

Geny roślinne kodujące niektóre enzymy szlaku metabolizmu fenylopropanoidów

Dorota Narożna

Cezary J. Mądrzak

Katedra Biochemii i Biotechnologii

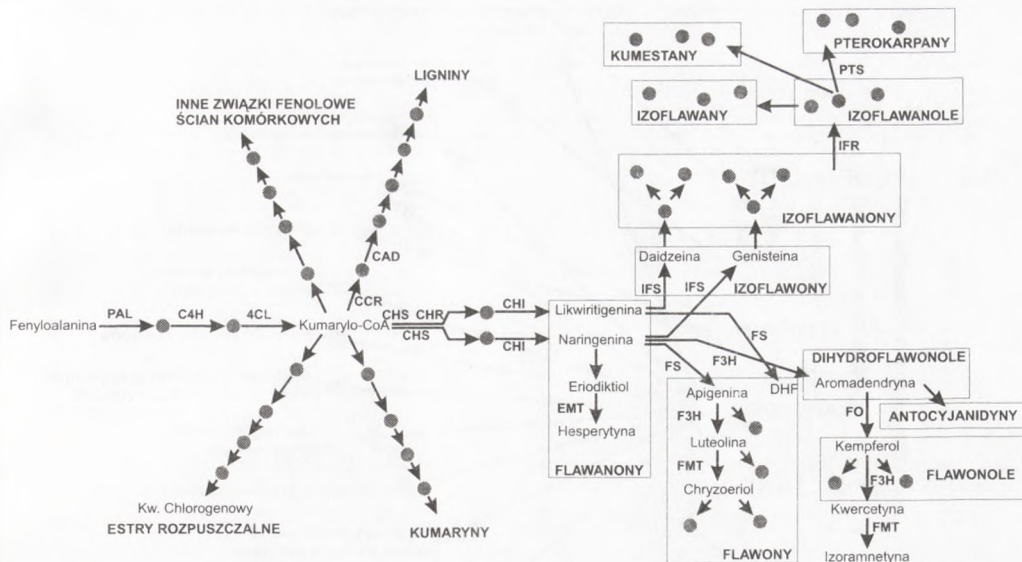
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego

Poznań

1. Wprowadzenie

Wtórne metabolity — związki, które nie są niezbędne dla rozwoju wytwarzających je organizmów i występujące tylko w niektórych grupach taksonomicznych (1), to ogromna grupa produktów naturalnych wzbudzająca rosnące zainteresowanie nauki. Tak określona klasa związków chemicznych, jakkolwiek jej definicja może budzić uzasadnione kontrowersje, jest wyróżniana szczególnie często w roślinach i mikroorganizmach (2,3). Zainteresowanie wtórnymi metabolitami wynika stąd, że starowią one wielki i ciągle niewykorzystany rezerwuar struktur chemicznych, które mogą znaleźć zastosowanie w działalności człowieka, jako leki nowej generacji, barwniki, substancje zapachowe, a także środki ochrony roślin (2,4-6).

