

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

VIŠESTRUKA ULOGA PROLINA U ODGOVORU BILJAKA NA
ABIOTIČKI STRES

MULTIPLE ROLES OF PROLINE IN PLANT RESPONSES TO
ABIOTIC STRESS

SEMINARSKI RAD

Fran Lukšić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Zagreb, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. METABOLIZAM PROLINA	2
2.1. SINTEZA PROLINA	2
2.2. RAZGRADNJA PROLINA	3
2.3. TRANSPORT PROLINA	4
3. ULOGA PROLINA U ODGOVORU BILJAKA NA STRESNE UVJETE	6
3.1. SUŠA	6
3.2. SALINITET	8
3.3. OKSIDACIJSKI STRES	10
3.4. TEŠKI METALI	11
3.5. OSTALI STRESNI UVJETI	12
4. DOSADAŠNJE PRIMJENE I DALJNJA ISTRAŽIVANJA	14
5. ZAKLJUČAK	16
6. LITERATURA	17
7. SAŽETAK	23
8. SUMMARY	23

POPIS KRATICA

γ -GP – glutamil- γ -fosfat

ABA – abscizinska kiselina

ATP – adenzin trifosfat

BAC – transporteri bazičnih aminokiselina

GABA – γ -aminomaslačna kiselina

GSA – glutamat- γ -semialdehid

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

OAT – ornitin δ -aminotransferaza

P5C – Δ^1 -pirolin-5-karboksilat

P5CDH – pirolin-5-karboksilat dehidrogenaza

P5CR – pirolin-5-karboksilat reduktaza

P5CS – pirolin-5-karboksilat sintetaza

PDH – prolin dehidrogenaza

ROS – reaktivne kisikove vrste

siRNA – male interferirajuće ribonukleinske kiseline

1. UVOD

Biljke su zbog široke rasprostranjenosti i sesilnog načina života izložene mnogim uzročnicima stresa, kako biotičkim tako i abiotičkim. Kako bi preživjele i nadvladale učinke stresnih uvjeta na stanicu i cijeli organizam razvijeni su brojni mehanizmi koji umanjuju štetne učinke. Jedan od čimbenika koji ima značajnu ulogu prilikom izloženosti širokom spektru abiotičkih uzročnika stresa je prolin. Prolin je jedna od 20 proteogenih aminokiselina. Ubraja se u skupinu nepolarnih alifatskih aminokiselina. Također je jedina aminokiselina kojoj je bočni ogranak vezan i na dušik te se stoga naziva i iminokiselina.

Prvi dokazi o ulozi prolina u odgovoru na stres uočeni su još 50-tih godina prošlog stoljeća. Kemble i Macpherson (1954) su proučavajući promjene u koncentracijama aminokiselina prilikom uvenuća ljulja uočili da je koncentracija prolina u uvenulim biljkama višestruko narasla, ali ako prilikom izgladnjivanja biljka nije bila izložena manjku vode, koncentracija prolina ostala je nepromijenjena. Od tada se brojnim istraživanjima pokušavaju utvrditi sve funkcije prolina, njegovog nakupljanja i metabolizma u obrani biljaka u stresnim uvjetima. Do sada je utvrđeno da prolin ili njegovo nakupljanje ima značajnu ulogu u mnogim biljnim vrstama koje su izložene suši, visokom salinitetu, oksidativnom stresu, teškim metalima i niskim temperaturama.

Jedan je od glavnih ciljeva svih istraživanja povezanih s funkcijama prolina prilikom stresnih uvjeta otkriti kako poboljšati uzgoj i otpornost kultura koje se uzgajaju za prehrambene i druge svrhe. Velik broj usjeva nalazi se u područjima u kojima prevladavaju visoke temperature i malo padalina (suša) te visok salinitet (Boyer, 1982). Otkrića o metabolizmu i funkcijama prolina daju nove mogućnosti za stvaranje biljaka otpornijih na stresne uvjete (Kaur i Asthir, 2015). Biljke koje imaju veći udio prolina otpornije su na određene uvjete, no i dalje postoje brojna pitanja koje sve uloge ima prolin i na koje sve načine sudjeluje u obrani biljaka u stresnim uvjetima.

2. METABOLIZAM PROLINA

Biosinteza, transport među stanicama i staničnim odjeljcima te razgradnja tri su čimbenika koji utječu na unutarstanične koncentracije prolina (Szabados i Savoure, 2009). U ovom će poglavlju svaki od tih čimbenika biti pomnije razmotren.

2.1. SINTEZA PROLINA

U biljaka postoje dva biosintetska puta dobivanja prolina. Prvi put započinje glutamatom, dok drugi započinje ornitinom. Biosinteza prolina iz glutamata započinje djelovanjem enzima pirolin-5-karboksilat sintetaze (P5CS). To je bifunkcionalni enzim koji ima kinaznu i dehidrogenaznu aktivnost. Prvi je korak ATP-ovisna fosforilacija glutamata kojom nastaje glutamil- γ -fosfat (γ -GP). Potom se djelovanjem glutamat- γ -semialdehid dehidrogenaze γ -GP pretvara u glutamat- γ -semialdehid (GSA). Nastali intermedijer spontano se ciklizira te dolazi do stvaranja Δ^1 -pirolin-5-karboksilata (P5C). P5CS prvi je puta izolirana iz biljke *Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechal te je tada i potvrđena sličnost s bakterijskim proteinima ProA i ProB (Hu i sur., 1992). Sljedeći korak u sintezi provodi enzim pirolin-5-karboksilat reduktaza (P5CR). Njegovim djelovanjem P5C uz kofaktor nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) prelazi u prolin.

Drugi put biosinteze započinje argininom i ornitinom. Djelovanjem arginaze arginin se pretvara u ornitin. Ornitin δ -aminotransferaza (OAT) potom pretvara ornitin u GSA koji opet spontano prelazi u P5C. Iako su postojali podaci da je enzim OAT lokaliziran ne samo u mitohondrijima već i u citosolu, potvrđeno je da je u biljkama lokaliziran samo u mitohondrijima (Funck i sur., 2008). Istraživanja su pokazala da je ovaj biosintetski put mnogo važniji prilikom opskrbe većim količinama dušika, ali kod nekih vrsta ima ulogu i u stresnim uvjetima te se provode daljnja istraživanja o važnosti ovoga puta.

