bilang i sur. 1993).

GST su osim stresno-specifi ne i op enite indukcije oksidacijskim stresom, inducirane i *safenerima* (Dixon i sur. 2002). To su sinteti ke molekule koje induciraju otpornost na herbicide preko pove anja 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 isklju ivo u korijenu i u nedovoljno visokim koncentracijama da bi osigurala otpornost na herbicide (DeRidder i Goldsbrough 2006).

#### **4.4. Krioprotekcija**

Uloga GSH kao krioprotектanta potječe od injenice kako otpornost na smrzavanje zahtijeva povećanje u inkovitosti 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 veću produkciju ROS. Postoji hipoteza prema kojoj sposobnost GSH u spriječavanju formacije irreverzibilnih sumpornih veza i očuvanju proteina u aktivnom stanju treba doprinijeti toleranciji na smrzavanje (Inzé i Montagu 2002). Hipoteza može biti potvrđena injenicom kako su cikli ke interkonverzije ditiola i disulfida, pogotovo na niskim temperaturama, ključne za stanicu obranu (Foyer i sur. 1991). Novija istraživanja su dokazala korelaciju razine lisnog GSH s otpornosti na smrzavanje u kukuruza (Kocsy i sur. 2001) preko jakе indukcije transkriptata -ECS (Gomez i sur. 2004). Tretiranje s herbicidima, safenerima i drugim tvarima koje dovode do povećanja 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 adenosin-5'-fosfatosulfat (APS). Od APS postoje 2 puta koji opisuju ulazak sulfata u reduksijski put. Jedan opisuje kako se sulfatna skupina s APS prenosi na reducirani tiolni 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 hGSH. 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. Morala se uspostaviti kompatibilna interakcija kako bi došlo do razvoja novih korijenskih struktura za fiksaciju atmosferskog dušika u uvjetima manjka dušika (Pauly i sur. 2006). Sinteza 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 unutarstanih koncentracija GSH i GSH-ovisne indukcije fenilalanin-amonijkske lijaze (PAL) i halkon sintaze (CHS). Samo povećanje unutarstanih koncentracija 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 antioksidante male molekularne mase. Dolazi do jakе 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 pove anje GSH može biti jedan od na ina prenošenje signala peroksida, mogu e je da njegovo pove anje u uvjetima kada peroksid nije prisutan, može biti protuma eno kao sli an signal (Shi i sur. 1994).

Ve se kod uloge GSH u stvaranju meristemskog tkiva nodula i korijenskog sustava u simbiontskom odnosu može naslutiti kako GSH ima odre eni utjecaj na stani ni ciklus (Noctor i sur. 2002). U vrsta roda *Arabidopsis* dokazano je kako razina GSH odlu uje ho e li stanica prije i iz G1 u S fazu stani nog ciklusa odnosno zapo eti proces diferencijacije ili u i u mirovanje ili ak smrt (May i sur 1998a). Kako je razina GSH bitna za prolazak stanice kroz S fazu stani nog 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 stani nog ciklusa, postoji korelacija razine GSH s proliferacijskim kapacitetom stanica apikalnog meristema vrsta roda *Arabidopsis*. Ve je re eno kako redoks parovi mogu djelovati kao signalna veza izme u okoliša i biljke. Na taj na in dovode do morfološke adaptacije preko promjene obrasca stani ne diobe u primarnom korijenovom apikalnom meristemu. Postoji veza izme u dužine stanice trihoblasta (korijenove dla ice) i unutarstani ne redoks homeostaze. Preko takvog redoks mehanizma korijen može smanjiti bo ni rast (broj korjenovih dla ica) i nastaviti „istraživati“ tlo u oksidiraju im nepovoljnim uvjetima ili, ukoliko je okolina pogodna, poja ati bo ni rast i pove ati broj korjenovih dla ica (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 specifi noj 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 izme u svjetla i zalihe D1 proteina. D1 protein se ošte uje 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 odre enih 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 enje tiolne skupine u organski spoj). Formacija reverzibilnih disulfidnih veza važan je mehanizam moduliranja aktivnosti proteina i bitan po etni signalizacijski događaj. Reverzibilna tiolacija štiti tiolne skupine ključnih proteina od irreverzibilne 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 glutationa 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 ogranačaka 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 u inaka GSH, mogu se konstruirati transgene biljke koje e preko njegove pove ane koncentracije dobiti bolju zaštitu (Tausz i sur. 2004). Pri tome treba imati na umu da manipulacija samo jedne komponente GSH antioksidacijskog sustava ne e nužno pove ati otpornost biljke nego ju u initi još osjetljivijom (Creissen i sur. 1999). Poboljšanje zaštite može se posti i pove anjem konstitutivne razine svih komponenti i unošenjem gena enzima biosinteze GSH (May i sur. 1998b). Oboga enje GSH ne e samo utjecati na fiziološke procese u listovima nego e biti od koristi cijeloj biljci. Inhibicija povratnom spregom -ECS od strane GSH ili NADPH-ovisna inhibicija GR u kloroplastnoj stromi može se nadja ati pove anom ekspresijom navedenih enzima. Zanimljivo je da sinteza GSH pove ana na ovaj na in ne e ograni iti dodatnu indukciju sinteze stresnim podražajima.