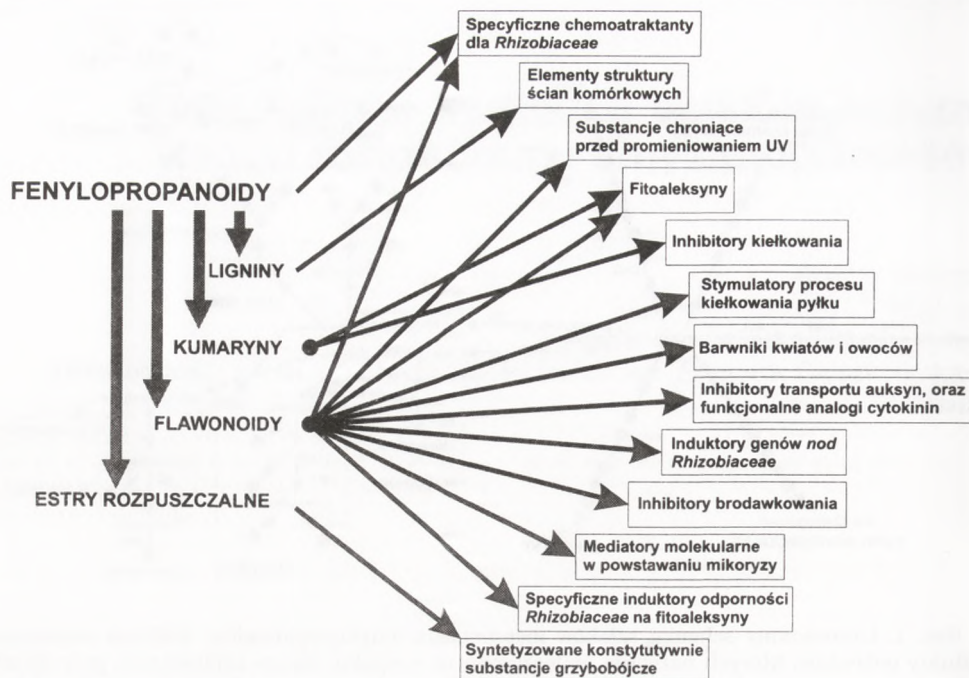
Organizmy roślinne są zdolne do syntezy licznych wtórnych metabolitów, w przebiegu wielu szlaków metabolicznych. Należą do nich szlaki syntezy terpenoidów, alkaloidów, pochodnych kwasu benzoowego, kwasu jasmownowego, czy fenylopropanoidów (4). Wspomniana wątpliwość co do prawidłowości definicji tej grupy związków, może być uzasadniona tym, że te same szlaki metaboliczne mogą prowadzić do syntezy produktów tradycyjnie klasyfikowanych jako wtórne metabolity, a jednocześnie mogą być źródłem substancji niezbędnych dla funkcjonowania wytwarzającego je organizmu. Przykładem może tu być metabolizm terpenoidów, który dostarcza, między innymi, również steroli błonowych, giberelin i kwasu abscysynowego. Wśród wielu szlaków metabolicznych prowadzących do syntezy wtórnych metabolitów, bardzo interesujący ze względu na różnorodność poznanych funkcji jego produktów, jest szlak metabolizmu fenylopropanoidów.



Rys. 1. Uproszczony schemat szlaków metabolizmu fenylopropanoidów. Kółkami oznaczono produkty pośrednie, których nazw nie umieszczono na rysunku. Skrótly umieszczone przy strzałkach oznaczają enzymy zaangażowane w poszczególne przekształcenia: 4CL — ligaza 4-kumaran; CoA; C4H — 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego; CAD — dehydrogenaza kwasu cynamonowego; CCR — reduktaza 4-kumarylo CoA; CHI — izomeraza chalkonowa; CHR — reduktaza chalkonowa; CHS — syntaza chalkonowa; EMT — metylotransferaza eriodiktiołowa; F3H — 3-hydroksylaza flawonoidowa; FMT — 3'-O-metylotransferaza flawonoidowa; FO — oksydaza flawonoidowa; FS — syntaza flawonowa; IFS — syntaza izoflawonowa; IFR — reduktaza izoflawonoidowa; PAL — amoniako-liaza fenyloalaninowa; PTS — syntaza pterokarpanowa. Skrót DHF oznacza dihydroflawon.

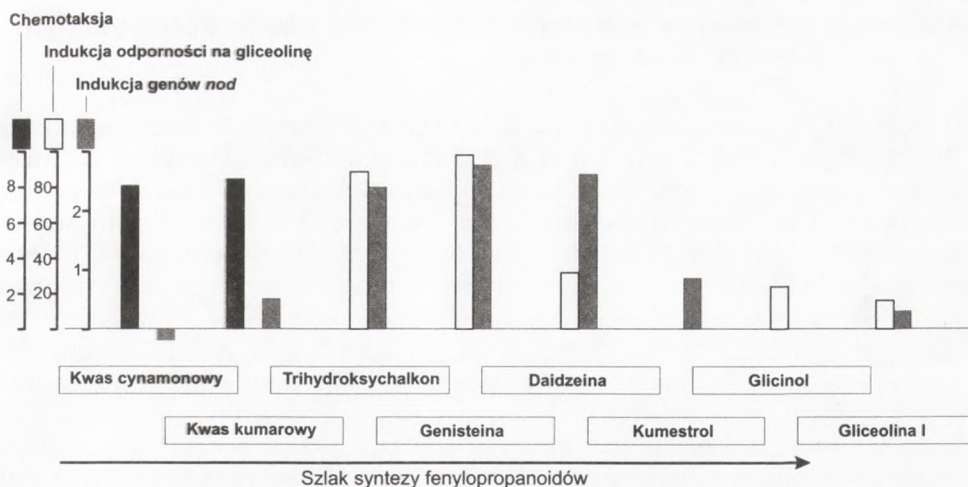
2. Szlak metabolizmu fenylopropanoidów i biologiczna rola jego produktów