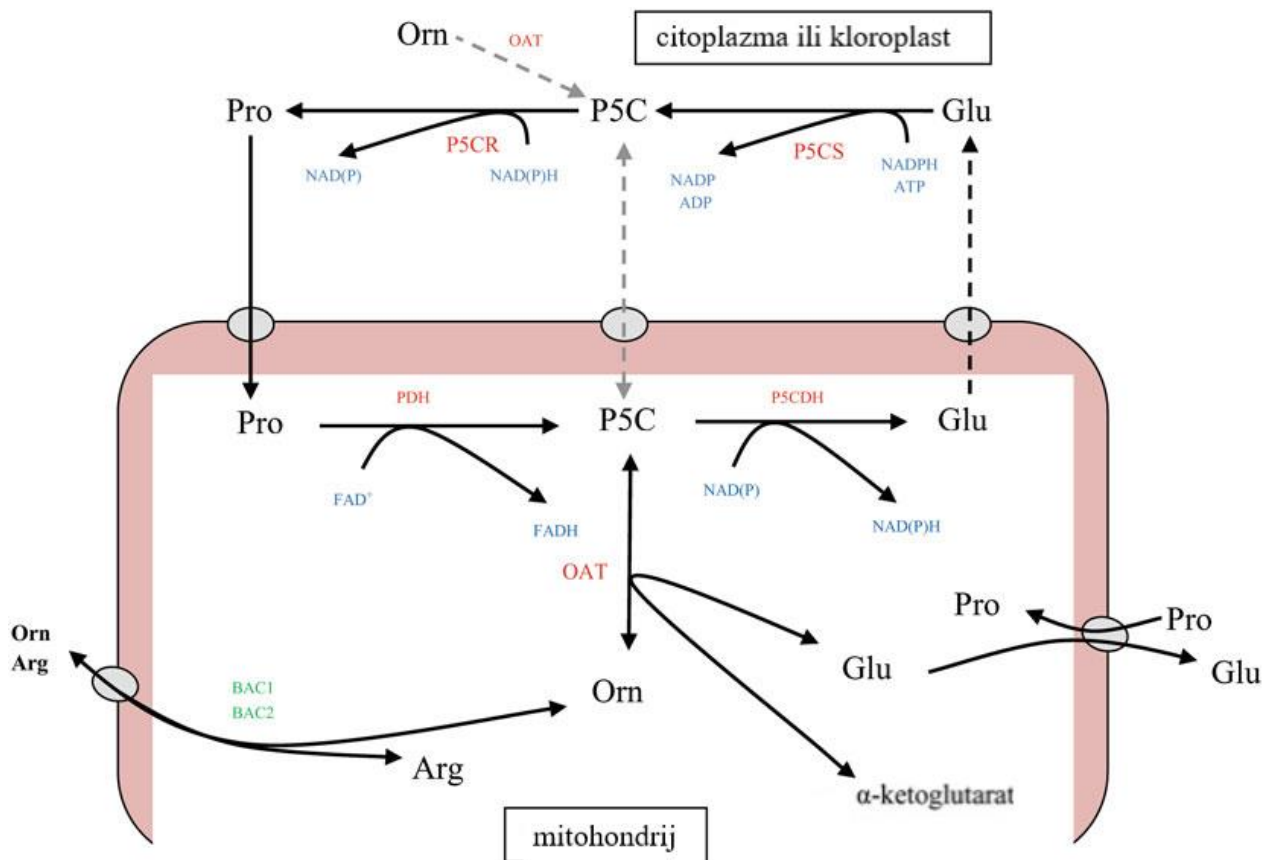
Istraživanjima gena P5CS uočeno je da mnoge vrste imaju dva gena za sintetazu, uključujući *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Strizhov i sur., 1997) i *Lycopersicon esculentum* L. (Fujita i sur., 1998). Kod vrste *A.thaliana* P5CS2 ima funkciju održavateljskog ("housekeeping") gena te je protein lokaliziran uglavnom u citosolu (Szekely i sur., 2008). Produkti gena P5CS1 također su prisutni u citosolu, no prilikom stresnih uvjeta uočena je lokalizacija proteina unutar kloroplasta mezofila lista (Szabados i Savoure, 2009). Yoshida i sur. (1997) uočili su da prilikom osmotskog stresa izazvanog sušom ili povećanim salinitetom raste količina transkripta P5CS1 te je taj

izoenzim važniji u odgovoru biljaka na stresne uvjete. Oba izoenzima prisutna su u cvjetnim apikalnim meristemima (Mattioli i sur., 2009) te sintetiziraju prolin potreban stanicama. Zanimljivo je da je prilikom infekcije patogenom uočen porast P5CS2, a ne P5CS1 što upućuje na činjenicu da su drugačiji odgovori biljaka na biotički i abiotički stres (Fabro i sur., 2004). Također je utvrđeno da je P5CS, baš kao i u bakterija inhibirana povratnom spregom krajnjim produktom sinteze tj. prolinom. Prilikom stresnih uvjeta dolazi do djelomičnog uklanjanja inhibicije što također pomaže u akumulaciji prolina, no rezultati pokazuju da čak i tada postoji inhibicija povratnom spregom (Hong i sur., 2000). U biljkama s modificiranim enzimom te potpuno uklonjenom inhibicijom došlo je do udvostučenja količine prolina u stresnim uvjetima u odnosu na divlji tip biljaka izloženih jednakim uvjetima. Prvi korak biosinteze također je i ograničavajući (“*rate limiting*”), te stoga promjenom količine transkripata sintetaze i količine samog enzima P5CS raste udio prolina u stanici (Hu i sur., 1992).

P5CR koristi NADPH kao donor elektrona te se nalazi i u citosolu i u kloroplastima biljaka (Slika 1). Osim funkcije sinteze prolina, P5CR također je važan enzim za održavanje omjera $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ koji je potreban za pokretanje puta pentoza fosfata (Miller i sur., 2009).

2.2. RAZGRADNJA PROLINA

U razgradnji prolina sudjeluju dva enzima: prolin dehidrogenaza (PDH) i pirolin-5-karboksilat dehidrogenaza (P5CDH). Oba su enzima smještena u mitohondriju (Slika 1), a PDH je povezana na unutrašnju membranu mitohondrija (Liang i sur., 2013). PDH prenosi dva elektrona sa prolina na nekovalentno vezan flavin adenin dinukleotid te potom prenosi elektrone na akceptor elektrona unutar lanca prijenosa elektrona. Otkrivena su dva gena koja kodiraju PDH kod vrste *A. thaliana*, dok je za sljedeći enzim u nizu, P5CDH nađen samo jedan gen (Funck i sur., 2010). Uočeno je da se prilikom stresnih uvjeta smanjuje transkripcija *PDH*, a prilikom prestanka izloženosti stresnim uvjetima i povećanoj koncentraciji prolina transkripcija raste (Sharma i Verslues, 2010). P5CDH koristi NAD^+ kao kofaktor te iz P5C nastaje glutamat. Prilikom smanjenja količine P5CDH pretpostavlja se da dolazi do transporta P5C u citosol koji potom ponovno prelazi u prolin (prolin - P5C ciklus; Slika 1) što omogućava održavanje toka elektrona u mitohondriju, ali dovodi i do stvaranja više reaktivnih kisikovih vrsta (ROS).



