

Ağır Metal Toleransında Kükürt Metabolizmasının Önemi

Hakan TERZİ^{1,*} ve Mustafa YILDIZ¹

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

*hakanterzi81@gmail.com

Özet

Çevrenin ağır metaller ile kontaminasyonu bitkiler için önemli bir tehdit haline gelmiştir. Kükürt bitki beslenmesi için gereklidir ve çevresel streslere karşı bitkileri koruyan moleküllere metabolize olmaktadır. Bitkilerde ağır metaller ve kükürt homeostazisi birbiriyle ilişkilidir ve ağır metaller hem sülfat alınımı hem de kükürt özümlemesinde fonksiyon gören enzimlerin sentezinde artışa neden olmaktadır. Kükürt özümlemesi ve kükürt içeren bileşiklerin sentezi ağır metal stresi altındaki bitkilerde hayatta kalma için oldukça önemlidir. Bununla birlikte, çevrenin dekontaminasyonu için kullanılan yaklaşımlardan biri kükürt alınımı ve özümlemesi ile ilişkili genlerin teşhisi ve aşırı ekspresyonudur. Arttırılmış kükürt özümleme kapasitesi ve kükürt içeren bileşiklerin sentezine sahip transgenik bitkilerin geliştirilmesi fitoremediasyon için yeni olanaklar sağlamaktadır. Bu derlemede, ağır metallerin kükürt metabolizması üzerine olan etkileri ve bitkilerin ağır metal toleransında kükürt özümlemesi ve kükürt içeren bileşiklerin rolleri tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kükürt metabolizması, ağır metaller, glutatyon, tolerans

The Importance of the Sulfur Metabolism in Heavy Metal Tolerance

Abstract

The contamination of the environment by heavy metals has become a major threat to plants. Sulfur is an essential plant nutrient and is metabolized into molecules

that protect plants against environmental stresses. Heavy metals and sulfur homeostasis appear to be linked in plants and heavy metal lead to increases of both sulfate uptake and enhances the synthesis of enzymes that are involved in sulfur assimilation. Sulfur assimilation and production of sulfur-containing compounds are crucial for the survival of plants under heavy metal stress. However, one of the approaches employed for the decontamination of environment includes identification and overexpression of genes involved in the sulfur uptake and assimilation. The improvement of transgenic plants with enhanced sulfur assimilation capacity and sulfur-containing compounds synthesis provides new opportunities for phytoremediation. In this review, the effect of heavy metals sulfur metabolism and the roles of sulfur assimilation and the sulfur containing compounds in heavy metal tolerance in plants were discussed.

Key Words: Sulfur metabolism, heavy metals, glutathione, tolerance

1.GİRİŞ

Bitki büyüme ve gelişimi için önemli bir besin elementi olan kükürt, biyotik ve abiyotik streslere karşı savunmada önemli bir rol oynamaktadır. Kükürt elementi sistein (Cys) ve metiyonin amino asitleri, kofaktörler, metal kümeleri ve bitkileri çevresel streslerin etkilerinden koruyan glutatyon (GSH), fitoşelatinler (PC'ler), fitoaleksinler ve glukozinolatlar gibi primer ve sekonder metabolitlerin bileşenidir [1]. Kükürt toprakta sülfat formunda bulunmaktadır. Bitkiler topraktaki kükürdü köklerdeki sülfat için farklı afinitelere sahip sülfat taşıyıcıları ile almaktadır [2]. Sülfat Cys ve homosistein (HCys) gibi organik metabolitlerin yapısına katılmadan önce kükürt özümleme yolunu oluşturan bir seri reaksiyonla sülfide dönüştürülmektedir. Bununla birlikte, kükürt indirgenmiş veya yükseltgenmiş formda özümlelenebilmektedir. Yükseltgenmiş formda indirgeyici olmayan yol, direkt olarak sülfatı glukozinolatlar, hormonlar, flavonoidler ve jasmonatlar gibi metabolitlerin yapısına katmaktadır [3].

Metabolik olarak kükürt metabolizması, bitkilerde ağır metal toleransı için gerekli moleküllerin sentezi için temel bir yol oluşturmaktadır [4]. Bitkilerde ağır metal stresinin sülfat alınımında [5-9] ve kükürt özümlemesinde fonksiyon gören enzimlerin ifadesinde değişimlere neden olduğu bildirilmiştir [7, 8, 10, 11]. Bu nedenle, bitkilerde

ağır metal toleransı ve kükürt metabolizmasının birbirleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [12]. Bu derlemede, ağır metallerin kükürt metabolizması üzerine etkileri, kükürt özümlemesi ve kükürt içeren bileşiklerin ağır metal toleransındaki rolleri tartışılmıştır.

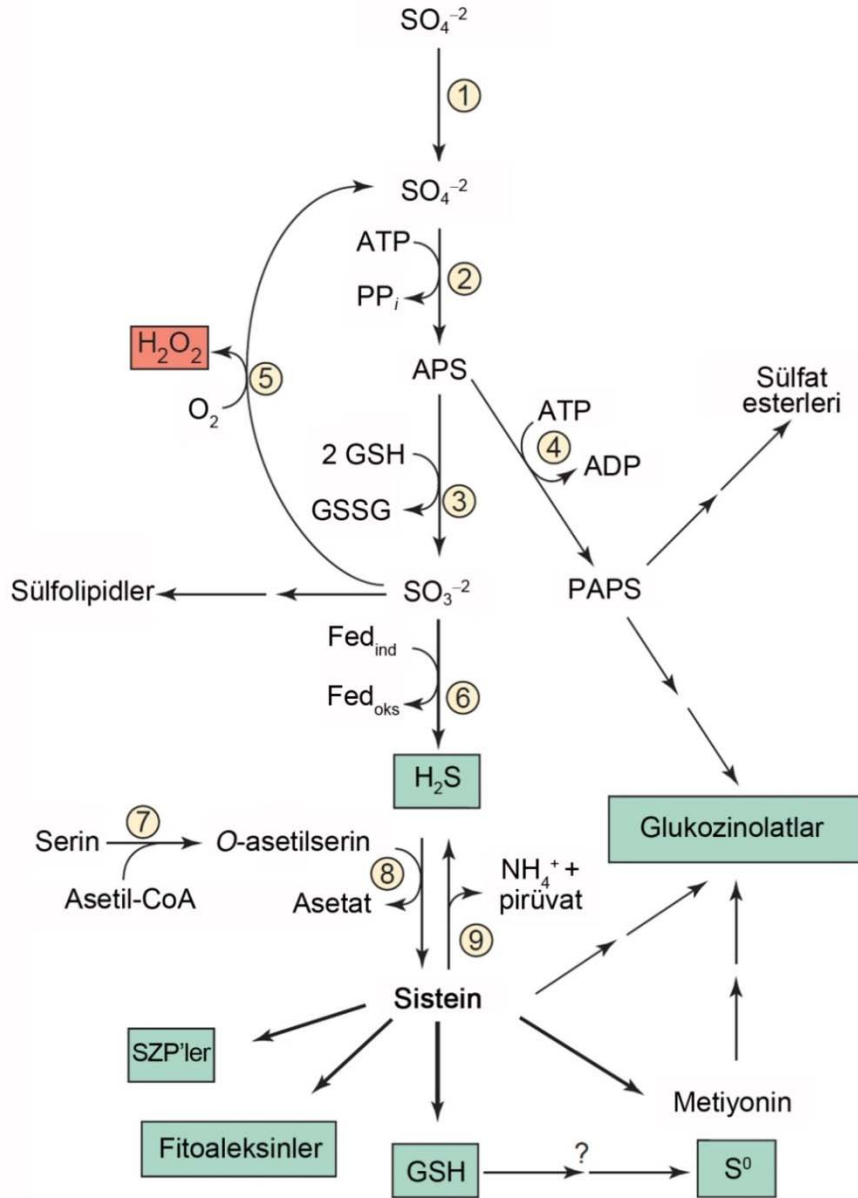
2. SÜLFAT ALINIMI VE AĞIR METALLERİN ETKİSİ

Bitki için biyolojik olarak kullanılabilir moleküle kükürdün özümlemesindeki ilk basamak sülfat taşıyıcıları aracılığı ile alımdır (Şekil 1). Sülfat alınımı ve özümleme basamakları enerji bağımlıdır ve gerekli enerji bu taşıyıcıları içeren kök tüyü ve kök epidermis hücrelerinin plazma membranlarında oluşturulan proton gradiyenti ile sağlanmaktadır [13]. Sülfat alınımının regülasyonu transkripsiyonel, translasyonel ve/veya post translasyonel seviyede kontrol edilebilmektedir.

