

KATARZYNA KABALA, JUSTYNA ŻEBROWSKA, DOROTA GARBERA

*Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin  
Instytut Biologii Eksperymentalnej  
Uniwersytet Wrocławski  
Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław  
E-mail: katarzyna.kabala@uwr.edu.pl*

## SIARKOWODÓR JAKO CZĄSTECZKA REGULATOROWA W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

### WSTĘP

Siarkowodór ( $H_2S$ ) jest bezbarwnym, łatwopalnym gazem o doskonale rozpoznawalnym zapachu zgniłych jaj, kojarzonym zwykle z toksycznym, przypominającym wpływ cyjanowodoru, oddziaływaniem na organizmy żywe (JIN i PEI 2015). Przez człowieka wchłaniany jest z otoczenia drogami oddechowymi i przez skórę, w dużych stężeniach powodując utratę przytomności, a nawet śmierć na skutek niedoboru tlenu w tkankach i narządach. Siarkowodór blokuje aktywność oksydazy cytochromowej w mitochondriach, prowadząc do zaburzeń w wytwarzaniu energii w komórkach (TADEUSIEWICZ i OLAS 2014).

Siarkowodór budową przypomina cząsteczkę wody, dzięki czemu jest w stanie przenikać przez błony biologiczne w sposób podobny do  $H_2O$ , a jego hydrofilowy charakter dodatkowo zwiększa zdolność do przechodzenia przez dwuwarstwą lipidową (WANG 2012, LI 2013). Z chemicznego punktu widzenia  $H_2S$  zachowuje się jak słaby kwas. W warunkach fizjologicznych, przy pH 7,4, jedna trzecia puli siarkowodoru występuje w formie niezdysoncjowanej, a pozostała część dysoncuje do  $H^+$  i  $HS^-$ .  $HS^-$  może dalej ulegać przemianom do  $H^+$  i  $S^{2-}$  (KABIL i BANERJEE 2010).

$H_2S$  od dawna znany jest jako silna fitotoksyna, oddziałująca negatywnie na wzrost i rozwój roślin. Toksyczność  $H_2S$  zależy od jego stężenia i nasila się w warunkach stresowych. Wysokie dawki (w zakresie milimolarnym) aplikowane roślinom mogą powodować m.in. zmiany nekrotyczne liści i ich

utratę, zahamowanie aktywności enzymów oraz spadek pobierania związków mineralnych, np. fosforu (LISJAK i współaut. 2013). Stosunkowo niedawno natomiast zaobserwowano, że w niższych stężeniach  $H_2S$  działa jako cząsteczka aktywna biologicznie, wywołująca pozytywne efekty zarówno na procesy wzrostowe roślin, jak i na łagodzenie skutków wywołanych przez czynniki stresowe (HANCOCK i współaut. 2011). Niskie dawki  $H_2S$  stymulują wzrost roślin, zwiększają ich świeżą masę, pobudzają kiełkowanie nasion i powiększanie blaszki liściowej, co sugeruje ogromny potencjał wykorzystania siarkowodoru w rolnictwie (FILIPOVIC i JOVANOVIC 2017). Badania ostatnich lat podkreślają rolę  $H_2S$  jako sygnału, pełniącego podobną funkcję do dwóch znanych gazotransmiterów, tlenku azotu (NO) i tlenku węgla (CO), zarówno u zwierząt, jak i u roślin (WANG 2002, PAE i współaut. 2009, LISJAK i współaut. 2013).

Badania farmakologiczne prowadzone u ssaków z wykorzystaniem donorów siarkowodoru wykazały istotną rolę tej cząsteczki w funkcjonowaniu układu nerwowego i krwionośnego, poprzez modulowanie aktywności receptorów kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA) i wrażliwych na ATP kanałów potasowych ( $K_{ATP}$ ). Stwierdzono ponadto, że  $H_2S$  zdolny jest hamować lub stymulować jądrową translokację czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B, uczestniczących w odpowiedzi komórkowej na bodźce zewnętrzne, a także modyfikować aktywność wielu kinaz białkowych (LI i współaut. 2011, KIMURA 2012, TADEUSIEWICZ i OLAS 2014).

**Słowa kluczowe:** desulfhydrasy, siarkowodór, stres abiotyczny, S-sulhydracja, transdukcja sygnału

## REGULACJA POZIOMU SIARKOWODORU W KOMÓRKACH

W środowisku naturalnym siarkowodor powstaje w wyniku aktywności wulkanicznej i podczas rozkładu substancji organicznych, uwalniany jest z przybrzeżnych osadów morskich. Jego powstawanie jest często efektem działalności człowieka, związanej z funkcjonowaniem oczyszczalni ścieków i elektrowni geotermalnych, rolnictwem czy emisją spalin samochodowych. Obecny w środowisku  $H_2S$  może być pobierany zarówno przez części nadziemne roślin, jak i korzenie. Jednak aby cząsteczka ta mogła pełnić funkcję wtórnego przekazywacza, w komórkach żywych organizmów musi istnieć endogenne systemy odpowiedzialne za jej biosyntezę i rozkład (WANG 2002, LISJAK i współaut. 2013).

Liczne badania przeprowadzone u ssaków wykazały, że  $H_2S$  może być generowany przez wiele typów komórek, a jego endogenna zawartość jest znacznie niższa od stężeń wywołujących efekty toksyczne. W komórkach zwierzęcych zidentyfikowano trzy enzymy odpowiedzialne za produkcję  $H_2S$ . Należą do nich:  $\beta$ -syntaza cystationiny (CBS) i  $\gamma$ -liaza cystationiny (CSE), uczestniczące w metabolizmie cysteiny i homocysteiny, oraz transferaza siarkowa 3-merkaptopirogronianu (3-MST), wykorzystująca 3-merkaptopirogronian jako substrat (WANG 2012, KOLLURU i współaut. 2013). Dodatkowo, w organizmach zwierzęcych funkcjonuje nieenzymatyczny szlak generowania siarkowodoru. Obejmuje on między innymi bezpośrednią redukcję glutationu i siarki elementarnej do  $H_2S$ , która zachodzi w obecności związków redukujących, NADH lub NADPH. Powstały tą drogą siarkowodor stanowi jednak niewielką część całkowitego endogennego poziomu  $H_2S$  (WANG 2002, KIMURA 2012).

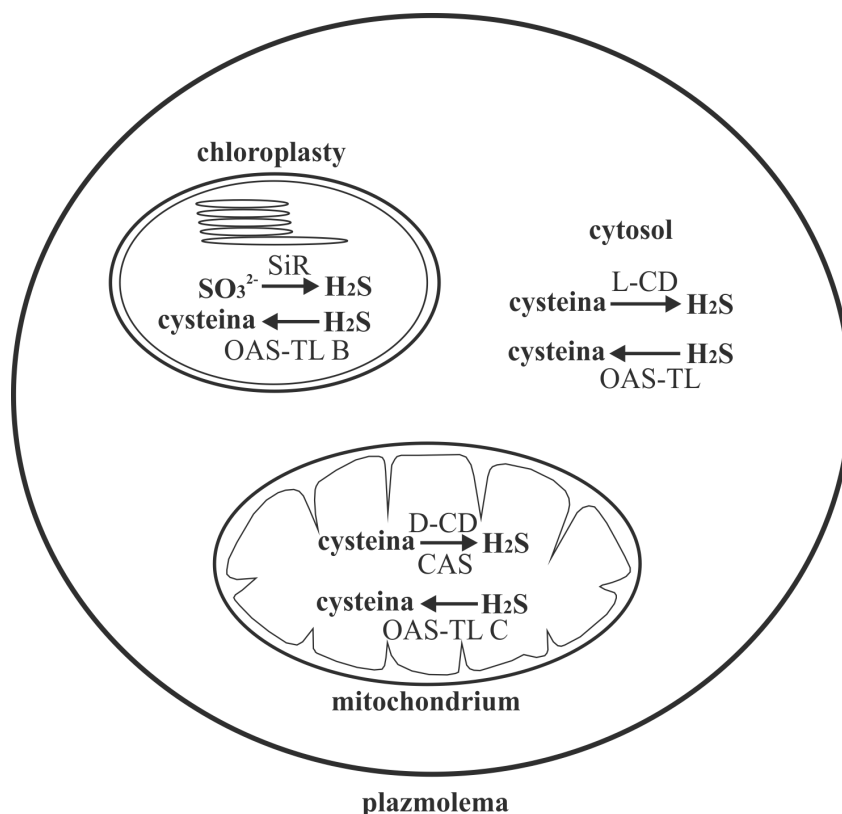
W komórkach zwierzęcych funkcjonują dwa szlaki metaboliczne, których rolą jest obniżanie zawartości siarkowodoru. Pierwszy z nich, zachodzący głównie w mitochondriach, polega na utlenieniu  $H_2S$  do tiosiarczanu. Reakcja katalizowana jest przez oksydoreduktazę chinonową. Tiosiarczan dalej ulega przemianom prowadzącym do powstania siarczanów. Drugi mechanizm polega na metylacji  $H_2S$  i powstaniu siarczku dimetylu. Reakcja ta zachodzi dzięki S-metylotransferazie tiolowej na terenie cytoplazmy (KIMURA 2012, TADEUSIEWICZ i OLAS 2014).