Slika 1. Do sada dokazani i pretpostavljeni metaboličku putovi prolina u stanici. Isprekidane linije predstavljaju još nepotvrđene putove transporta metabolita. Preuzeto i prilagođeno prema Dar i sur. (2016).

P5CS, pirolin-5-karboksilat sintetaza; P5C, pirolin-5-karboksilat; OAT, ornitin aminotransferaza; P5CR, pirolin-5-karboksilat reduktaza; PDH, prolin dehidrogenaza; P5CDH, pirolin-5-karboksilat reduktaza; BAC1/BAC2, transporteri bazičnih aminokiselina; FADH, flavin adenin dinukleotid; NADH, nikotinamin adenin dinukleotid.

2.3. TRANSPORT PROLINA

Zbog različitih mjesta sinteze i razgradnje, ali i zbog različite uloge prolina u određenim dijelovima biljke, prolin, ali i neki metabolički međuprodukti moraju se moći transportirati kako unutar staničnih odjeljaka, tako i međustanično. Unutarstanični transport odvija se između mitohondrija i kloroplasta te citosola. Di Martino i sur. (2006) dokazali su postojanje dva tipa prolinskih transportera u membranama mitohondrija: prolinski nosač koji unosi prolin u mitohondrije i prolin/ glutamat antiporter koji prenosi prolin u mitohondrije, a glutamat u citosol. Drugi tip nosača važan za biosintezu prolina iz ornitina su transporteri bazičnih aminokiselina (BAC). Oni prenose arginin i ornitin preko membrane mitohondrija (Slika 1). Istraživani su BAC1 i BAC2 te iako imaju slične funkcije, razlikuju se u pH-optimumu, specifičnosti prema supstratu i

ekspresiji (Palmieri i sur., 2006). Točna uloga ovih transportera i ukupan značaj za biosintezu prolina nisu još poznati.

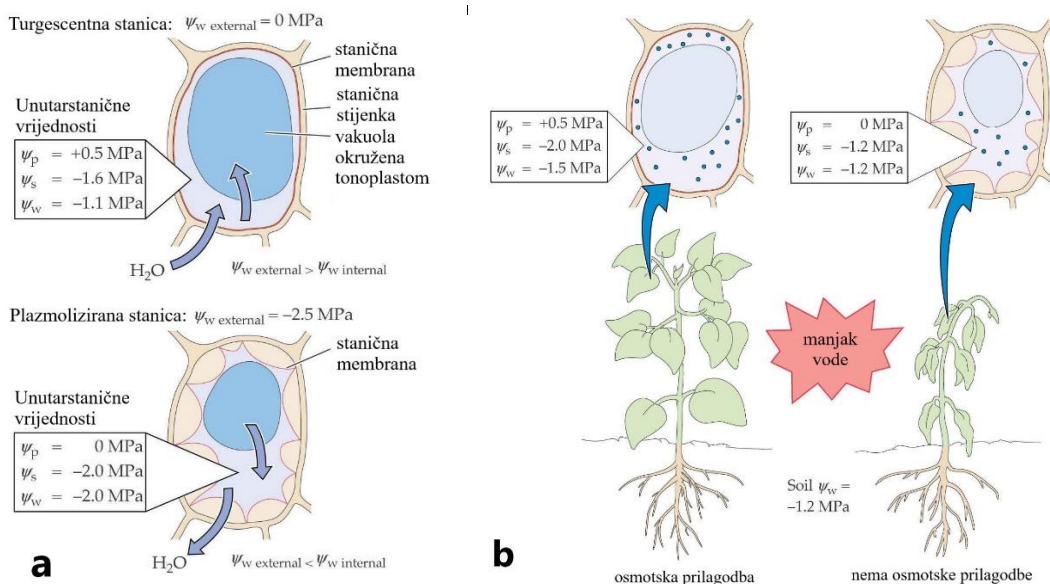
Dosadašnja istraživanja ukazala su na postojanje triju membranskih transportera prolina u *A. thaliana* - ProT1, ProT2 i ProT3. Osim prolina, njima se prenose i glicin betain te GABA. Transporteri se međusobno razlikuju po mjestima ekspresije u pojedinom tkivima te je tako *ProT2* najviše eksprimiran u korijenu, a *ProT1* u stabljici (floemu) i cvijetu. Prilikom djelovanja stresnih uvjeta uočena je značajnija promjena jedino u transkriptu *ProT2* (Rentsch i sur., 1996). Iako ne dolazi do značajnih promjena u količinama transkripata svih transportera, moguća je relokalizacija nosača koji bi onda na taj način sudjelovali u transportu prolina u biljkama prilikom stresnih uvjeta. Također je moguće i postojanje drugih transportera koji bi imali ulogu prilikom odgovora biljaka na stresne uvjete, a koji još nisu otkriveni.

3. ULOGA PROLINA U ODGOVORU BILJAKA NA STRESNE UVJETE

Prilikom izloženosti različitim stresnim uvjetima prolin može imati jednu ili više značajnih uloga. Nekoliko različitih uvjeta potiče akumulaciju prolina u biljkama te on najčešće ima funkciju kompatibilnog osmolita. S vremenom su otkrivene i brojne druge funkcije kojima prolin i njegova akumulacija štite stanice i biljku. U ovom će poglavlju biti opisane različite uloge prolina u odgovoru biljaka na najčešće i najrasprostranjenije abiotičke stresne uvjete.

3.1. SUŠA

U uvjetima smanjene količine padalina vodni potencijal tla znatno se snižuje. Poznato je da se voda kreće iz područja višeg vodnog potencijala u smjeru nižeg vodnog potencijala. Zbog toga snižavanje vodnog potencijala tla uslijed sušnih uvjeta onemogućuje ulazak vode u stanicu ili čak potiče njezin izlazak, tj. dehidraciju stanice (Slika 2 a). Najranije uočena i najviše istraživana funkcija prolina u stresnim uvjetima je uloga kompatibilnog osmolita. To su male molekule topljive u vodi koje stanici omogućavaju održavanje volumena, jer joj omogućuju primanje vode. Uz prolin, najvažniji kompatibilni osmoliti u biljkama su glicerol, glukoza, saharoza, trehaloza, manitol i glicin betain (Chen i Jiang, 2010; Yancey i sur., 1982). Njihovom sintezom ili transportom u druge dijelove biljke te posljedičnom akumulacijom u stanicama snižava se vodni potencijal stanica te se sprječava izlazak vode iz stanica i potiče daljnji ulazak (Slika 2 b). Ta se pojava naziva osmotska prilagodba stanica.