Glutasyon gibi tiyol bileşiklerinin yanı sıra dışsal ve içsel sülfat konsantrasyonunun sülfat taşıyıcılarının ekspresyonu ve aktivitesinin kontrolünde fonksiyon gördüğü ileri sürülmüştür [14, 15]. Bitkilerde sülfat taşıyıcıları, *Arabidopsis thaliana*'da belirlenen amino asit sekansları temelinde 5 gruptan (*AtSULTR1-5*) oluşmaktadır [16]. Bu taşıyıcılar sülfat için afiniteleri, taşınma hızları ve lokalize oldukları doku tiplerine göre farklılık göstermektedir. Sülfat taşıyıcılarının lokasyonları ve kapasiteleri çevredeki kükürdün kullanılabilirliğinden önemli derecede etkilenmektedir [17]. Grup 1 yüksek afiniteli sülfat taşıyıcıları kökler tarafından primer alımı sağlamaktadır. Deneysel olarak sağlanan düşük S konsantrasyonunun kök tüyleri, epidermis ve korteks hücrelerinin plazma membranında bulunan yüksek afiniteli sülfat taşıyıcısı *SULTR1;1* (HAST)'in ekspresyonunu artan yönde regüle ettiği gösterilmiştir [18]. Köklerde bulunan yüksek afiniteli taşıyıcıların (*SULTR1;1* ve *SULTR1;2*) ekspresyonunun kükürt eksikliğine cevap olarak arttığı, buna karşın *SULTR1;2*'in yüksek kükürt konsantrasyonlarında da ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir [10, 19]. Cd ve Zn'ye maruz kalan bitkilerde artan *SULTR1;1* ekspresyonunun köklerde daha yüksek sülfat konsantrasyonu ile sonuçlandığı bildirilmiştir [5, 6, 20]. *Stylosanthes hamata*'dan yüksek afiniteli sülfat taşıyıcı geni *SHST1*'i eksprese eden transgenik *Brassica juncea* hatlarının aynı *SHST1* transkript seviyelerine sahip olmalarına karşın, hatlardan birinin köklerde artan Cd seviyelerinin yeterli şekilde detoksifiye edemediğinden dolayı Cd'a hassas olduğu bildirilmiştir [21]. Mısır bitkilerinde Cd uygulamasının yüksek afiniteli

sülfat taşıyıcısı *ZmST1;1*'i teşvik ettiği ve içsel sülfat içeren bileşikleri tükettiği bildirilmiştir [5]. Cu (2 ve 5 μ M) stresine maruz kalan *Brassica pekinensis* bitkisinin köklerinde *SULTR1;2* geninin yüksek düzeyde eksprese edildiği buna karşın *SULTR1;1* geninin neredeyse hiç eksprese edilmediği bildirilmiştir [9, 22]. Bu çalışmalarda, *SULTR1;2*'nin ekspresyon seviyesindeki artışa artan sülfat alım kapasitesinin eşlik ettiği belirtilmiştir [9, 22]. Diğer taraftan, sülfat eksikliğinin mısırdaki yüksek afiniteli sülfat taşıyıcısı *ZmST1;1* ve *B. juncea*'da düşük afiniteli sülfat taşıyıcısı *BjST1*'in ekspresyon seviyesinde önemli artışa neden olduğu belirtilmiştir [5, 21]. Ayrıca Cr(VI) stresinin her iki bitkide sülfat taşıyıcılarının ekspresyon seviyesini azalttığı bildirilmiştir [7, 8].





Şekil 1. Kükürt içeren savunma bileşiklerinin biyosentezi için kükürt özümleme basamakları. Yüksek afiniteli taşıyıcılar (1) ile sülfat topraktan alındıktan sonra, ATP sülfürlaz (2) enziminin kataliz ettiği reaksiyonla ATP harcanarak gövdeye taşınır. Oluşan APS (Adenosin-5'-fosfosülfat) elektron vericisi olarak glutatyonun (GSH) kullanıldığı reaksiyonla APS redüktaz (3) tarafından indirgenir. Alternatif olarak APS, glukozinolatların biyosentezi gibi çeşitli reaksiyonlar için gerekli 3'-fosfoadenozin-5'-sülfatı (PAPS) oluşturmak için APS kinaz (4) tarafından aktive edilir. Sülfid redüktaz (6) enzimi ile sülfid H₂S'e indirgenir ve bu H₂S sisteini oluşturmak için O-asetil(tiyol)liyaz (8) enziminin kataliz ettiği reaksiyonla O-asetilserinin yapısına katılır. Kükürt özümlemesinin birincil ürünü olan sistein, kükürtçe zengin proteinlerin (SZP'ler) ve GSH'un yapısına katılır. Bununla birlikte, sistein glukozinolat biyosentezi ve fitoaleksinlerin sentezi için indirgenmiş kükürt vericisidir. Ayrıca H₂S, sülfidraz (9) aktivitesi ile sisteinden salınabilirken, element kükürt (S⁰) GSH'dan salınabilmektedir. Son olarak, sülfid oksidaz (5) aktivitesi ile aşırı miktardaki sülfid sülfata dönüştürülmektedir (Rausch and Wachter [1]den değiştirilerek).

Grup 2 taşıyıcıları düşük afiniteli sülfat taşıyıcılarıdır. Grup 3 taşıyıcıları nispeten karakterize edilememiş olmasına rağmen SULTR3;5 izoformunun *Arabidopsis*'te kökten gövdeye kükürt taşınımını kolaylaştıran SULTR2;1 ile bir heterodimer oluşturabildiği bildirilmiştir [23]. Ayrıca grup 3 taşıyıcılar tercihen yapraklarda eksprese edilmektedir [13]. *Brassica napus* ve *B. juncea*'da Cd stresinin *SULTR2;2* (LAST) transkript seviyelerini kök dokularında azalttığı buna karşın yaprak dokularında arttırdığı gösterilmiştir [6, 24]. Kök dokusundaki sülfid, GSH ve non-protein tiyollerin seviyelerindeki artış ile gösterildiği gibi, köklerdeki taşıyıcı aktivitesindeki azalmanın Cd detoksifikasyonu için köklerde yeterli Kükürdü sağlayabildiği ileri sürülmüştür [6]. *A. thaliana*'da SULTR2;1 köklerden yapraklara kükürt taşınımı için ksilem borularına sülfatın yüklenmesini sağladığı bilinmektedir [23]. Cr(VI) stresi altında *B. juncea* *BjSULTR2;1*'in ekspresyon seviyesinin hızlı şekilde azaldığı ve sistein seviyesini direkt veya dolaylı olarak arttıran kromatinin bu etkiden sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür [25].