Metabolizm fenylopropanoidów umożliwia roślinom syntezę licznych związków o istotnej roli biologicznej (7). Fenyloalanina, przekształcana najpierw w kumarylo-CoA jest wyjściowym substratem dla licznych i różnorodnych pochodnych syntetyzowanych w toku rozgałęzionych szlaków przemian metabolicznych (rys. 1). Metabolizm fenylopropanoidów cechuje się tym, że poszczególne jego szlaki wykazują dużą specyficzność. Przebiegają w ściśle zdefiniowanych tkankach rośliny, w określonych stadiach różnicowania się komórek, lub pod wpływem konkretnych bodźców płynących ze środowiska. Nie dziwi zatem, że pochodne fenylopropanoidów spełniają w organizmach roślinnych różnorakie, często bardzo wyspecjalizowane funkcje. Niektóre z nich są pigmentami inne uczestniczą w tworzeniu i modyfikacjach ścian komórkowych, jeszcze inne pełnią ważne funkcje regulatorowe, w tym również, jako sygnały molekularne w komunikacji rośliny ze środowiskiem zew-



Rys. 2. Poznane funkcje biologiczne niektórych produktów szlaku metabolizmu fenylopropanoidów.

nętrznym. Z zestawienia przedstawionego na rysunku 2 wynika, że wśród pochodnych fenylopropanoidów szczególnie liczne funkcje w królestwie roślin spełniają flawonoidy (7-10). Ich znaczenie w funkcjonowaniu organizmów roślinnych nie zostało jeszcze w pełni wyjaśnione. Oto bowiem do znanych już wcześniej funkcji flawonoidów jako barwników, protektantów przeciw promieniowaniu UV czy repelentów owadów, należy dodać, coraz lepiej poznawane, ich działanie regulacyjne. Różne flawonoidy działają jako aktywatory i inhibitory interakcji roślin z drobnoustrojami (11-15), w tym również jako antybakteryjne fitoaleksyny (16,17). Stwierdzono udział flawonoidów w regulacji fitohormonalnej. Sugeruje się, że mogą one działać zarówno bezpośrednio (w sposób zbliżony do cytokinin (18,19)), jak i pośrednio — pełniąc funkcję inhibitorów transportu auksyn (20,21), a zatem wpływając na równowagę fitohormonalną w poszczególnych tkankach roślinnych. Pojawia się także coraz więcej danych wskazujących na udział flawonoidów jako regulatorów różnorodnych procesów fizjologicznych, np. kiełkowania pyłku (22,23). Można wreszcie wspomnieć o zjawisku nie związanym bezpośrednio z funkcjonowaniem organizmów roślinnych, jednak wspomagającym w istotny sposób tezę o swoistej predyspozycji flawonoidów do pełnienia funkcji sygnałowych. Niektóre z tych związków, dostając się z pokarmem do organizmów zwierzęcych mogą wywoływać efekty zbliżone do działania hormonów stery-



Rys. 3. Udział różnych produktów szlaku syntezy kumestanów i pterokarpanów soi w komunikacji molekularnej z mikrosymbiontem *Bradyrhizobium japonicum* (opracowano na podstawie (29,30)). Również niektóre pochodne kwasów hydroksycynamonowych (koniferol, kwas chlorogenowy i kwas ferulowy) funkcjonują jako silne chemoatraktanty dla *Bradyrhizobium japonicum* i słabe induktory ich genów *nod*. Niektóre inne (kwas kafeinowy, kwas sinapinowy) pozostając silnymi chemoatraktantami nie indukują tych genów. W doświadczeniach zastosowano 10 μ M stężenia wszystkich badanych substancji. Względna aktywność chemotaktyczną przedstawiono jako współczynniki chemotaksji obliczone metoda Meisbowa i Adlera. Odporność na gliceolinę przedstawiono jako procent komórek przeżywających trzygodzinną inkubację w 300 μ M roztworze tej fitoaleksyny. Indukcja genów *nod* była mierzona jako aktywność konstruktów *nodD-lacZ* i została przedstawiona w tys. j. aktywności β -galaktozydazy.

dowych. Te spośród flawonoidów, które w ten sposób działają, nazywa się fitoestrogenami (24). Genisteina i kumestrol wykazują ponadto dający się zmierzyć wpływ na metabolizm komórek zwierzęcych (25-28).