Poprzez analogię do komórek zwierzęcych odkryto, że wytwarzanie  $H_2S$  przez komórki roślinne w dużej mierze związane jest również z metabolizmem cysteiny. Jednak w przeciwieństwie do zwierząt, nie potwierdzono dotąd możliwości biosyntezy  $H_2S$  u roślin na drodze nieenzymatycznej. Badania ostat-

nich lat dowiodły, że za biosyntezę siarkowodoru odpowiedzialne są głównie desulfhydrazy, czyli enzymy uczestniczące w degradacji cysteiny (LISJAK i współaut. 2013). Desulfhydrazy są białkami zależnymi od 5'-fosforanu pirydoksalu (PLP), aktywnej formy pochodnej witaminy B6, stanowiącej grupę prostetyczną enzymów zaangażowanych w metabolizm aminokwasów (PAPENBROCK i współaut. 2007). Wykazano, że poziom aktywności desulfhydraz uczestniczących w produkcji siarkowodoru może ulegać modyfikacjom w zależności od stanu rozwojowego roślin i zmieniających się warunków środowiskowych (LISJAK i współaut. 2013).

Rośliny posiadają dwa rodzaje desulfhydraz, korzystających z różnych izomerów cysteiny jako substratów. Desulfhydraz L-cysteiny (L-CD) jest odpowiednikiem zwierzęcego enzymu CSE. Katalizuje ona reakcję degradacji L-cysteiny do pirogronianu, amoniaku i  $H_2S$ , powstających w stosunku 1:1:1 (BURANDT i współaut. 2002, SCHMIDT 2005). Desulfhydraz D-cysteiny (D-CD) jest drugim po L-CD enzymem odpowiedzialnym za generowanie  $H_2S$  u roślin. W wyniku reakcji katalizowanej przez D-CD powstają takie same produkty, jednak substratem w reakcji jest D-cysteina (PAPENBROCK i współaut. 2007). Aktywność obu desulfhydraz można łatwo oddzielić od siebie, ponieważ oprócz wykorzystywania różnych substratów, wykazują one odmienne optimum pH reakcji (dla D-CD pH 8,0, a w przypadku L-CD pH 9,0) oraz różną wrażliwość na inhibitory (kwas aminooctowy, AOA i hydroksyloaminę, HA). Aktywność enzymów z grupy desulfhydraz stwierdzono u różnych gatunków roślin głównie na terenie cytoplazmy, a także w mitochondriach (Ryc. 1) (RIEMENSCHNEIDER i współaut. 2005, WANG 2012, LI 2013, LISJAK i współaut. 2013). U *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano gen *des1*, a następnie wyizolowano białko DES1 odpowiedzialne za reakcję desulfhydracji L-cysteiny i generowanie  $H_2S$  w cytoplazmie (ÁLVAREZ i współaut. 2010). Jest to dotąd jedyna desulfhydraz scharakteryzowana na poziomie molekularnym. Mutanty *des1 Arabidopsis* stanowią cenne narzędzie wykorzystywane w badaniach szlaków sygnałowych z udziałem  $H_2S$ .

W komórkach roślinnych  $H_2S$  może powstawać ponadto w wyniku reakcji katalizowanych przez reduktazę siarczynową (SiR) oraz syntazę  $\beta$ -cyjanoalaniny (CAS). SiR uczestniczy w procesie asymilacji siarczanów odbywającym się na terenie chloroplastów. Enzym ten odpowiedzialny jest za redukcję siarczynów do  $H_2S$  w obecności zredukowanej ferredoksyny jako donora elektronów. CAS funkcjonuje wewnątrz mitochondriów, gdzie przekształca cysteinę i cyjanek do  $H_2S$



Ryc. 1. Systemy enzymatyczne, zaangażowane w homeostazę H<sub>2</sub>S w komórkach roślinnych.

Poziom siarkowodoru regulowany jest przez aktywność desulfhidazy L-cysteiny (L-CD), desulfhidazy D-cysteiny (D-CD), reduktazy siarczynowej (SiR), syntazy β-cyjanoalaniny (CAS) oraz liaz *O*-acetyloserynowo-tiolowych (OAS-TL A, B i C).

i β-cyjanoalaniny (Ryc. 1) (PAPENBROCK i współaut. 2007, LI 2013). Pomimo posiadania przez rośliny endogennego źródła siarkowodoru w chloroplastach i mitochondriach, obecnie uważa się, że to aktywność desulfhidaz w cytoplazmie i cytosolowa pula H<sub>2</sub>S decydują o jego funkcji jako cząsteczki sygnałowej. H<sub>2</sub>S powstający w obrębie chloroplastów i mitochondriów prawdopodobnie nie dyfunduje do cytoplazmy, m.in. ze względu na zasadowe pH panujące w tych kompartmentach (ROMERO i współaut. 2014).

Aktywny poziom H<sub>2</sub>S w komórkach jest wynikiem nie tylko biosyntezy, ale też przemian metabolicznych. W tkankach roślinnych w procesy degradacji siarkowodoru, czyli obniżanie jego endogennego poziomu, zaangażowane są liazы *O*-acetyloserynowo-tiolowe (OAS-TL). Stanowią one ostatni enzym w szlaku asymilacji siarczanów, uczestniczący w biosyntezie cysteiny. OAS-TL katalizują reakcję włączania H<sub>2</sub>S do *O*-acetylo-L-seryny (OAS), czemu towarzyszy wytworzenie L-cysteiny i octanu. U *A. thaliana* zidentyfikowano trzy izoformy tego enzymu, które różnią się lokalizacją w komórce. OAS-TL A zlokalizowane są w cytoplazmie, podczas gdy OAS-TL B i OAS-TL C

występują odpowiednio na terenie plastydów i mitochondriów (Ryc. 1) (BURANDT i współaut. 2002). Poszczególne izoformy różnią się między sobą właściwościami katalitycznymi, głównie powinowactwem do substratów, czyli H<sub>2</sub>S i OAS (SCHMIDT 2005). ÁLVAREZ i współaut. (2010) zaproponowali, że w komórkach *Arabidopsis* uwalnianie H<sub>2</sub>S i jego degradacja w cytosolu (związane z rozkładem i biosyntezą cysteiny) koordynowane jest przez aktywność DES1 i OAS-TL A1.

W badaniach dotyczących roli siarkowodoru w komórkach roślinnych wykorzystywane są egzogenne generatory tej cząsteczki. Podobnie jak u zwierząt, najczęściej stosowanym donorem H<sub>2</sub>S jest wodorosiarczek sodu (NaHS), łatwo i szybko dysocjujący, który generuje krótkotrwały, silny impuls H<sub>2</sub>S. W ostatnich latach natomiast zwrócono uwagę na alternatywne związki, stosowane głównie w badaniach biomedycznych. Należy do nich GYY4137 (morpholin-4-ium-4-methoxyphenyl (morpholino) phosphinodithioate), odpowiedziany za powolne uwalnianie mniejszych dawek H<sub>2</sub>S, co lepiej odzwierciedla warunki fizjologiczne panujące w komórkach (LISJAK i współaut. 2013).

## MOLEKULARNY MECHANIZM DZIAŁANIA SIARKOWODORU

W wyniku badań przeprowadzonych na komórkach ssaczych zaproponowano, że głównym mechanizmem działania  $H_2S$ , decydującym o jego roli jako cząsteczki sygnałowej, jest potranslacyjna modyfikacja reaktywnych reszt cysteiny w białkach, nazwana S-sulfhydracją. Siarkowodor przekształca grupy tiolowe (-SH) do mostków nadsiarczkowych (-SSH), prowadząc do zmian funkcjonalnych białek, analogicznie do reakcji S-nitrozylacji wywoływanej przez NO czy innych oksydacyjnych modyfikacji reszt cysteiny, jak S-glutationylacja (YANG 2014). Efektem S-sulfhydracji białek są zmiany ich aktywności enzymatycznych, struktury i subkomórkowej lokalizacji. W komórkach zwierzęcych wykazano, że S-sulfhydracja może zarówno aktywować, jak i hamować działanie enzymów (MUSTAFA i współaut. 2009). MÓDIS i współaut. (2016) dowiedli, że  $H_2S$  indukuje sulfhydrację dwóch reszt cysteiny w podjednostce  $\alpha$  syntazy ATP. Ta modyfikacja odpowiedzialna jest za utrzymywanie enzymu w stanie fizjologicznie aktywnym i funkcje energetyczne mitochondriów.

Stosunkowo niedawno potwierdzono, że S-sulfhydracja w podobny sposób odwracalnie reguluje funkcjonowanie białek roślinnych (AROCA i współaut. 2015, 2017). Badania przeprowadzone przez AROCA i współaut. (2017) ujawniły, że co najmniej 5% całego proteomu *Arabidopsis* podlega S-sulfhydracji. Na podstawie analiz jakościowych stwierdzono, że S-sulfhydracja jest istotnym elementem wielu podstawowych roślinnych szlaków metabolicznych, jak glikoliza, cykl kwasów trójkarboksylowych, cykl Calvina czy biosynteza skrobi. Mutanty *des1 Arabidopsis* wykazują obniżony poziom sulfhydracji wielu białek. Przykładem są receptory kwasu abscysynowego (ABA) (AROCA i współaut. 2017). Sugeruje to ważną rolę  $H_2S$  i indukowanych przez niego modyfikacji w procesach wzrostu i rozwoju roślin.