Grup 4 taşıyıcıları esas olarak kök ve gövdede vakuolar sülfat havuzlarının mobilizasyonunda fonksiyon görmektedir. Bitkiler tüm olası kullanılabilir sülfatı vakuolden tekrar mobilize etmeye ve tekrar dağıtmaya çalıştığında, yapısal sülfat taşıyıcısı SULTR4;1 ve teşvik edilebilir sülfat taşıyıcısı SULTR4;2 genellikle kükürt eksikliğinde sadece artan yönde regüle olmaktadır [26-28]. Düşük kükürt koşullarında büyüyen buğdayda artan *SULTR4;1* ekspresyonunun tohumda Se ve Mo birikimini arttırdığı bildirilmiştir [29]. *B. pekinensis* bitkilerinde *SULTR4;1* ekspresyonunun 10 µM Cu konsantrasyonunda gövdede artarken, kökte azaldığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, *SULTR4;2* kök ve gövdede çok az eksprese olmasına karşın gövdedeki ekspresyonun konsantrasyondaki artışa bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir [22]. *B. juncea* bitkisinde *BjSULTR4;1*'in *BjSULTR2;1*'e benzer bir gen ekspresyonu profili gösterdiği ve bu nedenle, Cr(VI) stresine cevapta her iki genin koordineli regülasyonu olduğu ileri sürülmüştür [25].

Grup 5'i oluşturan kısa amino asit sekanslarına sahip olan taşıyıcılar hakkında bilinenler azdır. *Arabidopsis*'te *SULTR5;2*'in Mo birikiminde fonksiyon gördüğü düşünülmekte; fakat kükürt noksanlığı koşullarında büyütülen buğdayda *SULTR5;2*'nin ekspresyon profilleri bitki dokularında Mo'ın dağılım profillerini tam olarak açıklamamaktadır [29]. Sülfat taşıyıcılarının temel filogenetik grupları ve fonksiyonları

belirlenmiş olmasına karşın, bu taşıyıcıların etki mekanizmaları ve düzenlenişleri ile ilgili ilave çalışmalara gereksinim vardır.

3. KÜKÜRT ÖZÜMLEMESİ

Sülfat ve sülfidin indirgenmesinden sorumlu olan ilk iki enzim ATP sülfürlaz (ATPS) ve APS redüktaz (APSR) (Şekil 1) [30, 31] olup; sadece plastidde lokalize olmuştur. Sülfat bir kez bitki bünyesine alındığında, ATPS enzimi sülfatın indirgeyici asimilasyon yoluna giriş basamağını kataliz etmektedir. ATPS, sülfat ve ATP'den adenozin-5'-fosfosülfatın oluşumu yoluyla sülfatı aktive eder [30] ve APSR enzimi elektron donörü olarak GSH kullanarak APS'den sülfidi oluşturur [31]. APSR kükürt özümlemesinde ilk kararlı basamağı katalizlediğinden, bitkilerde ağır metal toleransının arttırmada transgenik yaklaşım için hedef olmuştur [32]. Cd uygulaması *A. thaliana* [33] ve *B. juncea* [24]'da her iki enzimin transkripsiyonunu artan yönde regüle etmektedir. Ayrıca *A. thaliana*'daki proteomik analizler her iki enzimin miktar ve aktivitesinin Cd'a maruz kalmadan sonra arttığını göstermiştir [34-36]. Benzer olarak, sülfat noksan ve normal koşullar altındaki *A. thaliana* bitkilerinde ATPS aktivitesinin Cd stresine cevap olarak arttığı ve bu artışın sülfat noksan bitkilerde daha düşük olduğu belirtilmiştir [37]. ATPS'yi aşırı eksprese eden transgenik *B. juncea* bitkilerinde glutasyon ve toplam tiyol içeriklerinin yabancı-tip bitkilere göre daha yüksek seviyelerde olduğu belirlenmesine rağmen, Cd, Zn, Cr, Cu, Pb ve Mn'in birikiminin yabancı tipe göre değişmediği bildirilmiştir [38]. *B. juncea*'da ATPS'nin aşırı ekspresyonunun, As, Cd, Cu ve Zn'ya karşı bazal toleransı arttırdığı ve transgenik bitkilerin gövdelerinde Cd, Cu ve S'ü daha yüksek seviyelerde biriktirdiği belirtilmiştir [39].

Kükürt özümlemesi yolunda ilk ürün olan adenozin-5'-fosfosülfat (APS) APS redüktaz (APSR) ve APS kinaz (APSK) için bir substrattır. APSR daha ileri indirgeme için bileşikteki kükürdü işlerken [40], APSK ise glukozinolatlar ve flavonoidlerin sentezine katılan bir kükürt vericisi sağlamak için APS'yi fosforile etmektedir [41]. APSR'nin kükürt özümleme yolunun esas düzenleyici basamağı olarak düşünülmekte ve bitkinin kükürt durumu (sistein veya glutasyonla inhibe edilen ve kükürt eksikliğiyle teşvik edilir) ile regüle edilmektedir [42]. Mısır bitkisinin kök dokusunda *ATP-S* ve *APS-R* transkript birikiminin Cr(VI) uygulaması ile büyük oranda arttığı bildirilmiştir

[7]. *APSR* transkriptlerinin birikimi tütün bitkilerinin kök ve yapraklarında Cd uygulaması ile önemli oranda artmıştır [20]. Bununla birlikte, *B. pekinensis* bitkisinde *APSR*'in ekspresyonu kök ve gövdelerde $10\mu\text{M}$ 'dan düşük Cu konsantrasyonlarından etkilenmediği, $10\mu\text{M}$ Cu'nun ise köklerde yaklaşık %50 azalmaya, gövdede ise 1.5 kat artışa neden olduğu gösterilmiştir [9]. Krom stresi altındaki *B. juncea* bitkilerinde artan *APSR* transkripsiyonunun dokularda kükürt ve GSH içeriklerinin azalmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Ayrıca Cr(VI) stresi altındaki bitkilerde yüksek oranda biriken sisteinin *APSR*'nin azalan yönde regülasyonuna neden olmadığı bildirilmiştir [25]. Bunlara ilaveten, *A. thaliana*'da *Pseudomonas aeruginosa* *PaAPSR* geninin heterolog ekspresyonunun Se indirgenmesinde azalışa neden olduğu bildirilmiştir [43].

Sülfat redüktaz (SiR) sülfatın sülfide indirgenmesinde görev alan son enzimdir. SiR yapısal olarak eksprese olur ve allosterik efektörlere veya posttranslasyonel modifikasyonlara maruz kalmamaktadır [44]. Sentez yolunun kontrolünde SiR'in rolü bazen ihmal edilmesine rağmen, SiR'in aktivitesindeki azalmanın tüm indirgeyici yol ve sülfat içeren metabolitlerin sentezi için engelleyici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [45].