Co bardzo interesujące, w niektórych przypadkach udaje się wykazać specyficzną rolę co najmniej kilku produktów pośrednich omawianego szlaku metabolicznego, w powiązanych ze sobą zjawiskach. Przykładem takiej sytuacji może być rola niektórych pochodnych fenylopropanoidów w różnych aspektach oddziaływań soi z *Bradyrhizobium japonicum* (29,30)(rys. 3).

Jakkolwiek generalnie wskazuje się na ograniczone znaczenie wtórnych metabolitów w chemotaksonomii (31), to jednak skład populacji flawonoidów syntetyzowanych przez określony organ danego gatunku rośliny jest cechą na tyle charakterystyczną, że był wykorzystywany w badaniach nad ustaleniem filogenezy roślin motylkowatych (32,33).

Flawonoidy występują często w formie glikozydów, co podnosi ich odporność na rozpad pod wpływem światła i lizę alkaliczną, a ponadto poprawia ich rozpuszczalność.

2.1. Biosynteza różnych flawonoidów w roślinie podlega różnicowanym mechanizmom regulacyjnym

Biosynteza fenylopropanoidów zachodzi bądź w sposób tkankowospecyficzny, bądź też proces ten, jako jeden z elementów odpowiedzi rośliny na stres, jest indukowany przez czynniki zewnętrzne. Metabolizm tych związków podlega bardzo precyzyjnej regulacji w czasie różnicowania się komórek. W tym samym organizmie roślinnym mogą jednocześnie (w różnych tkankach), lub w różnym czasie (w różnych stadiach różnicowania się komórek) przebiegać alternatywne szlaki biochemiczne syntezy szerokiego spektrum produktów. Przykładem ilustrującym to twierdzenie mogą być dane na temat dystrybucji flawonoidów w rozwijających się tkankach i eksudatach soi (34). Dominującymi flawonoidami (szczególnie w tkankach embrionalnych) są izoflawony: daidzeina i genisteina. Są one także intensywnie wydzielane przez pęczniejące nasiona (szczególnie w postaci glikozydów). W różnicujących się tkankach liścia daje się zauważyć zmiana polegająca na zastąpieniu izoflawonów przez flawonole. W pięć dni po kiełkowaniu zaczynają dominować glikozydy kempferolu, kwercetyny i izoramnetyny. Organem, w którym konstytutywna biosynteza flawonoidów zachodzi u wielu roślin naczyniowych szczególnie wydajnie, jest korzeń. Zdziwiająca może być przy tym złożoność populacji tych związków (35). Szczególnie wielu danych na temat biologicznej roli flawonoidów dostarczają badania nad roślinami motylkowatymi. Flawonoidy, oprócz pełnienia innych funkcji, są w tej grupie roślin ważnymi składnikami eksudatów korzeniowych decydujących o biochemicznych właściwościach ryzosfery. Ich obecność ma fundamentalne znaczenie w komunikacji z mikroorganizmami glebowymi (12,36-41). Ta funkcja flawonoidów nie jest zresztą swoista wyłącznie dla motylkowatych. Warto pamiętać, że symbioza z *Rhizobium* nie jest jedynym przykładem interakcji roślin z mikroorganizmami. Sekrecja specyficznych zestawów metabolitów (w tym również flawonoidów) do ryzosfery, jest najprawdopodobniej właściwością wszystkich roślin. Tezę tę wspierają coraz liczniejsze dane na temat mikroorganizmów klasy PGPR, aktinoryzy, a także powszechnej w świecie roślin mikoryzy arbuskularno-wesykularnej (VAM).