Slika 2. Uloga kompatibilnih osmolita u osmotskoj prilagodbi stanice - a) plazmoliza stanice uzrokovana promjenom vodnog potencijala tla u odnosu na vodni potencijal stanice; b) osmotska prilagodba biljne stanice pomoću biosinteze osmolita koji snižuju vodni potencijal stanice i omogućuju primanje vode iz tla u uvjetima manjka vode ili povišenog saliniteta tla; preuzeto i prilagođeno prema Buchanan i sur. (2002).

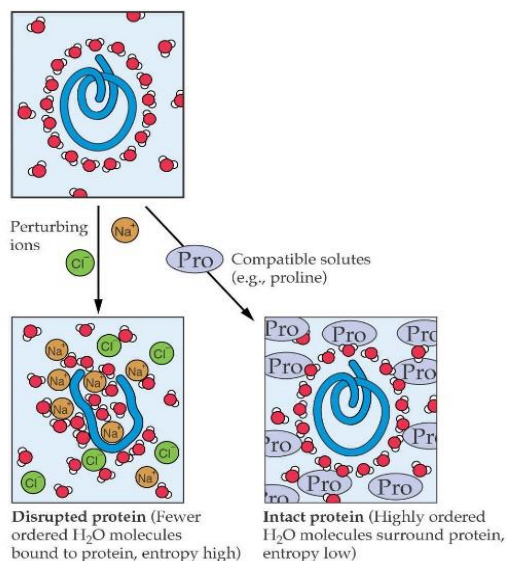
Hsu i sur. (2003) pokazali su da usred izloženosti listova riže vodnom stresu dolazi do nakupljanja prolina, a to je bila posljedica razgradnje proteina, povećane razine arginina, ornitina i glutamata te OAT. Također je uočen i porast koncentracije apscizinske kiseline, no i u prisustvu inhibitora ABA-e došlo je do akumulacije prolina. Kao što je ranije spomenuto, prilikom stresa uzrokovanog sušom raste količina izoenzima P5CS1 te se pretpostavlja kako on ima jednu od ključnih uloga u akumulaciji prolina. Osim porasta biosinteze, dolazi i do smanjivanja razgradnje prolina, prije svega zbog smanjenja količine PDH (Kiyosue i sur., 1996) što također omogućava višestruko povećanje koncentracije prolina u stanici.

Osim funkcije kompatibilnog osmolita o kojoj će biti riječi i u nadolazećim poglavljima, prolin ima još važnih uloga u biljkama u uvjetima manjka vode. Osmotski stres dovodi do zatvaranja puči, a time se smanjuje i dostupnost CO_2 . To posljedično dovodi do smanjenja stope korištenja NADPH u Calvinovom ciklusu i ne nastaje NADP^+ koji služi kao akceptor elektrona u lancu prijenosa elektrona. U putu biosinteze prolina u kloroplastima iskoristi se dio molekula NADPH i omogućuje daljnji transport elektrona na nastali NADP^+ te se smanjuje nastanak ROS koje oštećuju stanicu.

3.2. SALINITET

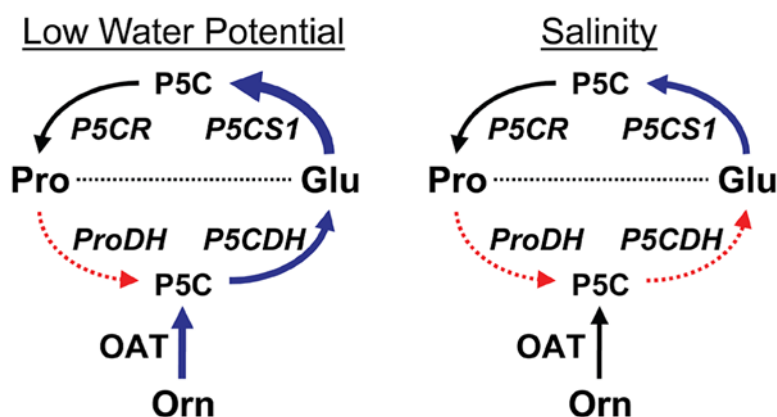
Visoki salinitet je, baš kao i suša, sve veći problem prilikom uzgoja mnogih poljoprivrednih kultura u današnje doba. Iako i jedan i drugi stresni uvjet dijele osmotski stres kao zajednički mehanizam djelovanja, biljni odgovor i utjecaj na vodni potencijal stanice se razlikuju (Delauney i Verma, 1993). U oba slučaja dolazi do akumulacije prolina te je jedna od funkcija koju on ima funkcija kompatibilnog osmolita. Također ima važnu ulogu u smanjenju nastanka ROS i održavanju homeostaze $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$.

Prolin ima ulogu i šaperona koji sprječava agregaciju proteina. Osmoliti koji imaju ulogu šaperona stvaraju visoko uređenu hidratacijsku ljusku oko proteina (Slika 3). U slučaju prolina, predložen je i mehanizam prema kojem prolin u vodenom mediju stvara hidrofilne koloide čija hidrofobna okosnica stupa u interakciju s proteinom (Slama i sur., 2015). Na taj način enzimi ostaju funkcionalni i u stresnim uvjetima. Tako se smanjuje i nastanak oksidativnog stresa jer se štite i enzimi antioksidacijskog sustava. Khedr i sur. (2003) pokazali su da prolin održava povišenu aktivnost katalaze i peroksidaze u biljkama *Pancretium maritimum* L. izloženim povećanim količinama NaCl. To istraživanje također je pokazalo da prolin ima još jednu važnu funkciju: indukciju sinteze dehidrina, skupine proteina koji imaju ulogu u aklimatizaciji na stresne uvjete kao što su vrućina, suša i hladnoća, iz čega se zaključuje da prolin sudjeluje u putu prijenosa signala u odgovoru na stresne uvjete.



Slika 3. Djelovanje prolina kao šaperona koji stvara visoko uređenu hidratacijsku ljusku koja stabilizira nativnu konformaciju proteina u uvjetima povišene koncentracije iona; preuzeto iz Buchanan i sur.(2002).