S obzirom na prethodni model, GSH se iskorištava na razne na ine u bioindustrijskoj proizvodnji. Uglavnom prevladava dvojako zanimanje za GSH kao poja iva okusa (stupa u interakciju s prekursorima molekula i njima samima koje su odgovorne za odre eni okus hrane) i antikancerogenog djelovanja hrane te jednostavnog tripeptidnog modela za biotehnološku produkciju heterolognih tripeptida u kulturi biljnog tkiva. Biljke oboga ene GSH mogu predstavljati koristan izvor GSH za industrijske potrebe. Danas je mogu e posti i konstitutivnu i iznadprosje nu proizvodnju GSH, optimiziranjem uvjeta u kulturi tkiva iz transformiranih biljaka. Na taj na in GSH dobiva još širu primjenu u postizanju otpornosti na gljivi ne infekcije, poboljšanju tolerancije stresa biljnih vrsta stvorenih mikropropagacijom, transformiranom drve u (topola) za ekodetoksikaciju preko zarobljivanja ksenobioti kog zaga iva a, 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, Rüegsegger 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, Rusell 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, Lapthon 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 Sype G, Gilabert A, Puppo A (2005) Glutathione and homoglutathione 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 Sype G, Herouart D, Puppo A (1999) Localization of glutathione and homoglutathione in *Medicago trunculata* 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 Sype 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.
- Herschbach 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* **111**, 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 -glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Plant Biology* **95**, 12049-12054.
- May MJ, Leaver CJ (1994) *Arabidopsis thaliana* -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 -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 -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 scenescnce 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) Unequical 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 metabolix 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](http://www.wikipedia.org)

## **7. SAŽETAK**

Tiolni tripeptid glutation ima važnu ulogu u antioksidacijskom sustavu obrane biljne stanice kao i mnoge druge uloge u stani noj zaštiti, metabolizmu sumpora i pove anju otpornosti na odre eni abioti ki stres. Djeluje kao redoks pufer koji sudjeluje u prenošenju stani nih informacija i prisutan je u gotovo svim organizmima. Preko redoks signalizacije povezuje i integrira razli ite stani ne 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 pokre e adaptacijske odgovore biljaka na vanjske uvjete. Ukupna razina glutationa odre ena je kompleksnom interakcijom izme u 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 zaštiti stanice viših biljaka od oksidacijskih ošte enja. Uklanja razli ite reaktivne oblike kisika, enzimski kataliziranim reakcijama ili drugim na inima. Direktno i indirektno preko fitohelatina, sudjeluje u uklanjanju teških metala iz stanica. Stupa u interakciju sa širokim spektrom štetnih endogenih i egzogenih spojeva prilikom ega ih inaktivira. Kao krioprotектант osigurava odre eni stupanj otpornosti na smrzavanje i aktivno sudjeluje u asimilaciji sumpora. Djeluje na rast i razvoj viših biljaka, modificiraju i mitozu i reguliraju i gensku ekspresiju povezanu s odre enim 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.