Obecnie uważa się, że  $H_2S$  nie może reagować bezpośrednio z grupami -SH, a sulfhydracja białek jest mechanizmem odpowiedzialnym za redukcję utlenionych reszt cysteiny (FILIPOVIC i JOVANOVIĆ 2017). Takie działanie siarkowodoru zwiększa zdolności antyoksydacyjne cysteiny. W wyniku wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) grupy tiolowe białek są utleniane tworząc kwas sulfenowy (-SOH), który może reagować z  $H_2S$ . Powstały nadsiarczek (-SSH) zapobiega dalszym nieodwracalnym przemianom oksydacyjnym reszt cysteiny do kwasu sulfinowego (-SO<sub>2</sub>H) i sulfonowego (-SO<sub>3</sub>H) (FILIPOVIC i JOVANOVIĆ 2017). Badania wy-

kazały, że reakcja kwasu sulfenowego z  $H_2S$  przebiega 600 razy szybciej od reakcji z glutationem (CUEVASANTA i współaut. 2015), a wzrost S-sulfhydracji białek pojawia się w odpowiedzi na stres wywołany przez  $H_2O_2$  (WEDMANN i współaut. 2016). Mostki nadsiarczkowe mogą w łatwy sposób ulegać redukcji do grup tiolowych przez działanie tioredoksyn, dzięki czemu związany  $H_2S$  jest uwalniany i może ponownie zostać wykorzystany przez komórkę (WEDMANN i współaut. 2016). Powyższe dane jasno wskazują na ważną rolę siarkowodoru w procesach antyoksydacyjnych i w regulacji stanu redoks reszt cysteiny białek, istotnych w wielu szlakach biochemicznych.

## FUNKCJE SIARKOWODORU W ROŚLINACH

### REGULACJA PROCESÓW WZROSTU I ROZWOJU ROŚLIN PRZEZ $H_2S$

Siarkowodor zaangażowany jest w wiele procesów fizjologicznych zachodzących w roślinach. Wykazano, że odgrywa on ważną rolę w ruchach aparatów szparkowych i fotosyntezie, uczestniczy w regulacji kiełkowania nasion, organogenezy i starzenia roślin (LI i współaut. 2013).

Coraz liczniejsze prace potwierdzają udział siarkowodoru w mechanizmach kontrolujących stan otwarcia aparatów szparkowych, co wiąże się z jego oddziaływaniem z innymi cząsteczkami zaangażowanymi w ten proces (LI 2013). Należy jednak podkreślić, że badania te dostarczają różnych, często przeciwstawnych wyników. Wykazano, że u *A. thaliana* i *Capsicum annuum*  $H_2S$  pobudza otwieranie aparatów szparkowych na świetle i zapobiega ich zamykaniu w ciemności, zmniejszając akumulację NO w komórkach szparkowych. Większość badań natomiast, przeprowadzonych na *A. thaliana*, *Vicia faba* i *Impatiens walleriana*, dowiodło, że  $H_2S$  powoduje zamykanie aparatów szparkowych, uczestnicząc w ścieżce sygnałowej indukowanej przez kwas abscysynowy, co ma szczególne znaczenie w warunkach suszy i zapobiega odwodnieniu tkanek. Wykazano ponadto, że siarkowodor jest istotnym elementem szlaku odpowiedzialnego za zamykanie szparek w odpowiedzi na etylen (GARCÍA-MATA i LAMATTINA 2013, JIN i PEI 2016).  $H_2S$  zdolny jest indukować produkcję  $H_2O_2$  w komórkach szparkowych, głównie przez stymulację oksydazy NADPH, prowadząc do zamykania szparek (LI 2013). Najnowsze badania podkreślają rolę  $H_2S$  w regulacji aktywności kanałów jonowych funkcjonujących w komórkach szparkowych, w tym kanałów wapniowych, potasowych i anionowych, su-

gerując, że siarkowodór uczestniczy w zamykaniu szparek poprzez modulowanie przepływu jonów. Stwierdzono także, że  $H_2S$  aktywuje ekspresję genów i stopień fosforylacji plazmolekowej pompy protonowej, kontrolując w ten sposób aktywność antyportera  $Na^+/H^+$  i utrzymując odpowiedni stosunek  $K^+/Na^+$  w odpowiedzi na stres solny (JIN i PEI 2016). Potwierdza to, że siarkowodór spełnia ważną rolę w regulacji ruchów szparek podczas zmieniających się warunków środowiskowych.

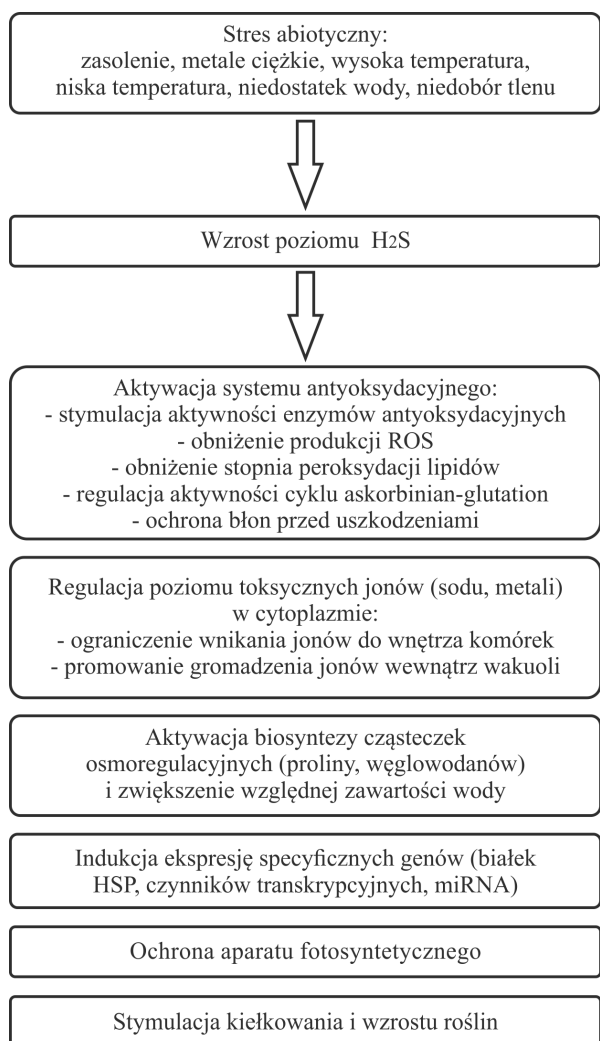
Fotosynteza jest jednym z najważniejszych procesów zachodzących w komórkach roślinnych, a jej efektywność zależy od wielu czynników, w tym także od funkcjonowania aparatów szparkowych. Egzogenny  $H_2S$  może podnosić wydajność fotosyntezy poprzez zwiększanie światła szparek oraz wzrost ich zagęszczenia, obniżając jednocześnie intensywność fotorespiracji (DUAN i współaut. 2015). Obserwuje się ponadto podwyższoną zawartość chlorofilu w liściach i zwiększoną liczbę gran w chloroplastach.  $H_2S$  stymuluje ekspresję genów i aktywność Rubisco, a także podnosi poziom białka dużej podjednostki enzymu, ponadto aktywuje transkrypcję genów kodujących ferredoksynę i tioredoksyny, w efekcie prowadząc do wzrostu parametrów zarówno fazy jasnej i fazy ciemnej fotosyntezy (CHEN i współaut. 2011). Wyniki wskazują, że  $H_2S$  odgrywa istotną rolę w regulacji fotosyntezy, częściowo poprzez modulowanie ekspresji genów istotnych dla tego procesu i modyfikacje oksydoredukcyjne.

Intensywnie prowadzone w ostatnich latach badania wskazują, że  $H_2S$  wymagany jest na różnych etapach wzrostu i rozwoju roślin. Traktowanie niskimi dawkami siarkowodoru stymuluje kiełkowanie nasion i wzrost siewek różnych gatunków roślin, zwiększając biomasa korzeni, łodyg i liści. Wyniki tych badań sugerują, że obserwowany efekt związany jest z uruchamianiem przez  $H_2S$  mechanizmów kontrolujących podziały komórkowe, a nie z powiększaniem rozmiarów poszczególnych komórek (DOOLEY i współaut. 2013). Zaobserwowano, że korzystny wpływ  $H_2S$  na wydajność kiełkowania skorelowany jest ze wzmożoną aktywnością amylazy i enzymów antyoksydacyjnych, a w konsekwencji z obniżonym poziomem peroksydacji lipidów i spadkiem zawartości  $H_2O_2$ . Siarkowodór promuje kiełkowanie nasion zarówno w warunkach kontrolnych, optymalnych dla tego procesu, jak i stresowych, np. pod wpływem metali ciężkich i zasolenia (LI i współaut. 2013, JIN i PEI 2015).