Kao što je već spomenuto, suša i salinitet u biljci aktiviraju različite enzime metabolizma prolina. Analizama ekspresije pojedinih gena za enzime biosintetskog i kataboličkog puta prolina uočeno je da su u odgovoru na sniženi vodni potencijal uslijed suše zastupljena oba puta biosinteze, tj. dolazi do porasta količine i P5CS1 i OAT (Slika 4). Također dolazi do povećanja koncentracije P5CDH (Sharma i Verslues, 2010). Aktivnost PDH (Slika 4) se pak smanjuje, što dokazuje postojanje dvaju signalnih putova za transkripciju i sintezu PDH koja je inače potaknuta povećanom koncentracijom prolina (Miller i sur., 2005). To znači da prilikom osmotskog stresa dolazi do stresom potaknute inhibicije transkripcije gena *PDH*. Odgovor na povećani salinitet uključuje samo put sinteze iz glutamata (Slika 4), a također dolazi do smanjenja aktivnosti oba enzima kataboličkog puta. Borsani i sur. (2005) dokazali su postojanje siRNA koja potiče degradaciju transkripta *P5CDH* pritom smanjujući razgradnju prolina. Paralelno sa smanjenim nastankom P5CDH povećava se količina P5C međuprodukta koji dovodi do nastanka ROS koji potiču daljnji stanični odgovor. Kako količina nastalih ROS ne bi bila opasna za stanicu, paralelno s porastom koncentracije prolina raste i koncentracija proteina SRO5. Vjeruje se kako on potiče detoksifikaciju nastalih ROS, a njegov transkript je važan za nastanak ranije spomenute siRNA koja posljedično potiče nastanak više ROS. Ti rezultati ukazuju na postojanje izuzetno precizne regulacije staničnog odgovora na salinitet i održavanje točno određene ravnoteže štetnih kisikovih vrsta o kojima će biti riječ u sljedećem poglavlju.



Slika 4. Transkripcijska regulacija enzima biosintetskog i razgradnog puta prolina prilikom suše i povišenog saliniteta. Plava boja strelica označava pojačanu transkripciju, a debljina strelica proporcionalna je povećanju. Crna strelica označava da nema promjene u intenzitetu transkripcije, a crvene isprekidane strelice označavaju smanjenje transkripcije; preuzeto iz Verslues i Sharma (2010).

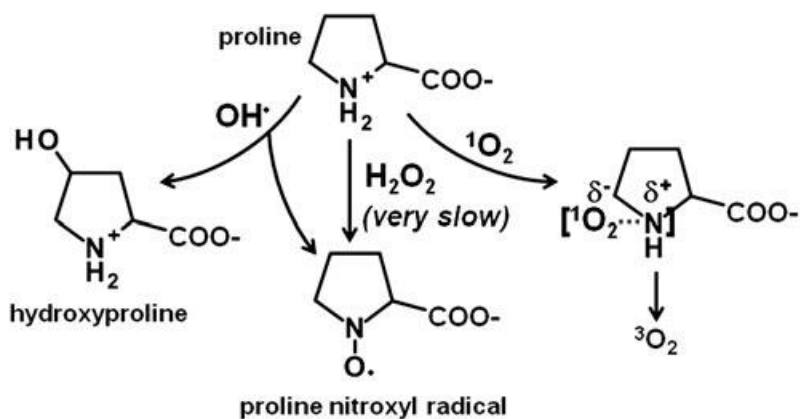
P5C, pirolin-5-karboksilat; P5CS1, pirolin-5-karboksilat sintetaza 1; P5CR, pirolin-5-karboksilat reduktaza; ProDH, prolin dehidrogenaza; P5CDH, pirolin-5-karboksilat dehidrogenaza.

3.3. OKSIDACIJSKI STRES

Jedan od sastavnih nusprodukata aerobnog metabolizma su i reaktivne kisikove vrste (ROS). To su visoko reaktivni radikali i molekule koje su u normalnim uvjetima lokalizirani u mitohondrijima, kloroplastima, peroksisomima i citosolu. Zahvaljujući širokom spektru staničnih antioksidacijskih mehanizama, nastali ROS ne uzrokuju štetu u stanicama. U ROS se između ostalih ubrajaju vodikov peroksid (H_2O_2), superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\cdot -}$), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), perhidroksilni radikal (HO_2^{\cdot}) i singletni kisik. Prilikom izlaganju različitim stresnim uvjetima (suša, visoki salinitet, teški metali, ekstremne temperature) dolazi do povećanog stvaranja ROS što dovodi do oštećenja staničnih dijelova. Može doći do oštećenja proteina, lipida i DNA, što može dovesti i do stanične smrti. Enzimi poput superoksid dismutaze, peroksidaze, glutation-S-trasferaze i katalaze pomažu u uklanjanju i detoksifikaciji nastalih ROS. Postoje i brojne neenzimatske molekule npr. askorbinska kiselina, reducirani glutation, fenoli, flavonoli te prolin koji također uklanjaju štetne vrste (Dar i sur., 2017).

Kao što je ranije spomenuto, jedna od funkcija prolina je funkcija šaperona koji održava enzime funkcionalnima. Među zaštićenim enzimima su i peroksidaza te katalaza (Ozturk i Demir, 2002). Prolin sprječava i sam nastanak ROS jer sintezom u kloroplastima pomaže u održavanju omjera $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$.

Do sada nespomenuta funkcija prolina je neutralizacija ROS. Prolin može reagirati s hidroksilnim radikalima te možda sa singletnim kisikom i neutralizirati ih. Kaul i sur. (2008) dokazali su da prolin reagira s vodikovim peroksidom i pritom nastaju molekule hidroksiprolina (Slika 5). Reakcijom peroksida i prolina nastaju i male količine nitroksilnog radikala, no ta je reakcija znatno sporija od prethodne. Jedna od teorija, za sada samo mehanistički potvrđena, je i postojanje prolin-prolin ciklusa kojim se uklanjaju dva hidroksilna radikala te nastaje P5C koji se djelovanjem P5CR uz NADPH prevodi u prolin, a tada se ciklus može ponoviti (Signorelli i sur. 2014). Osim uklanjanja radikala taj bi ciklus pridonio i održavanju ravnoteže $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ i smanjio sam nastanak radikala. Iako se dugo vjerovalo kako prolin može ukloniti i singletni kisik mehanizmom prikazanim na Slici 5., novija istraživanja to nisu potvrdila (Signorelli i sur., 2013) te ta funkcija prolina treba biti detaljnije istražena.



Slika 5. Mogući mehanizmi uklanjanja ROS djelovanjem prolina; preuzeto iz Liang i sur. (2013).

3.4. TEŠKI METALI

U današnje vrijeme zagađenje različitim metalima zbog antropogenog učinka vrlo je veliko. Različiti metali koji su inače u tlu zastupljeni u milimolarnim koncentracijama na nekim su mjestima prisutni u višestruko višoj koncentraciji i imaju toksične učinke na živi svijet. Mnogi metali neophodni su za normalnu funkciju različitih enzima i sustava u biljkama, npr. magnezij, kalcij, cink, mangan, željezo, no prevelike koncentracije imaju suprotan efekt i štete biljkama. Neke od posljedica koje se javljaju zbog prevelike koncentracije metala u biljkama su smanjena aktivnost ili potpuni gubitak aktivnosti enzima, kloroza, smanjeni rast i oštećenje dijelova biljke, smanjena sposobnost klijanja te nekroza (Yaday, 2010).