Biosynteza flawonoidów w organizmie rośliny może być konstytutywna, lecz z reguły nie jest systemiczna. Wspomniano, że populacja produktów tego szlaku metabolicznego, zmienia się wraz z rozwojem i różnicowaniem się tkanek. Można sądzić, że ekspresja genów decydujących o organospecyficznej, konstytutywnej syntezie flawonoidów w czasie rozwoju rośliny podlega regulacji na poziomie transkrypcji, realizowanej przez zespoły czynników transkrypcyjnych odpowiadających za proces organogenezy.

Odrębnym zagadnieniem jest obserwowane często zjawisko zmian w poziomie syntezy poszczególnych flawonoidów pod wpływem czynników zewnętrznych. Po infekcji rośliny przez mikroorganizmy symbiotyczne zaobserwowano zjawisko indukcji syntezy dodatkowych flawonoidów (poza syntetyzowanymi konstytutywnie w komórkach korzenia) (42). Na przykład, po inokulacji *Phaseolus vulgaris* przez *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* w eksudacie korzeniowym stwierdzono podwyższony poziom daidzeiny i kumestrolu (43). Podobnie

w korzeniach wyki zaobserwowano syntezę dodatkowych flawonoidów po infekcji przez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (44). Dobrym przykładem może być także zjawisko indukowanej sekrecji fitoaleksyn fenylopropanoidowych — związków syntetyzowanych przez roślinę w odpowiedzi na atak patogena, a także w wyniku zadziałania innych czynników stresowych (16,30,33,45-47).

3. Niektóre enzymy szlaku syntezy fenylopropanoidów i ich geny

Komórkowospecyficzna synteza poszczególnych metabolitów fenylopropanoidowych wymaga obecności w każdym przypadku kompletnego zestawu enzymów zdolnych do przeprowadzenia wszystkich niezbędnych reakcji biochemicznych. Wolno jednak stwierdzić, że głównymi enzymami w biosyntezie fenylopropanoidów, prowadzącej do pojawienia się flawonoidów, są amoniako-liaza fenyloalaninowa (PAL) i syntaza chalkonowa (CHS) (7,8). PAL katalizuje pierwszą reakcję szlaku, którą jest deaminacja fenyloalaniny prowadząca do powstania kwasu cynamonowego. CHS katalizuje natomiast kondensację trzech cząsteczek malonylo-CoA z jedną cząsteczką p-kumarylo-CoA (czasem również cynamonylo-CoA, ferulolylo-CoA i kafeinylo-CoA). Powstające chalkony naringeniny lub likwiritigeniny (przy dodatkowym udziale reduktazy chalkonowej), są prekursorami flawonoidów i izoflawonoidów (por. rys. 1). Szczególne znaczenie wymienionych enzymów wynika stąd, że w każdym przypadku pojawiającego się zapotrzebowania na pochodne fenylopropanoidowe, to właśnie PAL i CHS muszą dostarczyć substratów niezbędnych do dalszych etapów syntezy.

Specyficzność komórkowa metabolizmu fenylopropanoidów, a także różnorodność czynników indukujących ich syntezę, implikuje jeszcze jedno ważne stwierdzenie: Można założyć, że głównym elementem regulacji szlaku jest organospecyficzna ekspresja genów kodujących enzymy uczestniczące w jego reakcjach. To założenie z kolei, skłania do konstatacji, że wobec tego poszczególne enzymy są produktami ekspresji rodzin genów (*multigene family*).

W świetle danych literaturowych, oba założenia, jak się wydaje, są słuszne. Pierwsze może być potwierdzone, na przykład, przez fakt, że transkrypty genów kodujących CHS identyfikowane *in situ*, są zlokalizowane wyłącznie w ściśle określonych tkankach badanych roślin (48-51). Drugie założenie, o istnieniu rodzin genów, także zostało potwierdzone. Wiadomo, że geny kodujące amoniako-liazę fenyloalaninową stanowią rodzinę wielogenową w soi (52), lucernie (53), grochu (47), fasoli (54,55), a nawet u nagonasiennych (*Pinus banksiana*) (56). Jeszcze więcej danych zebrano na temat genów kodujących syntazę chalkonową. Tylko nieliczne gatunki roślin, jak się zdaje, zawierają pojedynczą kopię genu CHS. Dotyczy to *Arabidopsis* (57), *Antirrhinum* (za (58)) i pietruszki, choć w genomie tej rośliny stwierdza się istnienie dwóch alleli różniących się obecnością w jednym z nich elementu o strukturze podobnej do transpozonu (59). U większości zbadanych pod tym względem gatunków, syntaza chalkonowa jest kodowana przez rodziny genów. Taką sytuację stwierdzono w grochu (60,61), koniczynie (62), lucernie