Organogeneza podlega regulacji przez wiele czynników zarówno środowiskowych, jak i endogennych, z których najlepiej poznanymi są fitohormony. W proces powsta-

wania korzeni zaangażowane są głównie auksyny (IAA), odpowiedzialne za tworzenie nowego merystemu apikalnego. Stosunkowo niedawno odkryto, że siarkowodór zdolny jest indukować powstawanie korzeni przybyszowych i korzeni bocznych, i stanowi kolejny istotny element ścieżki sygnałowej, w której uczestniczą auksyny i NO (ZHANG i współaut. 2009). Wykazano, że  $H_2S$  modyfikuje polarny transport auksyn i ich dystrybucję w sposób zależny od cytoszkieletu (F-aktyny), co prowadzi do zmian rozwojowych w korzeniach (JIA i współaut. 2015). Ponadto  $H_2S$ , podobnie jak IAA, pobudza proces organogenezy korzeni, modulując ekspresję genów regulatorowych cyklu komórkowego (FANG i współaut. 2014). Najnowsze badania potwierdzają, że siarkowodór w pierwszej kolejności stymuluje ekspresję genów kodujących oksydazę NADPH, powodując wzrost produkcji  $H_2O_2$ , który bezpośrednio zaangażowany jest w indukowanie powstawania korzeni bocznych przez modulowanie ekspresji genów regulatorowych cyklu komórkowego oraz regulację ścieżki sygnału auksynowego (MEI i współaut. 2017).

Proces starzenia organów roślinnych jest końcowym etapem ich rozwoju, podczas którego słabną funkcje życiowe. Na przykładzie ciętych kwiatów i owoców potwierdzono, że siarkowodór opóźnia otwieranie kwiatów, hamuje obumieranie i gnienie owoców.  $H_2S$  przeciwdziała stresowi oksydacyjnemu, obniżając zawartość reaktywnych form tlenu i poziom peroksydacji lipidów poprzez aktywację enzymów antyoksydacyjnych w tych organach (ZHANG i współaut. 2011, NI i współaut. 2016). Ponadto stwierdzono, że siarkowodór opóźnia dojrzewanie owoców działając jako antagonistą etylenu.  $H_2S$  redukuje ekspresję genów kodujących enzymy odpowiedzialne za biosyntezę etylenu i modyfikuje transkrypcję genów receptora etylenu, w efekcie prowadząc do hamowania ścieżki sygnałowej etylenu (GE i współaut. 2017). Najnowsze badania wskazują, że siarkowodór funkcjonuje jako istotny regulator indukowanego ciemnością starzenia liści. Wykazano, że zapobiega on degradacji chlorofilu przez indukcję reakcji innych niż znane szlaki sygnałowe uruchamiane podczas starzenia, do których należy autofagia. Efekt wywołany przez  $H_2S$  związany jest z homeostazą NO. Siarkowodór moduluje ekspresję genów odpowiedzialnych za starzenie w sposób zależny od NO (WEI i współaut. 2017). Natomiast na przykładzie *Arabidopsis* stwierdzono, że  $H_2S$  pełni funkcję regulatorową w procesie autofagii indukowanej niedoborem składników odżywczych, działając jako represor tego procesu. Nie poznano dotąd szczegółowo mechanizmu działania



Ryc. 2. Rola  $H_2S$  w procesach adaptacyjnych, uruchamianych w roślinach poddanych działaniu stresów abiotycznych.

siarkowodoru. Proponuje się jednak, że  $H_2S$  może odwracalnie, potranslacyjnie modyfikować białka uczestniczące w ubikwitynacji i tworzeniu autofagosomu (BATOKO i współaut. 2017).

#### UDZIAŁ W ADAPTACJI ROŚLIN DO STRESÓW ABIOTYCZNYCH

Endogenna produkcja siarkowodoru, podobnie jak innych wtórnych przekaźników, zwiększa się gwałtownie w roślinach pod wpływem różnych czynników stresowych. Wykazano, że zawartość  $H_2S$  rośnie nawet 2-2,5-krotnie w tkankach wielu gatunków roślin poddanych działaniu stresów abiotycznych. Uważa się zatem, że wzrost poziomu  $H_2S$  jest wspólnym elementem reakcji obronnych roślin, ściśle związanym z uruchamianiem procesów adaptacyjnych. Potwierdzono w licznych publikacjach, że zwiększona zawartość siarkowodoru, wynikająca ze wzro-

stu aktywności enzymów odpowiedzialnych za jego biosyntezę (głównie desulphydrazy L-cysteiny), skorelowana jest ze wzmożoną tolerancją na metale ciężkie, zasolenie, suszę, niską i wysoką temperaturę, promieniowanie UV czy niedobór tlenu (Li Z. G. i współaut. 2016, HE i współaut. 2018). Z drugiej strony natomiast, trwające od dekady intensywne badania wskazują, że wcześniejsze podanie roślinom egzogennych donorów  $H_2S$  prowadzi do nabywania przez nie dodatkowej odporności na zmieniające się, niekorzystne warunki środowiskowe (Ryc. 2).

#### STRES SOLNY

Rośliny poddane działaniu wysokich stężeń  $NaCl$  wykazują wyraźne uszkodzenia liści w postaci więdnienia, zasychania i nekrozy na brzegach blaszki liściowej. Podanie roślinom egzogennego siarkowodoru powoduje złagodzenie negatywnych efektów indukowanych przez zasolenie, umożliwia zachowanie turgoru w liściach i znacznie ogranicza pojawianie się zmian nekrotycznych (FOTOPOULOS i współaut. 2013). Siarkowodor poprawia przeżywalność roślin w zasolonym środowisku. Wpływa na wzrost intensywności fotosyntezy, przewodnictwa szparkowego, zawartości chlorofilu, karotenoidów i białka. Zwiększa akumulację proliny i rozpuszczalnych węglowodanów (DA-SILVA i MODOLO 2018).

Jednym z pierwszych skutków działania wysokiego zasolenia, które pojawiają się w komórkach roślinnych, jest stres oksydacyjny. Niekontrolowana nadprodukcja ROS prowadzi do peroksydacji lipidów, oksydacji białek i wypływu elektrolitów. Zaobserwowano, że podanie roślinom  $H_2S$  przed traktowaniem ich chlorkiem sodu stymuluje aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w tym katalazy (CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), obniżając jednocześnie poziom  $H_2O_2$ . Zwiększa się aktywność enzymów zaangażowanych w biosyntezę glutationu (GSH) i kwasu askorbinowego (AsA), odpowiedzialnych za utrzymanie wysokiego stanu redoks tych związków. Jednocześnie obserwuje się spadek aktywności lipoksygenazy i stopnia peroksydacji lipidów (FOTOPOULOS i współaut. 2013, DA-SILVA i MODOLO 2018).

Stres solny wiąże się z napływem wysokich stężeń jonów  $Na^+$  do wnętrza komórek i ich toksycznym wpływem na metabolizm komórkowy. Stwierdzono, że egzogenne  $H_2S$  powoduje wzrost współczynnika  $K^+/Na^+$ , co związane jest ze wzrostem transportu jonów potasu w stosunku do jonów sodu przez nieselektywne kanały jonowe i plazmolemy antyporter  $Na^+/H^+$  SOS1. Siarkowodor indukuje ekspresję genów antyportera SOS1,

a także ekspresję i fosforylację plazmolemo-  
wej H<sup>+</sup>-ATPazy. Z drugiej strony natomiast  
potwierdzono, że H<sub>2</sub>S uczestniczy w utrzyma-  
niu homeostazy K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> obniżając ekspre-  
sję genów kodujących kanały odpowiedzialne  
za wypływ jonów potasu i zabezpieczając w  
ten sposób komórki przed ich utratą. Utrzy-  
manie niskiego poziomu Na<sup>+</sup> w cytoplazmie  
możliwe jest dzięki akumulacji toksycznych  
jonów wewnątrz wakuoli. Badania wykazały,  
że H<sub>2</sub>S zwiększa transkrypcję genów waku-  
olarnej H<sup>+</sup>-ATPazy oraz wakuolarnego Na<sup>+</sup>/  
H<sup>+</sup> antyportera, odpowiedzialnych za aktyw-  
ny transport jonów sodu przez tonoplast do  
wnętrza wakuoli (LAI i współaut. 2014, CHEN  
i współaut. 2015, DENG i współaut. 2016,  
DA-SILVA i MODOLO 2018).