3.1. Sistein Sentezi

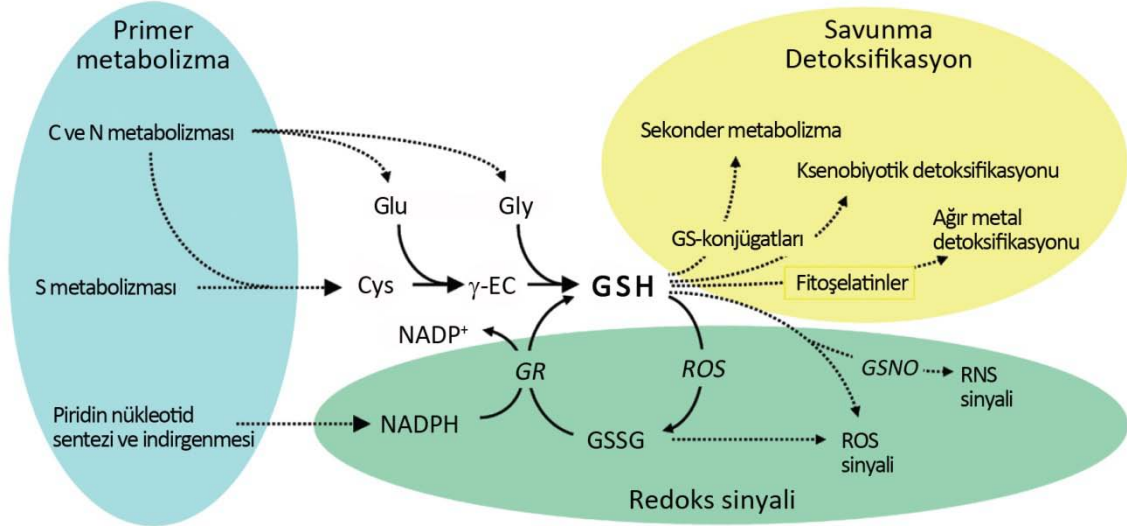
Sistein (Cys), protein yapısı ve redoks kontrolünün sürdürülmesini içeren çeşitli biyolojik fonksiyonlarda önemli rollere sahiptir [46, 47]. Cys; metiyonin (Met), glutatyon (GSH) ve fitoşelatinler (PC'ler)'in öncülüdür. Cys biyosentezi tiyol grupları içeren organik moleküllere kükürdün katılımı için giriş noktası sağlamaktadır (Şekil 1). Cys biyosentezi; asetil-CoA ile serinin asetilasyonu sonucu *O*-asetilserinin oluşumunu ve *O*-asetilserindeki bir asetil grubunun sülfid ile yer değiştirmesini kapsayan iki basamakta gerçekleşmektedir [48]. Serin asetil transferaz (SAT) ilk reaksiyonu katalizler ve *O*-asetil (tiyol) liyaz (OAS-TL) ise ikinci reaksiyonu gerçekleştirir. SAT, asetil-CoA ve serinin biyosentezinden sorumludur ve Cys ise OAS-TL'nin katalizlediği reaksiyonla OAS ve sülfidden sentezlenir. Her iki enzim birçok bitki türünde multigen familyaları tarafından kodlanmakta [49] ve sistein sentaz (CS) kompleksi olarak Cys biyosentezinde birlikte fonksiyon görmektedir [50]. SAT ağır metal toleransı ve birikiminde önemli rol oynamaktadır [51]. *Arabidopsis*'te Cd'a maruz kalmayı takiben

yapılan gen ekspresyon çalışmalarında SAT izoformlarının ekspresyonunda artış olduğu belirlenmiştir [52]. *Thlaspi*'nin hiperakümülatör ve hiperakümülatör olmayan türlerinin karşılaştırılması, artan SAT aktivitesinin Ni hiperakümülatasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir [53]. *Thlaspi goesingense*'nin *TgSATm* tarafından kodlanan mitokondrial SAT'ın aşırı üretimi, *A. thaliana*'nın yapraklarında GSH'un birikimini teşvik etmiş ve esas olarak Ni, Co, Zn ve Cd'a karşı artan tolerans sağlamıştır [51]. Farklı As(V) konsantrasyonlarına (100–1000 µM) maruz kalan *Sesuvium portulacastrum* türünde SAT ve CS gibi Cys biyosentez enzimlerinin aktivitesi kadar Cys seviyesi de azalma eğilimi göstermiştir [54]. Kadmiyum [39, 55], As [56] ve Al [57] uygulamalarının *OAS-TL* ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, *OAS-TL* ekspresyonunun *N. tabacum*'da Cd, Se ve Ni direnci [58], çeltikte Cd direnci [59] ve *A. thaliana*'da Cd direncindeki [55] artışla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ağır metal stresi koşullarında (400 µM Cd) azalan *OAS-TL* aktivitesinin, Cys ve GSH seviyelerinin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Sitolizik *OAS-TL*'yi aşırı eksprese eden bitkilerin, yabani tip bitkilere göre Cd'a 9 kat daha toleranslı olduğu ve fitoremediasyon için potansiyel bir araç olduğu bildirilmiştir [60]. Bu bulgular, fitoremediasyon uygulamasında genetik mühendisliği için SAT ve *OAS-TL*'nin kullanımının önemli bir potansiyel olduğunu göstermektedir.

4. BİR KÜKÜRT İÇEREN BİLEŞİK OLARAK GLUTATYON

Bitkilerde tiyol-içeren tripeptid glutatyon (GSH) hücrel redoks durumunun önemli bir düzenleyicisi olduğu kadar ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, ağır metallerin alıkonulması, sistein formunda fazla kükürdün depolanması ve kükürt asimilasyonunda APSR için bir substrat olarak işlevlere sahiptir. Glutatyon çok fonksiyonlu bir moleküldür ve hücre farklılaşması, ölüm, senesens, patojen direnci ve enzimatik regülasyonda önemli rol oynamaktadır (Şekil 2) [61]. Ayrıca GSH ağır metal koşulları altında fitoşelatin sentaz (PCS) ile sentez edilen sisteince zengin peptidler olan fitoşelatinlerin öncüsüdür [62]. Glutatyonun sentezi iki ardışık ATP-bağımlı basamakta gerçekleşir. İlk basamakta, plastidlerde lokalize γolan -GluCys sentaz (γ-ECS) enziminin katalizlediği reaksiyonla sistein ve glutamat amino asitlerinden -glutamil sistein (γ-EC) sentezlenmektedir (Şekil 3) [1]. İkinci basamak, sitozolde lokalize olan

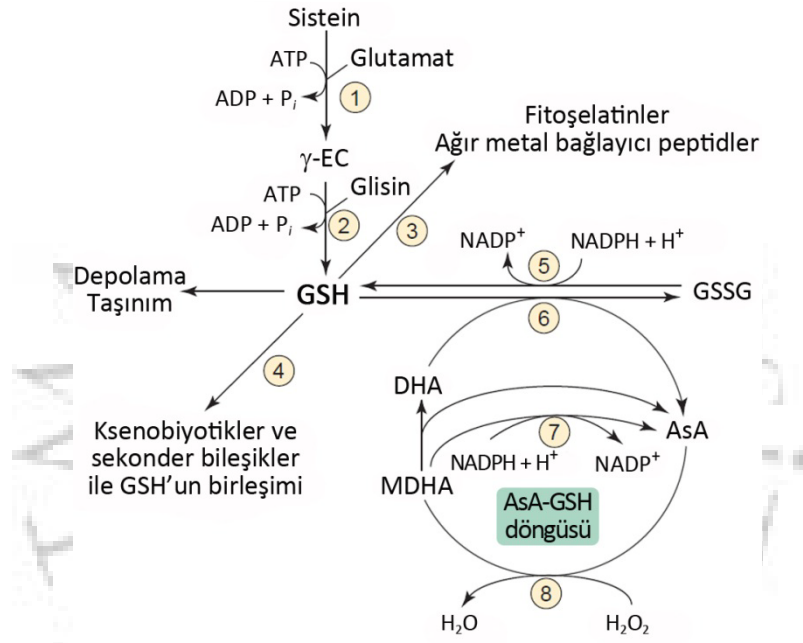
GSH sentaz tarafından γ -EC'ye glisin katılmaktadır. Her iki enzim *GSH1* ve *GSH2* olmak üzere birer gen tarafından kodlanmaktadır [63]. γ -ECS'yi kodlayan *GSH1* ekspresyonunun devre dışı bırakılması embriyo evresinde [64], glutatyon sentazı kodlayan *GSH2*'nin devre dışı kalması ise fide evresinde letaliteye neden olmaktadır [65]. Bununla birlikte, düşük GSH seviyesine sahip *A. thaliana*'nın γ -ECS allel mutantları (*pad2-1*) Cd ve Hg streslerine karşı hassasiyet göstermiştir [66]. Bununla birlikte, Cr(VI) stresinin *B. juncea*'da *GSH2*'nin transkript seviyelerini arttırdığı ve Cr(VI) toleransı ve birikiminde kükürt metabolizmasının önemli rol oynadığı bildirilmiştir [8].