Teški metali mogu uzrokovati osmotski stres u biljkama. Soli teških metala snizuju vodni potencijal tla i time se onemogućuje kretanje vode u biljku. Sami ioni metala rijetko su prisutni u takvim koncentracijama da bi uzrokovali osmotski stres, a da pritom ne bi imali letalne učinke na stanicu (Rucińska-Sobkowiak, 2016). Vjerojatnije je da teški metali dovode do morfoloških promjena korijena, zadebljanja stijenke i promjene ekspresije gena. Jedna od uloga prolina kod takvog stresa je već navedena uloga kompatibilnog osmolita, iako se u posljednje vrijeme značaj te uloge prolina kod izloženosti teškim metalima dovodi u pitanje. Mnogo je važnija uloga prolina detoksikacija ROS i održavanje funkcionalnosti enzima koji sudjeluju u detoksikaciji. Metali direktno (npr. željezo i bakar) ili indirektno sudjeluju u nastanku brojnih ROS, najčešće perhidroksilnog radikala koji dovodi do brojnih oštećenja među kojima se ističe lipidna peroksidacija koja reakcijskim nizom dovodi i do oštećenja proteina i DNA. Uloga prolina u

eliminaciji perhidroksilnog radikala već je ranije objašnjena te je jasno zašto je akumulacija prolina važna prilikom takvog stresa. Još jedna uloga prolina je uloga helatora metala. Sharma i sur. (1998) su na temelju dobivenih rezultata pretpostavili da prolin može direktno vezati cink te u manjoj mjeri kadmij. Smatra se da je ta uloga zanemariva jer većinu metala vežu fitohelatini, no i dalje se istražuje mogućnost vezanja različitih metala na prolin, prije svega onih koje fitohelatini ne mogu vezati kao i značajnost uloge prolina u ukupnom odgovoru biljke na stres uzrokovan teškim metalima.

3.5. OSTALI STRESNI UVJETI

Akumulacija prolina javlja se i prilikom drugih stresnih uvjeta kao što su hladnoća, vrućina, pad stanične pH vrijednosti (Hare i Cress, 1997) i nedostatak fosfora. U slučaju hladnoće glavna uloga prolina je uloga osmolita. Smrzavanje vode u izvanstaničnom prostoru dovodi do promjene vodnog potencijala te biljna stanica gubi vodu. Neka istraživanja pokazala su da do akumulacije prolina prilikom niskih temperatura dolazi i u slučajevima kada se tijekom istraživanja pazilo da vodni potencijal bude nepromijenjen te postoji mogućnost da drugi čimbenici potiču akumulaciju prolina (Hare i Cress, 1997). Pri djelovanju vrućina prolin sprječava nastanak ROS, stabilizira enzime i također ima ulogu osmolita ako je došlo do promjene vodnog potencijala. Istraživanja o utjecaju niske pH vrijednosti nisu bila mnogobrojna, no do sada je pokazano da unutarstanične promjene pH vrijednosti dovode do sinteze i akumulacije prolina (Chou i sur., 1991). Uloge u prijenosu signala i ekspresiji gena otkrivene u novije vrijeme također su bitne u određenim uvjetima pogotovo kada stresni uvjeti djeluju na stanicu na mnogo načina te je za održavanje stabilnosti bitan višestruki odgovor biljke.

Osim odgovora na stres i povratak u normalne metaboličke uvjete povezan je s prolinom. Oksidacijom prolina oslobađa se energija koja je ekvivalentna 30 molekula ATP-a te ju biljke mogu koristiti za rast i normalni metabolizam. Primijećena je pojačana ekspresija gena kataboličkog puta prolina u cvjetovima i peludu što je potvrda funkcije prolina kao izvora energije potrebne za rast i razvoj (Kishor i sur., 2005). Također, njegova sinteza za vrijeme stresa oksidacijom NADPH potiče reakcije puta pentoza fosfata (NADP⁺ je kofaktor potreban za odvijanje nekih reakcija puta pentoza fosfata). Tim putem, osim NADPH, nastaju prekursori nukleotida koji po prestanku djelovanja

stresnih uvjeta, zajedno s energijom dijelom oslobođenom i razgradnjom akumuliranog prolina, omogućuju ubrzane diobe stanica.

4. DOSADAŠNJE PRIMJENE I DALJNJA ISTRAŽIVANJA

Mnoga saznanja o ulogama prolina u odgovoru na abiotički stres dobivena su istraživanjima na genetski modificiranim biljkama. Transgenični duhan, riža, pšenica, soja, mrkva pokazale su mnogo veću toleranciju na stresne uvjete poput suše i visokog saliniteta. Istraživanja na genetski modificiranom duhanu dokazala su postojanje inhibicije P5CS konačnim produktom, tj. prolinom (Hong i sur., 2000), a istraživanjima na uročnjaku otkrivene su funkcije i regulacije mnogih enzima metabolizma prolina (Verbruggen i Hermans, 2008). Sva ta istraživanja provedena su u strogo kontroliranim uvjetima, no stvorila su podlogu za buduća istraživanja koja bi mogla omogućiti stvaranje komercijalnih genetski modificiranih poljoprivrednih sorti koje će zbog bolje tolerancije stresnih uvjeta biti uzgajane na mnogo širem području i davati bolje prinose. Dobar primjer stvaranja boljih sojeva je transgenična riža s pojačanom ekspresijom gena za enzim OAT koja je bila otpornija na sušu i salinitet te je u stresnim uvjetima davala veći prinos od kontrolnih biljaka (Wu i sur., 2003). Sawahel i Hassan (2002) još su početkom stoljeća istraživali sojeve pšenice koji su zahvaljujući pojačanoj sintezi prolina otporniji na visoki salinitet. De Ronde i sur. (2004) stvorili su soj soje koji je ekspimirao P5CR pod promotorom koji odgovara na toplotni stres te je stvarao više prolina u stresnim uvjetima i bolje podnosio sušu kao i toplotni stres. U biljke su unošeni različiti geni P5CS te su stavljeni pod različite promotore kako bi se povećala transkripcija. U velikoj većini slučajeva, transgenične su biljke imale višestruko veće koncentracije prolina te su bolje rasle u uvjetima suše, hladnoće, visokog saliniteta i teških metala. Buduća istraživanja uloge prolina i primjene otkrića vjerojatno će omogućiti stvaranje tolerantnijih i uspješnijih sojeva, pritom ne mijenjajući pozitivna svojstva pojedine vrste.