### STRES ZWIĄZANY Z OBECNOŚCIĄ TOKSYCZNYCH METALI I METALOIDÓW

Toksyczność metali negatywnie wpływa  
na wiele aspektów wzrostu i rozwoju roślin,  
powoduje hamowanie kiełkowania, zmiany  
morfologiczne, upośledzenie w dojrzewaniu  
owoców i procesie fotosyntezy. Dotychczasowe  
badania wskazują, że siarkowodór może  
odgrywać istotną rolę w reakcjach obron-  
nych roślin uruchamianych w odpowiedzi na  
arsen, bor, chrom, glin, miedź, kadm, ołów  
czy cynk (HE i współaut. 2018). Podobnie  
jak w przypadku stresu solnego, obecność  
w środowisku nadmiaru metali, zwłaszcza  
metali ciężkich, prowadzi do oksydacyjnych  
uszkodzeń w komórkach roślinnych, cze-  
go konsekwencją jest przerwanie płynności  
błon, zaburzenia metabolizmu, a także akty-  
wacja programowanej śmierci. Podanie dono-  
rów H<sub>2</sub>S obniża indukowaną jonami metali  
produkcję ROS (nadtlenu wodoru i aniono-  
rodnika ponadtlenkowego), aktywuje enzymy  
antyoksydacyjne, zmniejsza poziom pero-  
ksydacji lipidów, a także reguluje aktywność  
cyklu askorbinian-glutation (AsA-GSH). Ta-  
kie działanie siarkowodoru zaobserwowano  
w obecności wysokich stężeń kadmu, mie-  
dź, glinu, ołowiu czy arsenu (GUO i współ-  
aut. 2016, LI Z. G. i współaut. 2016)

Rola H<sub>2</sub>S nie ogranicza się do przeciw-  
działania stresowi oksydacyjnemu. Traktowa-  
nie roślin siarkowodorem redukuje akumu-  
lację toksycznych jonów w cytoplazmie. W  
przypadku stresu wywołanego przez kadm  
zaobserwowano, że H<sub>2</sub>S zapobiega wnikaniu  
jonów Cd<sup>2+</sup> do wnętrza komórek za pośred-  
nictwem kanałów wapniowych i promuje ich  
gromadzenie wewnątrz wakuoli, aktywując  
tonoplastowy Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antyporter. Analiza ro-  
ślin poddanych działaniu chromu ujawniła,  
że H<sub>2</sub>S wraz z jonami wapnia obniża akumu-  
lację jonów Cr<sup>2+</sup>, regulując ekspresję genów

kodujących transportery metali. Z jednej  
strony, hamowana jest transkrypcja genów  
transporterów odpowiedzialnych za pobiera-  
nie metalu, z drugiej natomiast, obserwuje  
się wzrost ekspresji genów kodujących biał-  
ka zaangażowane w usuwanie metalu z cy-  
tosolu. Podobnie, w roślinach traktowanych  
wysokimi stężeniami cynku stwierdzono, że  
H<sub>2</sub>S obniża cytosolowy poziom jonów Zn<sup>2+</sup> w  
korzeniach poprzez hamowanie ekspresji ge-  
nów kodujących transportery odpowiedzialne  
za pobieranie i utrzymanie homeostazy Zn w  
komórkach. Dodatkowo wykazano, że siar-  
kowodór wzmacnia transkrypcję i aktywność  
metalotionein i fitochelatyn, uczestniczących  
w usuwaniu z komórek nadmiaru szkodli-  
wych jonów metali (SUN i współaut. 2013,  
GUO i współaut. 2016, LI Z. G. i współaut.  
2016, LIU i współaut. 2016, HE i współaut.  
2018).

Siarkowodór bierze udział w regulacji  
nie tylko białek transportujących jony meta-  
li ciężkich, ale także innych transporterów,  
istotnych dla roślin. W przypadku stresu  
wywołanego przez glin dowiedziono, że poda-  
nie H<sub>2</sub>S przywraca aktywność plazmolemo-  
wej H<sup>+</sup>-ATPazy, która hamowana jest przez  
jony Al<sup>3+</sup>. Ponadto, zaobserwowano induk-  
waną przez H<sub>2</sub>S nadekspresję genu kodują-  
cego transporter cytrynianu i w konsekwen-  
cji zwiększoną sekrecję cytrynianu, chelato-  
ra metali, przez korzenie (GUO i współaut.  
2016, HE i współaut. 2018).

Jak już wcześniej wspomniano, jony me-  
tali, takie jak chrom, miedź i glin, hamu-  
ją kiełkowanie nasion, jednak efekt metali  
można cofnąć przez podanie siarkowodoru  
(FOTOPOULOS i współaut. 2013, GUO i współ-  
aut. 2016). Podobny korzystny wpływ H<sub>2</sub>S  
na procesy wzrostowe odnotowano w przy-  
padku roślin traktowanych borem. Nadmiar  
jonów boru wyraźnie hamuje wzrost korzeni,  
co spowodowane jest represją genów kodu-  
jących białka kontrolujące proces powstawa-  
nia ściany komórkowej, w tym ekspansyny  
i enzymy uczestniczące w przemianach pek-  
tyn. Potraktowanie siewek siarkowodorem  
przywraca wzrost korzeni, sugerując udział  
tej cząsteczki w biosyntezie ściany komórko-  
wej (WANG i współaut. 2010).

### STRES SUSZY

Niedobór wody jest jednym z najistotniej-  
szych czynników środowiskowych, które de-  
cydują o wzroście i rozwoju roślin, a także o  
ich produktywności, co ma ogromne znacze-  
nie dla rolnictwa. Podobnie do innych czyn-  
ników stresowych, deficyt wody prowadzi do  
stresu oksydacyjnego w komórkach. Potwier-  
dzono, że potraktowanie siarkowodorem ob-  
niża indukowany suszą poziom peroksydacji

lipidów, stężenie  $H_2O_2$  i wpływ elektrolitów, zwiększa aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz zawartość zredukowanego glutationu i askorbinianu (LI 2013).  $H_2S$  indukuje ekspresję specyficznych genów uruchamianych w odpowiedzi na suszę (m.in. czynników transkrypcyjnych z rodziny DREB/CBF), podnosi przeżywalność roślin, zwiększa biomasę pędów i korzeni, a także chroni przed degradacją chlorofilu. Wpływa na zmniejszenie rozmiarów szparek, zwiększając względną zawartość wody, co związane jest z aktywacją genów kodujących receptor kwasu abscysynowego i indukcją ścieżki sygnałowej z udziałem ABA. Dzięki temu siarkowodor umożliwia roślinom normalny wzrost w warunkach ograniczonej dostępności wody w środowisku (FOTOPOULOS i współaut. 2013, BANERJEE i współaut. 2018). Badania ostatnich lat sugerują, że ważnym czynnikiem modulującym reakcję roślin na stres suszy jest micro RNA (miRNA). Wykazano, że  $H_2S$  uczestniczy w regulacji ekspresji cząsteczek miRNA pojawiających się specyficznie w odpowiedzi na deficyt wody w komórkach, może zatem wpływać na ekspresję docelowych genów warunkujących przetrwanie okresów suszy (SHEN i współaut. 2013).

#### STRES WYWOŁANY WYSOKĄ TEMPERATURĄ

Liczne badania podkreślają, że wysoka temperatura powoduje denaturację białek i ich agregację, wzrost płynności błon i zaburzenia w ich stabilności. Konsekwencją tych zmian jest inaktywacja enzymów, wstrzymanie syntezy białek i trwałe uszkodzenia komórek prowadzące nawet do ich śmierci (FOTOPOULOS i współaut. 2013, GUO i współaut. 2016). Siarkowodor łagodzi skutki stresu cieplnego zwiększając fluorescencję chlorofilu, przewodnictwo szparkowe i zawartość peroksydacji lipidów. Podanie  $H_2S$  nie tylko podwyższa aktywność enzymów antyoksydacyjnych i poziom zredukowanego glutationu i askorbinianu w stresowanych roślinach, ale także zwiększa ekspresję genów kodujących białka szoku cieplnego (ang. heat shock proteins, HSP) i plazmolemowe akwaporyny (ang. plasma membrane intrinsic protein, PIP) (CHRISTOU i współaut. 2014, BANERJEE i współaut. 2018). Wykazano, że wzrost tolerancji na wysoką temperaturę, indukowany przez  $H_2S$ , związany jest z transdukcją sygnału wapniowego i akumulacją endogennej proliny. Traktowanie siarkowodorem podnosi aktywność syntetazy uczestniczącej w biosyntezie proliny i jednocześnie hamuje aktywność dehydrogenazy odpowiedzialnej za jej przemianę kataboliczną. Oprócz proliny,

zwiększa się zawartość innych substancji osmoregulacyjnych, jak betaina i trehaloza (LI i współaut. 2013, BANERJEE i współaut. 2018).

#### STRES WYWOŁANY NISKĄ TEMPERATURĄ

Podobnie jak wysoka temperatura, także niskie temperatury wywołują uszkodzenia w komórkach roślinnych. Warunki stresowe dla roślin pojawiają się zarówno przy 0-10°C (stres chłodu), jak i poniżej 0°C (stres wywołany przez zamarzanie), prowadząc do stresu oksydacyjnego i osmotycznego (LI Z. G. i współaut. 2016, BANERJEE i współaut. 2018). Rola siarkowodoru polega na przeciwdziałaniu niekorzystnym skutkom niskich temperatur, w tym uszkodzeniom oksydacyjnym, analogicznie jak w przypadku działania innych środowiskowych czynników stresowych. Potwierdzono, że podanie  $H_2S$  moduluje poziom antyoksydantów, aktywność enzymów antyoksydacyjnych, zawartość reaktywnych form tlenu i azotu, peroksydację lipidów i przepuszczalność błon, zwiększając przeżywalność roślin. Podobnie jak zaobserwowano w warunkach wysokiej temperatury, jednym z efektów działania  $H_2S$  jest wzrost akumulacji proliny. Zwiększa się także zawartość innych osmoregulatorów, w tym rozpuszczalnych cukrów, i poziom fenoli w komórkach (LUO i współaut. 2015, LI Z. G. i współaut. 2016, BANERJEE i współaut. 2018). Na przykładzie owoców poddanych działaniu niskiej temperatury wykazano, że siarkowodor stymuluje aktywności ATPazy ( $H^+$ -ATPazy i  $Ca^{2+}$ -ATPazy), oksydazy cytochromu c i dehydrogenazy bursztynianowej, utrzymując wysoki poziom ATP w komórkach i ich status energetyczny (LI D. i współaut. 2016a).