Şekil 2.Bazı çok önemli glutatyon fonksiyonlarına genel bakış. Cys, sistein; γ -EC, g-glutamil sistein; GS-konjugatları, glutatyonS-konjugatları; GSNO, S-nitrosoglutatyon; Glu, glutamat; Gly, glisin; RNS, reaktifazottürleri; ROS, reaktif oksijen türleri (Noctor et al. [61]'den değiştirilerek).

Transjenik bitkilerde *GSH1* ve *GSH2* genlerinin ekspresyonu, ağır metal stresini içeren farklı abiyotik streslere karşı toleransı artırabilmektedir. Bir γ -ECS eksik *A. thaliana* mutantının yapraklarında *E. Coli* γ -ECS geninin ekspresyonu Hg, Cd ve As(V)'e karşı toleransın artmasına neden olmuştur [67]. Transjenik *B. juncea* bitkisinde bakteriyel γ -ECS veya *GS* genlerinin aşırı ekspresyonunun, GSH ve fitoşelatinlerin yüksek seviyede birikimine ve ağır metal toleransı ve birikime neden olduğu bildirilmiştir [68]. Sitozolde aşırı *GSH1* ekspresyonunun ağır metallerle kontamine

olmuş toprakta transgenik kavak bitkilerinin performansını arttırdığı belirtilmiştir [69]. Yabani tip bitkilere göre bakteriyel γ -ECS genini aşırı eksprese eden *A. thaliana* (*A2::ECS*) bitkilerinin As, Hg ve Cd stresleri koşullarında 3 ila 20 kat daha yüksek γ -EC, GSH ve fitoşelatin seviyelerine sahip olduğu bildirilmiştir. *A2::ECS* transgenik bitkilerin As'e son derece dirençli ve Hg'ya direncinin ise zayıf olduğu ve Cd stresinin bu bitkilerde γ -EC ile ilişkili peptidlerin seviyelerinde 3 ila 5 kat artışa neden olmasına rağmen Cd'a önemli düzeyde duyarlı oldukları gösterilmiştir [70].



Şekil 3. Farklı stres cevaplarında glutatyonun biyosentezi ve multifonksiyonel rolü. İki ATP kullanılarak sistein, glutamat ve glisinden γ -glutamil sistein sentaz (1) ve glutatyon sentaz (2) ile GSH sentezlenir. Glutatyon (GSH); (i) indirgenmiş kükürt için bir taşıyıcı ve depo aracı, (ii) fitoşelatin sentaz (3) ile katalizlenen bir reaksiyon ile fitoşelatinlerin bir öncülü, (iii) GSH-S-transferazlar (4) ile katalizlenen ksenobiyotikler ve sekonder bileşikler ile konjugasyon reaksiyonlarında ve (iv) askorbik asit-GSH-döngüsünde (AGC) bir anahtar rol oynayarak fonksiyon gösterir. AGC; O_2 and H_2O_2 içeren reaktif oksijen türlerinin detoksifiye edildiği birçok hüresel kısımda fonksiyon göstermektedir [(7) monodehidroaskorbat (MDHA) redüktaz; (8) askorbat peroksidadz]. AGC döngüsünde, dehidroaskorbat redüktaz (6) ile katalizlenen bir reaksiyonda GSH dehidroaskorbata (DHA) indirgenirken, daha sonra glutatyon redüktaz (5) ile tekrar redükte olabilir (Rausch and Wachter [1]’den değiştirilerek).

Glutatyon serbest metal iyonlarının potansiyel olarak duyarlı sisteince zengin proteinlere bağlanmasını önlemekte ve dolayısıyla bu proteinlerin fonksiyonlarını etkilemektedir. Metallerle toksik olmayan kompleksleri oluşturduktan sonra GSH hücrelerdeki hassas bölgelerden uzakta metallerin alıkonulmasını kolaylaştırmaktadır

[71]. Bununla birlikte, sadece serbest metaller değil aynı zamanda herbisitler gibi potansiyel tehlikeye sahip ksenobiyotikler ve antosiyaninler gibi metabolitler GSH'a bağlanabilmektedir. Glutasyon sülfotransferazlar (GST'ler) tarafından katalizlenen reaksiyon GSH'un kükürt atomu ve bir elektrofilik bileşik arasındaki kovalent bağın oluşumudur [61]. GST aktivitesinin Cu ve Cd streslerine maruz bırakılan *Arabidopsis*'te arttığı gösterilmiştir [37, 72]. GST'lerin farklı sınıflarının birçok bitki türünde teşhis ve karakterize edilmesi bu multigen familyasının çeşitliliği ve fonksiyonunu anlamada bilgi sağlamıştır. Transgenik bitkilerde GST genlerinin aşırı veya heterolog ekspresyonunun ağır metal stresini içeren farklı abiyotik streslere toleransı arttırdığı ileri sürülmüştür. Örneğin, bir fungus GST genini eksprese eden transgenik tütün bitkilerinin kadmiuma çok toleranslı olduğu gösterilmiştir [73]. İlave olarak, çeltik *OsGSTL2* geninin transgenik *Arabidopsis* bitkilerindeki ekspresyonunun ağır metaller (As, Cd ve Cr) ve soğuk, ozmotik ve tuz stresi gibi diğer abiyotik streslere karşı toleransı arttırdığı bildirilmiştir [74].

Glutasyon, reaktif oksijen türlerinin (ROT) temizlenmesinde önemli fonksiyona sahip olması ve hücrel redoks durumunu dengede tutmak için bir redoks tamponu olması nedeniyle antioksidatif savunma sisteminin önemli bir bileşenidir [75]. GSH ile farklı ROT'ların enzimatik olmayan reaksiyonları sırasında, GSH (indirgenmiş form) GSSG (glutasyon disülfid; okside form)'ye dönüştürülür [76]. H₂O₂'i içeren ROT'ların parçalanması sırasında GSH'un GSSG'a olan oranındaki değişim redoks sinyal yollarında önemlidir [77]. İndirgenmiş durumda, sisteinin tiyol grubu ROT'lar gibi kararsız moleküllere direkt olarak indirgeyici bir elektron verebilme yeteneğindedir. Bir elektron verdiğinde, GSH kendi kendine reaktif hale gelir; fakat GSSG oluşturmak için diğer reaktif GSH ile kolayca reaksiyona girmektedir. ROT'lar ile reaksiyona girebilen birkaç diğer primer ve sekonder metabolitlerin okside formlarından farklı olarak GSSG, sitozol ve anahtar organellerde glutasyon redüktaz (GR) ile hızlıca tekrar döngüye girmektedir [78]. GR, bitkilerde ROT'ların temizlenmesinde hücrenin savunma sisteminin anahtar bir bileşenidir. GR çoğunlukla kloroplastlarda lokalize olmuştur; fakat bu enzimin küçük miktarı mitokondri ve sitozolde bulunmuştur [79]. Kloroplast ve mitokondriyal GR, *GR2* geni tarafından kodlanırken, *GR1* sitozol ve peroksizomda bulunan bir proteini kodlamaktadır [78]. *Arabidopsis*'in kloroplast veya mitokondriyal *GR2* için T-DNA mutantları embriyo-letalken [80], *gr1* devre dışı mutantları ekstrakte

edilebilir enzim aktivitesinde %30-60 azalma göstermesine rağmen fenotipik etkileri göstermez [81]. Toksik metaller ve metalloidler içeren birçok biyotik ve abiyotik stres faktörü bitkilerde GR'nin aktivitesini etkilemektedir [37, 79, 82]. GR aktivitesinde %111-178 aralığındaki bir artış Cr(VI) stresine maruz kalan *B. juncea*'da gözlenirken, *Vigna radiata*'da uygulamadan sonra GR aktivitesinde %56-77 aralığında bir artış belirlenmiştir [83].