Istraživani su i učinci egzogenog dodatka prolina. U velikom broju slučajeva egzogeno dodani prolin poboljšao je rast biljaka u uvjetima visokog saliniteta, dodatka teških metala i sl. te je čak uspješno eliminirao dio ROS i djelovao na povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima poput superoksid dismutaze i peroksidaze (Hua i Guo, 2002). Ipak, primijećeno je da u previsokim koncentracijama egzogeno dodani prolin može zaustaviti rast biljaka te su tako Roy i sur. još 1993. uočili da prolin u određenim koncentracijama pospješuje klijanje i rast mladica riže u uvjetima povišenog saliniteta dok previsoke koncentracije dodanog prolina smanjuju stopu rasta mladica. Iz navedenog se može zaključiti kako je prije dodavanja potrebno odrediti optimalne koncentracije prolina koje će pospješiti rast biljaka, ne nanoseći im pritom štetu.

Postoji i mogućnost da prolin sudjeluje u transkripciji nekih gena. Istraživanja su pokazala da egzogeno dodani prolin povećava transkripciju PDH (Sharma i Verslues, 2010; Satoh i sur., 2002). Do sada je u promotorskoj regiji gena PDH i još nekih gena otkriveno postojanje specifičnog slijeda koji se naziva PRE ("proline or hipoosmolarity-responsive element"). Utvrđeno je da se na taj motiv vežu transkripcijski faktori s domenom leucinskog zatvarača (Satoh i sur., 2004), no i dalje nije poznato kojim mehanizmom prolin potiče transkripciju niti u kojim koracima aktivacije transkripcije sudjeluje.

5. ZAKLJUČAK

Prolin i akumulacija prolina prilikom stresnih uvjeta imaju više različitih uloga u biljnom odgovoru na abiotički stres. Prva i najviše istraživana uloga kompatibilnog osmolita uočena je prilikom djelovanja mnogih stresnih uvjeta, od suše i visokog saliniteta pa do hladnoće i izloženosti teškim metalima. Uloga molekularnog šaperona također je značajna, prije svega jer se povezuje s drugom ulogom kojoj se pridaje sve veći značaj - održavanje količine ROS u stanici. Prolin kao šaperon stabilizira mnoge enzime koji izravno sudjeluju u eliminaciji ROS, a utvrđeno je da i sam prolin ima ulogu u eliminaciji istih, iako su potrebna daljnja istraživanja kako bi se utvrdili točni mehanizmi eliminacije i na koje točno vrste ROS može djelovati. Usko je povezana i uloga u održavanju redoks potencijala stanica, prije svega održavanjem homeostaze $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Na taj način prolin također neizravno utječe na kontrolu nastanka samih ROS, a u posljednje vrijeme istraživanja pokazuju kako može i intenzivirati nastanak istih prilikom čega dolazi do kompleksnog staničnog odgovora povezanog s programiranom staničnom smrću. Iako manje značajna od navedenih, ne smije se zanemariti niti uloga prolina kao helatora teških metala. Istraživanjem kompleksnih interakcija i signala u biljnim stanicama, uočeno je da prolin ima ulogu i u prijenosu signala, a moguće su i druge uloge.

Iako su do sada provedena brojna istraživanja o metabolizmu prolina, promjenama istog prilikom djelovanja stresnih uvjeta i ulogama samog prolina kao odgovora na stanični stres, brojna pitanja i dalje nisu u cijelosti odgovorena. Nove uloge prolina i dalje se otkrivaju, a neke od ranije poznatih se preispituju. U svakom slučaju, sigurno je da prolin ima više značajnih uloga koje biljci omogućuju preživljavanje u nepovoljnim uvjetima. Potrebno je nastaviti istraživanja i povezati uloge prolina s ulogama drugih molekula kako bi se lakše shvatile kompleksne interakcije u stanicama, ali i kako bi se uspješno definirali svi koraci u putovima biosinteze i razgradnje prolina te funkcije i načini regulacija pojedinih enzima. Napretkom genetičkog inženjerstva sve spoznaje o funkcijama prolina bit će moguće primijeniti u stvaranju novih, poboljšanih biljnih sorti. Te sorte, tolerantnije i otpornije na mnoge stresne uvjete, omogućit će uzgoj usjeva u širem klimatskom pojasu i tako pridonijeti rješavanju problema nedostatka hrane.

6. LITERATURA

- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R., Zhu, J.-K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 123, 1279-1291.
- Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* 218, 443-448.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2002). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. John Wiley & Sons Inc.
- Chen, H., Jiang, J. G. (2010). Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews* 180, 309-319.
- Chou, I. T., Chen, C. T., Kao, C. H. (1991). Characteristics of the induction of the accumulation of proline by abscisic acid and isobutyric acid in detached rice leaves. *Plant Cell Physiology* 32, 269-272.
- Dar, M. I., Naikoo, M. I., Khan, F. A., Rehman, F., Green, I. D., Naushin, F., Ansari, A. A. (2017). An introduction to reactive oxygen species metabolism under changing climate in plants, u: Reactive oxygen species and antioxidant systems in plants: Role and Regulation under Abiotic Stress, Springer, 2017, pp. 25-52.
- Dar, M.I., Naikoo, M.I., Rehman, F., Naushin, F., Khan, F.A. (2016). Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development, u: Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies. Springer, 2016, pp 155-166.
- Delauney, A. J., Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* 4(2), 215-223.
- De Ronde, J. A., Cress, W. A., Kruger, G. H., Strasser, R. J., Vam, S. J. (2004). Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology* 161, 1211-1224.
- Di Martino, C., Pizzuto, R., Pallotta, M. L., De Santis, A., Passarella, S. (2006). Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings. *Planta* 223, 1123-1133.

- Fabro, G., Kovacs, I., Pavet, V., Szabados, L., E Alvarez, M. (2004). Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant pathogen incompatible interactions in Arabidopsis. *Molecular Plant–Microbe Interaction* 17, 343-350.
- Fujita, T., Maggio, A., Garcio-Rios, M., Bressan, R. A., Csonka, L. N. (1998). Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for δ 1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. *Plant Physiology* 118, 661-674.
- Funck, D., Eckard, S., Muller, G. (2010). Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in Arabidopsis. *BMC Plant Biology* 10, 70.
- Funck, D., Stadelhofer, B., Koch, W. (2008). Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biology* 8, 40.
- Hare, P., Cress, W. (1997). Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21, 79-102.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D. P. (2000). Removal of feedback inhibition of δ (1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* 122, 1129-1136.
- Hsu, S. Y., Hsu, Y. T., Kao, C. H. (2003). The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biologia Plantarum* 46, 73-78.
- Hu, C. A., Delauney, A. J., Verma, D. P. (1992). A bifunctional enzyme (δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyses the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 9354-9358.
- Hua, B., Guo, W. Y. (2002). Effect of exogenous proline on SOD and POD activity of soybean callus under salt stress. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* 17, 37-40.
- Kaul, S., Sharma, S. S., Mehta, I. K. (2008). Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. *Amino Acids* 34, 315-320.
- Kaur, G., Asthir, B. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum* 59, 609-619.