#### STRES SPOWODOWANY NIEDOBOREM TLENU

Deficyt tlenu w tkankach roślinnych (hipoksja), w stosunku do aktualnego zapotrzebowania, jest czynnikiem stresogennym, prowadzącym do niedotlenienia i zaburzeń w wytwarzaniu energii. Z sytuacją taką mamy do czynienia, kiedy rośliny okresowo lub stale zalewane są wodą (BANERJEE i współaut. 2018). W nielicznych dotąd badaniach potwierdzono, że podanie siarkowodoru łagodzi negatywne skutki hipoksji. Zapobiega pojawianiu się zmian nekrotycznych i chroni błony komórkowe przed oksydacyjnymi uszkodzeniami. Dodatkowo wykazano, że korzystny wpływ  $H_2S$  związany jest z hamowaniem biosyntezy etylenu (LI Z. G. i współaut. 2016).



## INTERAKCJE H<sub>2</sub>S Z INNYMI CZĄSTECZKAMI SYGNAŁOWYMI

Dotychczasowe prace wskazują, że H<sub>2</sub>S wchodzi w interakcje z innymi cząsteczkami sygnałowymi, do których należą NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i CO, oraz hormony roślinne, głównie IAA, ABA i etylen, a według nielicznych dotąd badań także kwas jasmonowy i salicylowy. Dzięki tym interakcjom tworzy się złożona sieć ścieżek sygnałowych, zaangażowanych w kontrolowanie podstawowych procesów fizjologicznych roślin. Jednak jak dotąd nie poznano szczegółowo mechanizmu oddziaływania H<sub>2</sub>S z innymi molekułami (JIN i PEI 2015, GUO i współaut. 2016, BANERJEE i współaut. 2018). Najwięcej informacji, dostępnych w literaturze, dotyczy wzajemnych zależności pomiędzy H<sub>2</sub>S a NO i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Wiele cech, które wykazuje siarkowodór, przypomina funkcjonalną i biologiczną aktywność tlenu azotu. Badania przeprowadzone na komórkach zwierzęcych potwierdziły, że endogennie generowane NO i H<sub>2</sub>S mogą oddziaływać ze sobą, a interakcje pomiędzy obu cząsteczkami odgrywają istotną fizjologiczną rolę w regulacji pracy serca, funkcjonowaniu układu krążenia i procesach zapalnych. Warto jednak podkreślić, że jedne eksperymenty wykazały, że NO i H<sub>2</sub>S mogą pobudzać nawzajem swoją produkcję, inne natomiast ujawniły odwrotny efekt (PAE i współaut. 2009, KOLLURU i współaut. 2013). Wzajemne zależności pomiędzy działaniem NO i H<sub>2</sub>S wykazano także u roślin. Obie cząsteczki są zaangażowane w regulację ruchów aparatów szparkowych. Jak już wcześniej wspomniano, H<sub>2</sub>S obniża akumulację NO w komórkach szparkowych podczas otwierania szparek. Z drugiej strony istnieją dowody na to, że tlenek azotu może działać jako nadrzędny element w stosunku do siarkowodoru podczas zamykania szparek (GARCÍA-MATA i LAMATTINA 2013). Podobne dane uzyskano badając proces powstawania korzeni przybyszowych. Sugerują one, że NO jest istotnym czynnikiem zaangażowanym w zależną od H<sub>2</sub>S indukcję tego procesu (ZHANG i współaut. 2009). Rola siarkowodoru w adaptacji roślin do stresów abiotycznych wiąże się często z akumulacją tlenu azotu w tkankach. Potwierdzono, że NO bierze udział w indukowanym przez H<sub>2</sub>S wzroście tolerancji na zasolenie i obecność metali ciężkich sugerując, że NO uczestniczy w ścieżce sygnałowej zależnej od H<sub>2</sub>S, a interakcja pomiędzy obiema cząsteczkami może odbywać się poprzez S-nitozylację i S-sulfhydrację białek zaangażowanych w ich biosyntezę (GUO i współaut. 2016, HE i współaut. 2018). W przeciwieństwie do powyższych danych istnieją doniesienia potwierdzające, że

traktowanie roślin donorami siarkowodoru obniża poziom NO w tkankach roślin poddanych działaniu stresu solnego (DA-SILVA i MODOLO 2018). Inne wyniki wskazują natomiast, że ścieżka sygnałowa indukowana przez NO w roślinach traktowanych kadmem blokowana jest przez inhibitory i zmiażdżacz H<sub>2</sub>S, zatem siarkowodór również może być ważnym elementem aktywowanym przez NO, uczestniczącym w reakcjach obronnych roślin (JIN i PEI 2015).

Liczne dane wskazują, że H<sub>2</sub>S odgrywa ważną rolę w transdukcji sygnału z udziałem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jednak interakcje pomiędzy tymi dwoma wtórnymi przekaźnikami w regulacji procesów fizjologicznych różnią się w zależności od gatunku czy warunków środowiskowych. Zaobserwowano, że obie cząsteczki mogą stymulować proces kiełkowania nasion. Z jednej strony wykazano, że siarkowodór uczestniczy w ścieżce sygnałowej indukowanej przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, promującej proces kiełkowania. Traktowanie nasion nadtlenkiem wodoru zwiększa aktywność desulfhidazy L-cysteiny i akumulację H<sub>2</sub>S (LI i współaut. 2012). Z drugiej strony natomiast stwierdzono, że to H<sub>2</sub>S może pełnić nadrzędną rolę w stosunku do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w tym procesie (LI i HE 2015). Badania potwierdzają, że stresy abiotyczne indukują biosyntezę zarówno H<sub>2</sub>S, jak i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w tkankach roślin. Co więcej, siarkowodór zdolny jest wzmacniać korzystny wpływ nadtlenu wodoru na wzrost tolerancji roślin na czynniki stresowe. Wykazano, że H<sub>2</sub>S uczestniczy w indukowanych przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mechanizmach umożliwiających adaptację do wysokich temperatur, zwiększając przeżywalność siewek (LI i współaut. 2015). W przeciwieństwie do powyższych wyników, na przykładzie roślin poddanych działaniu kadmu zaobserwowano, że traktowanie donorem siarkowodoru obniża endogenny poziom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w tkankach (MOSTOFA i współaut. 2015, ZHANG i współaut. 2015), sugerując, że H<sub>2</sub>S przeciwdziała generowaniu reaktywnych form tlenu i uszkodzeniom oksydacyjnym, które pojawiają się jako negatywne skutki działania czynników stresowych. Przeciwny efekt siarkowodoru i nadtlenu wodoru na funkcjonowanie białek uczestniczących w procesach adaptacyjnych potwierdzono na przykładzie wakuolarniej H<sup>+</sup>-ATPazy, której aktywność jest stymulowana przez H<sub>2</sub>S i hamowana przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KABAŁA i współaut. 2019).

## PODSUMOWANIE

Intensywne badania, które przeprowadzono na przestrzeni ostatniej dekady wykazały, że w roślinach funkcjonuje wiele dróg percepcji H<sub>2</sub>S i transdukcji sygnału z jego

udziałem. Wciąż identyfikowane są nowe elementy ścieżek sygnałowych aktywowanych przez  $H_2S$ , wśród nich kinazy białkowe i czynniki transkrypcyjne. Udowodniono, że kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny (ang. calcium-dependent protein kinase, CDPK) odpowiedzialna jest za fosforylację i stymulację aktywności desulfhidraz oraz wzrost poziomu siarkowodoru w roślinach poddanych działaniu kadmu (QIAO i współaut. 2016). Natomiast kinaza MPK4, z rodziny MAPK (ang. mitogen-activated protein kinases), jest ważnym elementem indukowanej przez  $H_2S$  odporności roślin na działanie niskich temperatur (DU i współaut. 2017). Najnowsze dane sugerują, że czynniki transkrypcyjne z rodziny WRKY mogą funkcjonować jako cząsteczki regulatorowe, modulujące ekspresję genów kodujących enzymy odpowiedzialne za biosyntezę  $H_2S$  w roślinach uprawianych na pożywkach z dodatkiem metali ciężkich (LIU i współaut. 2015). Na przykładzie roślin traktowanych chromem potwierdzono, że jony wapnia i kalmodulina wchodzi w interakcję z czynnikiem transkrypcyjnym typu bZIP, TGA3, wzmagając jego wiązanie do promotora genu *LCD*, kodującego desulfhidrazę L-cysteiny, i w konsekwencji zwiększając produkcję  $H_2S$  w tkankach (FANG i współaut. 2017).

Pomimo że istnieje wiele dowodów świadczących o ważnej roli siarkowodoru jako cząsteczki sygnałowej, uczestniczącej w regulacji procesów fizjologicznych i w reakcjach obronnych roślin, wciąż różne kwestie pozostają nierozstrzygnięte. Jednym z takich zagadnień jest sprawa receptora (czy białek docelowych) dla  $H_2S$ .  $H_2S$  łatwo dyfunduje przez błony i istnieje możliwość, że komórki roślinne nie posiadają specyficznych receptorów (LI Z. G. i współaut. 2016). Jednak odkrycie, że siarkowodor może modulować aktywność białek poprzez proces odwracalnej S-sulfhidracji, nasuwa przypuszczenie, że modyfikowane białka mogą funkcjonować jako sensory reagujące na zmiany w poziomie  $H_2S$  w komórkach. Taki punkt widzenia jednak wymaga dalszych badań.