Glutasyon, antioksidan kapasitesinin yanı sıra farklı hücre-altı kompartımanlarda askorbat-glutasyon (AsA-GSH) siklusuna katılmaktadır. AsA-GSH yolu, ROT'ların büyük çoğunluğunun etkili bir biçimde eliminasyonu için önemli enzimleri ve metabolitleri içeren reaksiyonlar ağında anahtar bir kısımdır ve böylece bitkilerde ROT-aracılı oksidatif zararı önlemektedir [82]. AsA-GSH yolu, indirgeyici eşdeğerlerin siklik bir transferi ile AsA ve GSH'ın ardarda oksidasyonu ve indirgenmesini içerir ve böylece bitkiye özgü askorbat peroksidaz (APX) H₂O₂'i H₂O'ya indirgeyebilmektedir. Glutasyon peroksidazlar (GPX'ler), geniş substrat spektrumuna sahip olan farklı izozimlerin geniş bir familyasıdır. GPX'ler; sitozol, kloroplast, mitokondri, peroksisom ve apoplast içeren bitki hücrelerinde yaygın olarak gözlenen antioksidan enzim olarak etki eder. GPX'ler indirgeyici güç olarak direkt GSH havuzunu kullanarak H₂O₂, organik ve lipid hidroperoksitlerin indirgenmesini kataliz etmekte ve böylelikle oksidatif zarara karşı hücreleri korumaktadır [82]. Millar ve ark. [77], *Arabidopsis*'de AtGPX1-7 olarak adlandırılan yedi protein familyası teşhis etmiştir. İzofomlar arasında, kloroplastlara post-translasyonel olarak hedeflenen AtGPX1 ve AtGPX7'nin [84] antioksidan koruma sağladığı ve salisilik ve ROT ile tetiklenen bitki immün cevaplarını regüle ettiği ileri sürülmüştür [85]. GPX'lerin diğer izofomları sitozol, mitokondri ve endoplazmik retikulumda lokalize olmuştur [84]. Farklı bitki türlerinde birkaç toksik metal ve metalloidin değişen konsantrasyonlarına karşı GPX'lerin cevabına ilişkin çelişkili raporlar mevcuttur. Arsenik stresine toleranslı *B. juncea* genotipi TPM-1'de GPX aktivitesinin As(V) ve As(III) uygulamalarında arttığı, buna karşın As'e duyarlı TM-4 genotipinde ise GPX aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir [86]. Fatima ve Ahmad [87], birçok ağır metalin (Hg, Pb, Cr, Cu, Zn veya Cd) benzer konsantrasyonlarına maruz kalan *Allium cepa*'da GPX aktivitesinde önemli artış gözlemişler ve artan GPX aktivitesinin metal teşvikli serbest radikal oluşumunun bir sonucu olduğunu ileri sürmüşlerdir.

5. SONUÇ

Kükürt metabolizması, bitki büyüme ve gelişiminin yanı sıra birçok çevresel strese karşı oluşturulan savunmada fonksiyon görmektedir. Yapılan fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar kükürt özümlemesi, taşınımı ve metabolizması ile ilgili bazı bilgileri sağlamaktadır. Kükürt içeren bileşiklerin sentezinde rol alan birçok enzimin aktivitesi, ağır metal stresine cevap olarak teşvik edilmekte ve transgenik bitkilerde bu enzimlerin aşırı üretiminin ağır metal stresine karşı toleransı arttırdığı bilinmektedir. Kükürt içeren bileşiklerin bitkilerde ağır metallerin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynaması nedeniyle kükürt ve kükürt içeren bileşiklerin ağır metal toleransındaki rollerinin anlaşılabilmesi için transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi kapsamlı araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Rausch T., Wachter A., 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science*, 10: 503–509.
- [2] Bick J.A., Leustek T., 1998. Plant sulfur metabolism – the reduction of sulfate to sulfite. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 240–244.
- [3] Mugford S.G., Matthewman C.A., Hill L., Kopriva S., 2010. Adenosine-5'-phosphosulfate kinase is essential for *Arabidopsis* viability. *FEBS Letters*, 584: 119–123.
- [4] Hardulak L.A., Preuss M.L., Jez J.M., 2011. Sulfur Metabolism as a Support System for Plant Heavy Metal Tolerance, pp. 289–301, In: Detoxification of Heavy Metals (Eds.: Sherameti I. & Varma A.), Soil Biology, vol. 30. Springer, Berlin.
- [5] Nocito F.F., Lancilli C., Crema B., Fourcroy P., Davidian J., Sacchi G.A., 2006. Heavy metal stress and sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiology*, 141: 1138–1148.
- [6] Sun X.M., Lu B., Huang S.Q., Mehta S.K., Xu L.L., Min Z., 2007. Coordinated expression of sulfate transporters and its relation with sulfur metabolites in *Brassica napus* exposed to cadmium. *Botanical Studies*, 48: 43–54.
- [7] Schiavon M., Wirtz M., Borsa P., Quaggiotti S., Hell R., Malagoli M., 2007. Chromate differentially affects the expression of a high-affinity sulfate transporter and isoforms of components of the sulfate assimilatory pathway in *Zea mays* (L.). *Plant Biology*, 9: 662–671.
- [8] Schiavon M., Pilon-Smits E.A.H., Wirtz M., Hell R., Malagoli M., 2008. Interactions between chromium and sulfur metabolism in *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Quality*, 37: 1536–1545.

- [9] Shahbaz M., Tseng M.H., Stuver C.E.E., Koralewska A., Posthumus F.S., Venema J.H., Parmar S.P., Schat H., Hawkesford M.J., De Kok L.J., 2010. Copper exposure interferes with the regulation of the uptake, distribution and metabolism of sulfate in Chinese cabbage. *Journal of Plant Physiology*, 167: 438–446.
- [10] Herbette S., Taconnat L., Hugouvieux V., Piette L., Magniette M.L.M., Cuine S., Auroy P., Richaud P., Forestier C., Bourguignon J., Renou J.-P., Vavasseur A., Leonhardt N., 2006. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie*, 88: 1751–1765.
- [11] van de Mortel J.E., Schat H., Moerland P.D., Ver Loren van Themaat E., van der Ent S., Blankestijn H., Ghandilyan A., Tsiatsiani S., Aarts M.G., 2008. Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell and Environment*, 31: 301–324.
- [12] Na G., Salt D.E., 2011. The role of sulfur assimilation and sulfur-containing compounds in trace element homeostasis in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 72: 18–25.
- [13] Takahashi H., 2010. Regulation of sulfate transport and assimilation in plants. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 281: 129–159.
- [14] Hawkesford M.J., De Kok L.J., 2006. Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell and Environment*, 29: 382–395.
- [15] Rouached H., Secco D., Arpat A.B., 2009. Getting the most sulfate from soil: regulation of sulfate uptake transporters in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 166: 893–902.
- [16] Nocito F.F., Lancilli C., Giacomini B., Attilio-Sacchi G., 2007. Sulfur metabolism and cadmium stress in higher plants. In *Plant Stress*. Global Science Books, UK.
- [17] Takahashi H., Yamazaki M., Sasakura N., Watanabe A., Leustek T., Engler J.A., Engler G., Van Montagu M., Saito K., 1997: Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of the Sciences USA*, 94: 11102–11107.
- [18] Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y., Yamaya T., Takahashi H., 2004. Regulation of high-affinity sulfate transporters in plants: towards systematic analysis of sulfur signaling and regulation. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1843–1849.
- [19] Yoshimoto N., Takahashi H., Smith F.W., Yamaya T., Saito K., 2002. Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, 29: 465–473.
- [20] Fässler E., Plaza S., Pairraud A., 2011. Expression of selected genes involved in cadmium detoxification in tobacco plants grown on a sulphur-amended metal-contaminated field. *Environmental and Experimental Botany*, 70: 158–165.
- [21] Lindblom S.D., Abdel-Ghany S.E., Hanson B.R., Hwang S., Terry N., Pilon-Smits E.A.H., 2006. Constitutive expression of a high-affinity sulfate transporter in *Brassica juncea* affects metal tolerance and accumulation. *Journal of Environmental Quality*, 35: 726–733.