- Kemble, A. R., Macpherson, H. T. (1954). Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. *Biochemical Journal* 58, 46-49.
- Khedr, A.H., Abbas, M. A., Wahid, A. A., Quick, W. P., Abogadallah, G. M. (2003). Proline induces the expression of salt-stressresponsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany* 54, 2553-2562.
- Kishor, P. B. K., Sangam, S., Amrutha, R. N., Laxmi, P. S., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88, 424-438.
- Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamaguchi Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1996). A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8, 1323-1335.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & Redox Signaling* 19, 998-1011.
- Mattioli, R., Falasca, G., Sabatini, S., Altamura, M. M., Costantino, P., Trovato, M. (2009). The proline biosynthetic genes P5CS1 and P5CS2 play overlapping roles in *Arabidopsis* flower transition but not in embryo development. *Physiologia Plantarum* 137, 72-85.
- Miller, G., Honig, A., Stein, H., Suzuki, N., Mittler, R., Zilberstein, A. (2009). Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 284, 26482-26492.
- Miller, G., Stein, H., Honig, A., Kapulnik, Y., & Zilberstein, A. (2005). Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate free proline accumulation. *Planta* 222(1), 70-79.
- Ozturk, L., Demir, Y. (2002). *In vivo* and *in vitro* protective role of proline. *Plant Growth Regulation* 38, 259-264.
- Palmieri, L., Todd, C.D., Arrigoni, R., Hoyos, M.E., Santoro, A., Polacco, J.C., Palmieri, F. (2006). *Arabidopsis* mitochondria have two basic amino acid transporters with partially

- overlapping specificities and differential expression in seedling development. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1757, 1277-1283.
- Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E., Frommer, W. B. (1996). Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *The Plant Cell* 8, 1437-1446.
- Roy, D., Basu, N., Bhunia, A., Banerjee, S.K. (1993). Counteraction of exogenous L-proline with NaCl in salt-sensitive cultivar of rice. *Biologia Plantarum* 35, 69-72.
- Rucińska-Sobkowiak, R. (2016). Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. *Acta Physiologiae Plantarum* 38, 1-13.
- Satoh R., Fujita Y., Nakashima K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2004). A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* 45, 309-317.
- Satoh, R., Nakashima, K., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene encoding proline dehydrogenase in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 130, 709-719.
- Sawahel, W. A., Hassan, A. H. (2002). Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. *Biotechnology Letters* 24, 721-725.
- Sharma, S., Verslues, P.E. (2010). Mechanisms independent of ABA or proline feedback a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell and Environment* 33, 1838-1851.
- Sharma, S. S., Schat H., Vooijs, R. (1998). In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry* 49, 1531-1535.
- Signorelli, S., Coitino, E.L., Borsani, O., Monza, J. (2014). Molecular mechanisms for the reaction between •OH radicals and proline: insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. *Journal of Physical Chemistry* 118, 37-47.

- Signorelli, S., Arellano, J. B., Borsani, O., Monza, J. (2013). Proline does not quench singlet oxygen: evidence to reconsider its protective role in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 64, 80-83.
- Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., Savouré, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of Botany* 115, 433-447.
- Strizhov, N., Abraham, E., Okresz, L., Blicking, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C., Szabados, L. (1997). Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 12, 557-569.
- Szabados, L., Savoure, A. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15, 89-97.
- Szekely, G., Abraham, E., Cseplo, A., Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jasik, J., Schmelzer, E., Koncz, C., Szabados, L. (2008). Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant Journal* 53, 11-28.
- Verbruggen, N., Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753-759
- Verslues, P. E., Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book*, 8, e0140.
- Wu, L. Q., Fan, Z. M., Guo, L., Li, Y. Q., Zhang, W. J., Qu, L. J., Chen, Z. L. (2003). Over-expression of an *Arabidopsis* delta-OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice. *Chinese Science Bulletin* 48, 2594-2600.
- Yadav, S. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* 76, 167-179.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 216, 1214-1222.

Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1997).
Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell
Physiology* 38, 1095-1102.

7. SAŽETAK

Biljke u prirodnom okolišu vrlo su često izložene različitim stresnim uvjetima i preživljavanje u takvim uvjetima omogućuju im brojne prilagodbe. Prolin, osim što je jedna od proteogenih aminokiselina, ima više važnih uloga u biljkama. U ovom su radu opisani metabolički putovi prolina te mehanizmi njegovog djelovanja u stresnim uvjetima. Brojne uloge prolina najčešće su rezultat njegovog nakupljanja u biljnoj stanici koje izravno ovisi o samom metabolizmu prolina, tj. biosintezi, transportu i razgradnji. Brojna istraživanja potvrdila su ulogu prolina u uvjetima visoke ili niske temperature, manjka vode, povišenog saliniteta i prisutnosti teških metala. Najviše je istraživana uloga prolina kao kompatibilnog osmolita, no on ima i brojne druge uloge. Prolin je molekularni šaperon koji stabilizira brojne enzime mnogih metaboličkim putova, a također sudjeluje u neutralizaciji ROS. Metabolizam prolina važan je i za održavanje NADP^+ / NADPH ravnoteže tijekom stresnih uvjeta, a nakupljeni prolin može biti izvor energije za biljku po završetku djelovanja stresnih uvjeta. Otkrića o ulogama prolina i njegovom metabolizmu moguće je primijeniti za stvaranje novih, poboljšanih sorti koje će biti rodnije i lakše za uzgoj, a daljnja istraživanja detaljnije će razjasniti uloge prolina. Postoji mogućnost otkrića i novih uloga prolina u biljkama izloženim kako abiotičkom, tako i biotičkim stresnim uvjetima.

8. SUMMARY

Plants in natural habitat are very often exposed to different stressful conditions and their survival in such conditions is enabled by many adjustments. Proline, except being one of proteinogenic amino acids, has many important functions in plants. In this article are described metabolic pathways of proline and mechanisms by which it acts during stressful conditions. Many functions of proline are mainly the result of its accumulation in plant cell that depends directly on its metabolism, i.e. biosynthesis, transport and catabolism. Many researches have confirmed function of proline in conditions of high or low temperature, water deficit, high salinity and heavy metals. The most studied proline function is the one of proline as compatible osmolyte, but it has many other functions as well. Proline is molecular chaperone able to stabilize numerous enzymes of many metabolic pathways and it also takes part in ROS scavenging. Proline metabolism also plays role in maintaining NADP^+ / NADPH balance during stressful conditions, while accumulated proline serves as energy source for plant once the stressful conditions are over. Discoveries of

proline functions and its metabolism can be used for creation of new, improved cultivars that will have higher yields and will be easier to grow and further researches will clarify exact functions of proline. There is also a possibility of discovering new, yet unknown proline functions in plants exposed to different stressful conditions, both biotic and abiotic.