#### Streszczenie

Przez długi czas siarkowodor uznawany był wyłącznie za silną toksynę, negatywnie oddziałującą na organizmy żywe. Badania ostatnich lat wykazały korzystny wpływ  $H_2S$ , podawanego w niskich stężeniach, na funkcjonowanie zarówno zwierząt jak i roślin. Potwierdziły także, że siarkowodor jest cząsteczką sygnałową, podobnej do dwóch znanych gazowych transmiterów, tlenku azotu i tlenku węgla. W komórkach roślinnych zidentyfikowano enzymy odpowiedzialne za generowanie  $H_2S$ . Należą do nich głównie zlokalizowane w cytosolu desulfhidrazy, a także obecna w chloroplastach reduktaza siarczynowa oraz mitochondrialna syntaza  $\beta$ -cyjanoalaniny. Liczne badania wykazały, że poziom  $H_2S$  zwiększa się wyraźnie w tkankach roślin w odpowiedzi na działanie

niekorzystnych czynników środowiskowych, takich jak zasolenie, metale ciężkie, niedostatek wody czy wysokie i niskie temperatury, sugerując, że pełni on istotną funkcję w adaptacji roślin do stresów abiotycznych. Uważa się, że głównym mechanizmem działania  $H_2S$  jest S-sulfhidracja, czyli potranslacyjna modyfikacja reaktywnych reszt cysteiny w białkach.

#### LITERATURA

- ÁLVAREZ C., CALO L., ROMERO L. C., GARCÍA I., GOTOR C., 2010. An O-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152, 656-669.
- AROCHA A., SERNA A., GOTOR C., ROMERO L. C., 2015. S-sulfhydration: a cysteine posttranslational modification in plant systems. *Plant Physiol.* 168, 334-342.
- AROCHA A., BENITO J. M., GOTOR C., ROMERO L. C., 2017. Persulfidation proteome reveals the regulation of protein function by hydrogen sulfide in diverse biological processes in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 68, 4915-4927.
- BANERJEE A., TRIPATHI D. K., ROYCHOUDHURY A., 2018. Hydrogen sulphide trapeze: Environmental stress amelioration and phytohormone crosstalk. *Plant Physiol. Biochem.* 132, 46-53.
- BATOKO H., DAGDAS Y., BALUSKA F., SIRKO A., 2017. Understanding and exploiting autophagy signalling in plants. *Ess. Biochem.* 61, 675-685.
- BURANDT P., SCHMIDT A., PAPENBROCK J., 2002. Three O-acetyl-L-serine(thiol)lyase isoenzymes from *Arabidopsis catalyze cysteine synthesis and cysteine desulfuration at different pH values*. *J. Plant Physiol.* 159, 111-119.
- CHEN J., WU F. H., WANG W. H., ZHENG C. J., LIN G. H., DONG X. J., HE J. X., PEI Z. M., ZHENG H. L., 2011. Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *J. Exp. Bot.* 62, 4481-4493.
- CHEN J., WANG W. H., WU F. H., HE E. M., LIU X., SHANGGUAN Z. P., ZHENG H. L., 2015. Hydrogen sulfide enhances salt tolerance through nitric oxide-mediated maintenance of ion homeostasis in barley seedling roots. *Sci. Rep.* 5, 1-19.
- CHRISTOU A., FILIPPOU P., MANGANARIS G. A., FOTOPOULOS V., 2014. Sodium hydrosulfide induces systemic thermotolerance to strawberry plants through transcriptional regulation of heat shock proteins and aquaporin. *BMC Plant Biol.* 14, 42.
- CUEVASANTA E., LANGE M., BONANATA J., COITIÑO E. L., FERRER-SUETA G., FILIPOVIC M. R., ALVAREZ B., 2015. Reaction of hydrogen sulfide with disulfide and sulfenic acid to form the strongly nucleophilic persulfide. *J. Biol. Chem.* 290, 26866-26880.
- DA-SILVA C. J., MODOLO L. V., 2018. Hydrogen sulfide: a new endogenous player in an old mechanism of plant tolerance to high salinity. *Acta Bot. Brasil.* 32, 150-160.
- DENG Y. Q., BAO J., YUAN F., LIANG X., FENG Z. T., WANG B. S., 2016. Exogenous hydrogen sulfide alleviates salt stress in wheat seedlings by decreasing  $Na^+$  content. *Plant Growth Regul.* 79, 391-399.
- DOOLEY F. D., NAIR S. P., WARD P. D., 2013. Increased growth and germination success in

- plants following hydrogen sulfide administration. *PLoS One* 8, e62048.
- DU X., JIN Z., LIU D., YANG G., PEI Y., 2017. Hydrogen sulfide alleviates the cold stress through MPK4 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 120, 112-119.
- DUAN B., MA Y., JIANG M., YANG F., NI L., LU W., 2015. Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) as a result of an increase in stomatal aperture and density by exogenous hydrogen sulfide treatment. *Plant Growth Regul.* 75, 33-44.
- FANG H., LIU Z., LONG Y., LIANG Y., JIN Z., ZHANG L., LIU D., LI H., ZHAI J., PEI Y., 2017. The  $Ca^{2+}$ /calmodulin2-binding transcription factor TGA3 elevates LCD expression and  $H_2S$  production to bolster  $Cr^{6+}$  tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 91, 1038-1050.
- FANG T., CAO Z., LI J., SHEN W., HUANG L., 2014. Auxin-induced hydrogen sulfide generation is involved in lateral root formation in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 76, 44-51.
- FILIPOVIC M. R., JOVANOVIĆ V. M., 2017. More than just an intermediate: hydrogen sulfide signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 68, 4733-4736.
- FOTOPOULOS V., CHRISTOU A., MANGANARIS G., 2013. Hydrogen sulfide as a potent regulator of plant responses to abiotic stress factors. [W]: *Molecular approaches in plant abiotic stress*. GAUR R. K., SHARMA P. (red). CRC Press, 353-373.
- GARCÍA-MATA C., LAMATTINA L., 2013. Gasotransmitters are emerging as new guard cell signaling molecules and regulators of leaf gas exchange. *Plant Sci.* 201-202, 66-73.
- GE Y., HU K. D., WANG S. S., HU L. Y., CHEN X. Y., LI Y. H., YANG Y., YANG F., ZHANG H., 2017. Hydrogen sulfide alleviates postharvest ripening and senescence of banana by antagonizing the effect of ethylene. *PLoS One* 12, e0180113.
- GUO H., XIAO T., ZHOU H., XIE Y., SHEN W., 2016. Hydrogen sulfide: a versatile regulator of environmental stress in plants. *Acta Physiol. Plant.* 38, 16.
- HANCOCK J. T., LISJAK M., TEKLIĆ T., WILSON I. D., WHITEMAN M., 2011. Hydrogen sulfide and signaling in plants. *CAB Rev.* 6, 1-7.
- HE H., LI Y., HE L. F., 2018. The central role of hydrogen sulfide in plant responses to toxic metal stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 157, 403-408.
- JIA H., HU Y., FAN T., LI J., 2015. Hydrogen sulfide modulates actin-dependent auxin transport via regulating ABPs results in changing of root development in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* 5, 8251.
- JIN Z., PEI Y., 2015. Physiological implications of hydrogen sulfide in plants: pleasant exploration behind its unpleasant odour. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 397502.
- JIN Z., PEI Y., 2016. Hydrogen sulfide: the shutter button of stomata in plants. *Sci. China Life Sci.* 59, 1187-1188.
- KABAŁA K., ZBOIŃSKA M., GŁOWIAK D., REDA M., JAKUBOWSKA D., JANICKA M., 2019. Interaction between the signaling molecules hydrogen sulfide and hydrogen peroxide and their role in vacuolar  $H^+$ -ATPase regulation in cadmium-stressed cucumber roots. *Physiol. Plant.* 166, 688-704.
- KABIL O., BANERJEE R., 2010. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J. Biol. Chem.* 285, 21903-21907.
- KIMURA H., 2012. Metabolic turnover of hydrogen sulfide. *Front. Physiol.* 3, 101.
- KOLLURU G. K., SHEN X., BIR S. C., KEVIL C. G., 2013. Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide* 35, 5-20.
- LAI D., MAO Y., ZHOU H., LI F., WU M., ZHANG J., HE Z., CUI W., XIE Y., 2014. Endogenous hydrogen sulfide enhances salt tolerance by coupling the reestablishment of redox homeostasis and preventing salt-induced  $K^+$  loss in seedlings of *Medicago sativa*. *Plant Sci.* 22, 117-129.
- LI D., LIMWACHIRANON J., LI L., DU R., LUO Z., 2016. Involvement of energy metabolism to chilling tolerance induced by hydrogen sulfide in cold-stored banana fruit. *Food Chem.* 208, 272-278.
- LI L., ROSE P., MOORE P. K., 2011. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 169-187.
- LI Z. G., 2013. Hydrogen sulfide: a multifunctional gaseous molecule in plants. *Russ. J. Plant. Physiol.* 60, 733-740.
- LI Z. G., HE Q. Q., 2015. Hydrogen peroxide might be a downstream signal molecule of hydrogen sulfide in seed germination of mung bean (*Vigna radiata*). *Biologia* 70, 753-759.
- LI Z. G., GONG M., LIU P., 2012. Hydrogen sulfide is a mediator in  $H_2O_2$ -induced seed germination in *Jatropha curcas*. *Acta Physiol. Plant.* 34, 2207-2213.
- LI Z. G., DING X. J., DU P. F., 2013. Hydrogen sulphide donor sodium hydrosulfide-improved heat tolerance in maize and involvement of proline. *J. Plant Physiol.* 170, 741-747.
- LI Z. G., LUO L. J., SUN Y. F., 2015. Signal cross-talk between nitric oxide and hydrogen sulfide may be involved in hydrogen peroxide-induced thermotolerance in maize seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.* 62, 507-514.
- LI Z. G., MIN X., ZHOU Z. H., 2016. Hydrogen sulfide: a signal molecule in plant cross-adaptation. *Front. Plant Sci.* 7, 1621.
- LISJAK M., TEKLIĆ T., WILSON I. D., WHITEMAN M., HANCOCK J. T., 2013. Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule? *Plant Cell Environ.* 36, 1607-1616.
- LIU X., CHEN J., WANG G. H., WANG W. H., SHEN Z. J., LUO M. R., GAO G. F., SIMON M., GHOTO K., ZHENG H. F., 2016. Hydrogen sulphide alleviates zinc toxicity by reducing zinc uptake and regulating genes expression of antioxidative enzymes and metallothioneins in roots of the cadmium/zinc hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Plant Soil* 400, 177-192.
- LIU Z. Q., FANG H. H., PEI Y. X., JIN Z. P., ZHANG L. P., LIU D. M., 2015. WRKY transcription factors down-regulate the expression of  $H_2S$  generating genes, LCD and DES in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Bull.* 60, 995-1001.
- LUO Z., LI D., DU R., MOU W., 2015. Hydrogen sulphide alleviates chilling injury of banana fruit by enhanced antioxidant system and proline content. *Sci. Hortic.* 183, 144-151.
- MOSTOFA M. G., RAHMAN A., ANSARY M. M. U., WATANABE A., FUJITA M., TRAN L. S. P., 2015. Hydrogen sulfide modulates cadmium-induced physiological and biochemical responses to alleviate cadmium toxicity in rice. *Sci. Rep.* 5, 14078.
- MEI Y., CHEN H., SHEN W., SHEN W., HUANG L., 2017. Hydrogen peroxide is involved in hydrogen sulfide-induced lateral root formation in tomato seedlings. *BMC Plant Biol.* 17, 162.