- [22] Shahbaz M., Parmar S., 2013. Copper toxicity and sulfur metabolism in Chinese cabbage are affected by UV radiation. *Environmental and Experimental Botany*, 88: 60–70.
- [23] Kataoka, T., Watanabe-Takahashi A., Hayashi N., Ohnishi M., Mimura T., Buchner P., Hawkesford M.J., Yamaya T., Takahashi H., 2004. Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 2693-2704.
- [24] Heiss S., Schafer H.J., Haag-Kerwer A., Rausch T., 1999. Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transport and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. *Plant Molecular Biology*, 39: 847–857.
- [25] Schiavon M., Galla G., Wirtz M., Pilon-Smits E.A.H., Telatin V., Quaggiotti S., Hell R., Barcaccia G., Malagoli M., 2012. Transcriptome profiling of genes differentially modulated by sulfur and chromium identifies potential targets for phytoremediation and reveals a complex S-Cr interplay. *Journal of Hazardous Materials*, 239-240: 191–205.
- [26] Buchner P., Stuiver C.E., Westerman S., Wirtz M., Hell R., Hawkesford M.J., De Kok L.J., 2004. Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulfate nutrition. *Plant Physiology*, 136: 3396–3408.
- [27] Koralewska A., Buchner P., Stuiver C.E.E., Posthumus F.S., Kopriva S., Hawkesford M.J., De Kok L.J., 2009. Expression and activity of sulfate transporters and APS reductase in curly kale in response to sulfate deprivation and re-supply. *Journal of Plant Physiology*, 166: 168–179.
- [28] Stuiver C.E.E., Koralewska A., Posthumus F.S., De Kok L.J., 2009. Impact of Sulfur Deprivation on Root Formation and Activity and Expression of Sulfate Transporters in Chinese Cabbage, pp. 89–92, In: *Sulfur Metabolism in Plants: Regulatory Aspects, Significance of Sulfur in the Food Chain, Agriculture and the Environment*, (Eds.: Sirko A., De Kok L.J., Haneklaus S., Hawkesford M.J., Rennenberg H., Saito K., Schnug E. & Stulen I.), Margraf Publishers, Weikersheim.
- [29] Shinmachi F., Buchner P., Stroud J.L., Parmar S., Zhao F.J., McGrath S.P., Hawkesford M.J., 2010. Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat. *Plant Physiology*, 153: 327–336.
- [30] Leustek T., Murillo M., Cervantes M., 1994. Cloning of a cDNA encoding ATP sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* by functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology*, 105: 897–902.
- [31] Bick J.A., Aslund F., Chen Y., Leustek T., 1998. Glutaredoxin function for the carboxyl-terminal domain of the plant-type 5'-adenylylsulfate reductase. *Proceedings of the National Academy of the Sciences USA*, 95: 8404–8409.
- [32] Khan N.A., Anjum N.A., Nazar R., Iqbal N., 2009. Increased activity of ATP-sulfurylase and increased contents of cysteine and glutathione reduce high cadmium-induced oxidative stress in mustard cultivar with high photosynthetic potential. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56: 670–677.

- [33] Harada E., Yamaguchi Y., Koizumi N., Hiroshi S., 2002. Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 159: 445–448.
- [34] Roth U., von Roepenack-Lahaye E., Clemens S., 2006. Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd^{2+} . *Journal of Experimental Botany*, 57: 4003–4013.
- [35] Sarry J.E., Kuhn L., Ducruix C., Lafaye A., Junot C., Hugouvieux V., Jourdain A., Bastien O., Fievet J.B., Vailhen D., Amekraz B., Moulin C., Ezan E., Garin J., Bourguignon J., 2006. The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics*, 6: 2180–2198.
- [36] Yamaguchi H., Fukuoka H., Arai T., Ohshima A., Nunome T., Miyatake K., Negoro S., 2010. Gene expression analysis in cadmium-stressed roots of a low cadmium- accumulating solanaceous plant, *Solanum torvum*. *Journal of Experimental Botany*, 61: 423–437.
- [37] Bashir H., Ahmad J., Bagheri R., Nauman M., Qureshi M.I., 2013. Limited sulfur resource forces *Arabidopsis thaliana* to shift towards non-sulfur tolerance under cadmium stress. *Environmental and Experimental Botany*, 94: 19–32.
- [38] Bennett L.E., Burkhead J.L., Hale K.L., Terry N., Pilon M., Pilon-Smits E.A.H., 2003. Analysis of transgenic Indian mustard plants for phytoremediation of metal-contaminated mine tailings. *Journal of Environmental Quality*, 32: 432–440.
- [39] Wangeline A.L., Burkhead J.L., Hale K.L., Lindblom S.D., Terry N., Pilon M., Pilon-Smits E.A.H., 2004. Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard: effects on tolerance and accumulation of twelve metals. *Journal Environmental of Quality*, 33: 54–60.
- [40] Suter M., von Ballmoos P., Kopriva S., den Camp R.O., Schaller J., Kuhlemeier C., Schürmann P., Brunold C., 2000. Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 5'-phosphosulfate reductase are identical enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 930–936.
- [41] Kopriva S., 2006. Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Annals of Botany*, 97: 479–495.
- [42] Kopriva S., Koprivova A., 2004. Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1775–1783.
- [43] Sors T.G., Ellis D.R., Na G.N., Lahner B., Lee S., Leustek T., Pickering I.J., Salt D.E., 2005. Analysis of sulfur and selenium assimilation in *Astragalus* plants with varying capacities to accumulate selenium. *The Plant Journal*, 42: 785–797.
- [44] Nakayama M., Akashi T., Hase T., 2000. Plant sulfite reductase: molecular structure, catalytic function and interaction with ferredoxin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 82: 27–32.
- [45] Khan M.S., Haas F.H., Samami A.A., Gholami A.M., Bauer A., Fellenberg K., Reichelt M., Hansch R., Mendel R.R., Meyer A.J., Wirtz M., Hell R., 2010. Sulfite reductase defines a newly discovered bottleneck for assimilatory sulfate reduction and is essential for growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 22: 1216–1231.

- [46] Leustek T., Martin M.N., Bick J.A., Davies J.P., 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.
- [47] Saito K., 2004. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology*, 136: 2443–2450.
- [48] Yi H., Galant A., Ravilious G.E., Preuss M.L., Jez J.M., 2010. Sensing sulfur conditions: simple to complex biochemical regulatory mechanisms in plant thiol metabolism. *Molecular Plant*, 3: 269–279.
- [49] Inoue K., Noji M., Saito K., 1999. Determination of the sites required for the allosteric inhibition of serine acetyltransferase by L-cysteine in plants. *European Journal of Biochemistry*, 266: 220–227.
- [50] Feldman-Salit A., Wirtz M., Hell R., Wade R.C., 2009. A mechanistic model of the cysteine synthase complex. *Journal of Molecular Biology*, 386: 37–59.
- [51] Freeman J.L., Salt D.E., 2007. The metal tolerance profile of *Thlaspi goesingense* is mimicked in *Arabidopsis thaliana* heterologously expressing serine acetyl-transferase. *BMC Plant Biology*, 7: 63.
- [52] Howarth J.R., Dominguez-Solis J.R., Gutierrez-Alcala G., Wray J.L., Romero L.C., Gotor C., 2003. The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium. *Plant Molecular Biology*, 51: 589–598.
- [53] Freeman J.L., Persans M.W., Nieman K., Albrecht C., Peer W., Pickering I.J., Salt D.E., 2004. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in thlaspi nickel hyperaccumulators. *Plant Cell*, 16: 2176–2191.
- [54] Lokhande V.H., Srivastava S., Patade V.Y., Dwivedi S., Tripathi R.D., Nikam T.D., Suprasann P., 2011. Investigation of arsenic accumulation and tolerance potential of *Sesuvium portulacastrum* (L.) L. *Chemosphere*, 82: 529–534.
- [55] Dominguez-Solis J.R., Gutierrez-Alcala G., Vega J.M., Romero L.C., Gotor C., 2001. The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 9297–9302.
- [56] Ahsan N., Lee D.G., Alam I., Kim P.J., Lee J.J., Ahn Y.O., Kwak S.S., Lee I.J., Bahk J.D., Kang K.Y., Renaut J., Komatsu S., Lee B.H., 2008. Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics*, 8: 3561–3576.
- [57] Yang Q., Wang Y., Zhang J., Shi W., Qian C., Peng X., 2007. Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. *Proteomics*, 7: 737–749.
- [58] Kawashima C.G., Noji M., Nakamura M., Ogra Y., Suzuki K.T., Saito K., 2004. Heavy metal tolerance of transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase. *Biotechnology Letters*, 26: 153–157.

- [59] Harada E., Choi E.Y., Tsuchisaka A., Obata H., Sano H., 2001. Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *Journal of Plant Physiology*, 158: 655–661.
- [60] Dominguez-Solís J.R., López-Martín M.C., Ager F.J., Ynsa M.D., Romero L.C., Gotor C., 2004. Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal*, 2: 469–476.
- [61] Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C.H., 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell and Environment*, 35: 454–484.
- [62] Cobbett C., Goldsbrough P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 159–182.
- [63] Rausch T., Gromes R., Liedschulte V., Müller I., Bogs J., Galovic V., Wachter A., 2007. Novel insight into the regulation of GSH biosynthesis in higher plants. *Plant Biology*, 9: 565–572.
- [64] Cairns N.G., Pasternak M., Wachter A., Cobbett C.S., Meyer A.J., 2006. Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiology*, 141: 446–455.
- [65] Pasternak M., Lim B., Wirtz M., Hell R., Cobbett C.S., Meyer A.J., 2008. Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *The Plant Journal*, 53: 999–1012.
- [66] Sobrino-Plata J., Meyssen D., Cuypers A., Escobar C., Hernández L.E., 2014. Glutathione is a key antioxidant metabolite to cope with mercury and cadmium stress. *Plant and Soil*, DOI 10.1007/s11104-013-2006-4.
- [67] Li Y., Dankher O.P., Carreira L., Smith A.P., Meagher R.B., 2006. The shoot-specific expression of gamma-glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic. *Plant Physiology*, 141: 288–298.
- [68] Reisinger S., Schiavon M., Terry N., Pilon-Smits E.A.H., 2008. Heavy metal tolerance and accumulation in Indian Mustard (*Brassica juncea* L.) expressing bacterial γ -glutamylcysteine synthetase or glutathione synthetase. *International Journal of Phytoremediation*, 10: 440–454.
- [69] Ivanova L.A., Ronzhina D.A., Ivanov L.A., Stroukova L.V., Peuke A.D., Rennenberg H., 2011. Over-expression of *gsh1* in the cytosol affects the photosynthetic apparatus and improves the performance of transgenic poplars on heavy metal-contaminated soil. *Plant Biology*, 13: 649–59.
- [70] Li Y., Dhankher O.P., Carreira L., Balish R.S., Meagher R.B., 2005. Arsenic and mercury tolerance and cadmium sensitivity in *Arabidopsis* plants expressing bacterial gamma-glutamylcysteine synthetase. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24: 1376–1386.
- [71] Foyer C.H., Noctor G., 2011. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 155: 2–18.
- [72] Skorzynska-Polit E., Drazkiewicz, M., Krupa, Z., 2010. Lipid peroxidation and antioxidative response in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium and copper. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 169–175.

- [73] Dixit P., Mukherjee P.K., Ramachandran V., Eapen S., 2011. Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum*. *PLoS ONE* 6(1): e16360.
- [74] Kumar S., Asif M.H., Chakrabarty D., Tripathi R.D., Dubey R.S., Trivedi P.K., 2013. Expression of a rice Lambda class of glutathione S-transferase, *OsGSTL2*, in *Arabidopsis* provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses. *Journal of Hazardous Materials*, 248-249: 228–237.
- [75] Meyer A.J., Hell R., 2005. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Research*, 86: 435–457.
- [76] Szalai G., Kellos T., Galiba G., Kocsy G., 2009. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28: 66–80.
- [77] Millar A.H., Mittova V., Kiddle G., 2003. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology*, 133: 443–447.
- [78] Kataya A.M.R., Reumann S., 2010. *Arabidopsis* glutathione reductase 1 is dually targeted to peroxisomes and the cytosol. *Plant Signaling and Behavior*, 5: 171–175.
- [79] Gill S.S., Tuteja N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, , 48: 909–930.
- [80] Tzafirir I., Pena-Muralla R., Dickerman A., Berg M., Rogers R., Hutchens S., Sweeney T.C., McElver J., Aux G., Patton D., Meinke D., 2004. Identification of genes required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 135: 1206–1220.
- [81] Mhamdi A., Hager J., Chaouch S., Queval G., Han Y., Taconnat L., Saïndrenan P., Gouia H., Issakidis-Bourguet E., Renou J.P., Noctor G., 2010. *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE 1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular H₂O₂ and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiology*, 153: 1144–1160.
- [82] Anjum N.A., Umar S., Chan M.-T., 2010. Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- [83] Diwan H., Khan I., Ahmad A., Iqbal M., 2010. Induction of phytochelatins and antioxidant defence system in *Brassica juncea* and *Vigna radiata* in response to chromium treatments. *Plant Growth Regulation*, 61: 97–107.
- [84] Milla M.A.R., Maurer A., Rodriguez H.A., Gustafson J.P., 2003. Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *The Plant Journal*, 36: 602–615.
- [85] Chang C.C., Slesak I., Jorda L., Sotnikov A., Melzer M., Miszalski Z., Mullineaux P.M., Parker J.E., Karpinska B., Karpinski S., 2009. *Arabidopsis* chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses. *Plant Physiology*, 150: 670–683.
- [86] Srivastava S., D'Souza S.F., 2010. Effect of variable sulfur supply on arsenic tolerance and antioxidant responses in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 1314–1322.

- [87] Fatima R.A., Ahmad M., 2005. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of Total Environment*, 346: 256–273.