- MÓDIS K., JU Y., AHMAD A., UNTEREINER A. A., ALTAANY Z., WU L., SZABO C., WANG R., 2016. *S-sulphydration of ATP synthase by hydrogen sulfide stimulates mitochondrial bioenergetics*. Pharmacol. Res. 113, 116-124.
- MUSTAFA A. K., GADALLA M. M., SEN N., KIM S., MU W., GAZI S. K., BARROW R. K., YANG G., WANG R., SNYDER S. H., 2009. *H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulphydration*. Sci. Signal. 2: ra72.
- NI Z. J., HU K. D., SONG C. B., MA R. H., LI Z. R., ZHENG J. L., FU L. H., WEI Z. J., ZHANG H., 2016. *Hydrogen sulfide alleviates postharvest senescence of grape by modulating the antioxidant defenses*. Oxid. Med. Cell. Longev. 2016, 4715651.
- PAE H. O., LEE Y. C., JO E. K., CHUNG H. T., 2009. *Subtle interplay of endogenous bioactive gases (NO, CO and H<sub>2</sub>S) in inflammation*. Arch. Pharm. Res. 32, 1155-1162.
- PAPENBROCK J., RIEMENSCHNEIDER A., KAMP A., SCHULZ-VOGT H. N., SCHMIDT A., 2007. *Characterization of cysteine-degrading and H<sub>2</sub>S-releasing enzymes of higher plant – from the field to the test tube and back*. Plant Biol. 9, 582-588.
- QIAO Z. J., JING T., JIN Z., PEI Y., 2016. *CDPKs enhance Cd tolerance through intensifying H<sub>2</sub>S signal in Arabidopsis thaliana*. Plant Soil 398, 99-110.
- RIEMENSCHNEIDER A., WEGELE R., SCHMIDT A., PAPENBROCK J., 2005. *Isolation and characterization of a D-cysteine desulphydrase protein from Arabidopsis thaliana*. FEBS J. 272, 1291-1304.
- ROMERO L. C., AROCA M. A., LAUREANO-MARÍN A. M., MORENO I., GARCÍA I., GOTOR C., 2014. *Cysteine and cysteine-related signaling pathways in Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant 7, 264-276.
- SCHMIDT A., 2005. *Metabolic background of H<sub>2</sub>S release from plants*. [W]: *Proceedings of the 1st sino-german workshop on aspects of sulfur nutrition of plants*. De Kok L. J., Schnug E. (red.). Landbauforschung Völkenrode 283, 121-129.
- SHEN J., XING T., YUAN H., LIU Z., JIN Z., ZHANG L., PEI Y., 2013. *Hydrogen sulphide improves drought tolerance in Arabidopsis thaliana by microRNA expressions*. PloS One 8, e77047.
- SUN J., WANG R., ZHANG X., YU Y., ZHAO R., LI Z., CHEN S., 2013. *Hydrogen sulphide alleviates cadmium toxicity through regulations of cadmium transport across the plasma and vacuolar membranes in Populus euphratica cells*. Plant Physiol. Biochem. 65, 67-74.
- TADEUSIEWICZ J., OLAS B., 2014. *Siarkowodór - gaz nie tylko o właściwościach toksycznych*. Kosmos 63, 125-135.
- WANG B. L., SHI L., LI Y. X., ZHANG W. H., 2010. *Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber (Cucumis sativus L.) seedlings*. Planta 231, 1301-1309.
- WANG R., 2002. *Two's company, three's crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter?* FASEB J. 16, 1792-1798.
- WANG R., 2012. *Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed*. Physiol. Rev. 92, 791-896.
- WEDMANN R., ONDERKA C., WEI S., SZIJÁRTO I. A., MILJKOVIC J. L., MITROVIC A., LANGE M., SAVITSKY S., YADAV P. K., TORREGROSSA R., HARRER E. G., HARRER T., ISHI I., GOLLASCH M., WOOD M. E., GALARDON E., XIAN M., WHITEMAN M., BANERJEE R., FILIPOVIC M. R., 2016. *Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation*. Chem. Sci. 7, 3414-3426.
- WEI B., ZHANG W., CHAO J., ZHANG T., ZHAO T., NOCTOR G., LIU Y., HAN Y., 2017. *Functional analysis of the role of hydrogen sulfide in the regulation of dark-induced leaf senescence in Arabidopsis*. Sci. Rep. 7, 2615.
- YANG G., 2014. *Protein S-sulphydration as a major sources of H<sub>2</sub>S bioactivity*. Rec. Clin. Invest. 1, e337.
- ZHANG H., TANG J., LIU X. P., WANG Y., YU W., PENG W. Y., FANG F., MA D. F., WEI Z. J., HU L. Y., 2009. *Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in Ipomoea batatas, Salix matsudana and Glycine max*. J. Integr. Plant Biol. 51, 1086-1094.
- ZHANG H., HU S. L., ZHANG Z. J., HU L. Y., JIANG C. X., WEI Z. J., LIU J., WANG H. L., JIANG S. T., 2011. *Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants*. Postharvest Biol. Tec. 60, 251-257.
- ZHANG L., PEI Y., WANG H., JIN Z., LIU Z., QIAO Z., FANG H., ZHANG Y., 2015. *Hydrogen sulfide alleviates cadmium-induced cell death through restraining ROS accumulation in roots of Brassica rapa L. ssp. pekinensis*. Oxid. Med. Cell. Longev. 2015, 804603.

**KOSMOS Vol. 68, 3, 451–463, 2019**

KATARZYNA KABAŁA, JUSTYNA ŻEBROWSKA, DOROTA GARBERA

*Department of Plant Molecular Physiology, Institute of Experimental Biology, University of Wrocław, 6/8 Kanonia Str., 50-328  
Wrocław, E-mail: katarzyna.kabala@uw.edu.pl*

#### HYDROGEN SULFIDE AS A REGULATORY MOLECULE IN PLANT CELLS

##### Summary

For a long time, hydrogen sulfide has been known as strong toxin harmful to living organisms. Recent studies have shown the beneficial effect of low doses of H<sub>2</sub>S on functioning of both animals and plants. It was also confirmed that H<sub>2</sub>S acts as a signaling molecule similar to two other well-known gasotransmitters, nitric oxide and carbon monoxide. The enzymes responsible for H<sub>2</sub>S generation have been identified in plant cells. These include desulfhydrases, located mainly in the cytosol, as well as sulfite reductase, present in chloroplasts, and mitochondrial β-cyanoalanine synthase. Numerous studies indicated that H<sub>2</sub>S level increases significantly in plant tissues in response to unfavorable environmental conditions, such as salinity, heavy metals, drought, high and low temperature, suggesting its essential role in plant adaptation to abiotic stresses. It has been proposed that the main mechanism of H<sub>2</sub>S action is the post-translational modification of reactive cysteine residues in proteins, called S-sulfhydration.

Key words: abiotic stress, desulfhydrases, hydrogen sulfide, signal transduction, S-sulfhydration