(17,63,64), soi (52,65,66), fasoli (67) i łubinie (D. Narożna, C.J. Mądrzak — dane przygotowywane do publikacji). Aby odsunąć podejrzenie, że właściwość ta może być charakterystyczna wyłącznie dla roślin motylkowatych wykorzystujących pochodne fenylpropanoidów w różnorodnych procesach, warto zacytować dane stwierdzające, że również w takich roślinach, jak *Ipomoea* (58), *Petunia* (68) i orzech (*Juglans nigra* x *Juglans regia*)(69), CHS jest kodowana przez rodziny genów. Dane na temat domniemanej liczby kopii genów kodujących PAL, CHS, i niektórych innych enzymów szlaku syntezy fenylpropanoidów, w różnych gatunkach roślin, zebrano w tabeli 1.

TABELA 1

LICZBA GENÓW KODUJĄCYCH ENZYMY SZLAKU SYNTEZY FENYLOPROPANOIDÓW W NIEKTÓRYCH GATUNKACH ROŚLIN

Gatunek rośliny	Enzym	Liczba genów	Literatura
<i>Pinus banksiana</i>	PAL	8 – 10	(56)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CHS	1	(57)
<i>Hordeum vulgare</i>	CHS	7 – 9	(73)
<i>Solanum tuberosum</i>	PAL	>20	
	4CL	2	(7)
<i>Antirrhinum maius</i>	CHS	1	(za 58)
<i>Petunia hybrida</i>	CHS	7	
	CHI	1 – 2	(7)
<i>Petroselinum hortense</i>	CHS	1	(59)
<i>Petroselinum crispum</i>	4CL	2	
	CHS	1	(7)
<i>Juglans nigra</i> X <i>Juglans regia</i>	CHS	4	(69)
<i>Ipomoea purpurea</i>	CHS	>3	(58)
<i>Glycine mcx</i>	PAL	>3	(52)
	CHS	>7	(52,89)
<i>Pisum sativum</i>	PAL	>2	(47)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	CHS	>7	(67,88)
	PAL	>3	
	CHI	1	
	CAD	1	(7)
<i>Trifolium subterraneum</i>	CHS	9	(78)
<i>Lotus corniculatus</i>	CHS	4-8	(90)
<i>Medicago sativa</i>	CHS	8 – 12	
	CHI	1 – 2	(85)
	PAL	>3	
	C4H	2	
	CHR	>2	
	IFR	1	(17)

4. Ekspresja genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy fenylopropanoidów

Dogodną metodą badania zmian poziomu biosyntezy flawonoidów w roślinie jest analiza produktów transkrypcji (mRNA) genów kodujących enzymy katalizujące poszczególne reakcje. Schemat postępowania jest w zasadzie uniwersalny. Grupa osobników badanego gatunku rośliny jest poddawana działaniu czynnika indukującego, w wybranych interwałach czasowych (z reguły rzędu godzin) pobierane są próbki tkanek, z których izoluje się RNA. Obecność sekwencji kodującej wybrany enzym bada się poprzez hybrydyzację z sondą DNA. W ten sposób, starannie przeprowadzony eksperyment może zaowocować uzyskaniem danych zarówno jakościowych (fakt zajścia transkrypcji i jej czas), jak i ilościowych (daje się określić względny poziom hybrydujących sekwencji). Doskonałą alternatywą dla tej metody jest, rzecz jasna hybrydyzacja *in situ*, która dodatkowo precyzyjnie wskazuje miejsce transkrypcji badanego genu. Ostateczne produkty ekspresji genów — białka można także wykrywać stosując techniki immunochemiczne (70). Takie podejście stało się możliwe dzięki postępowi w uzyskiwaniu białkowych produktów sklonowanych sekwencji ulegających ekspresji w *E. coli*.

4.1. Czynniki indukujące ekspresję omawianych genów

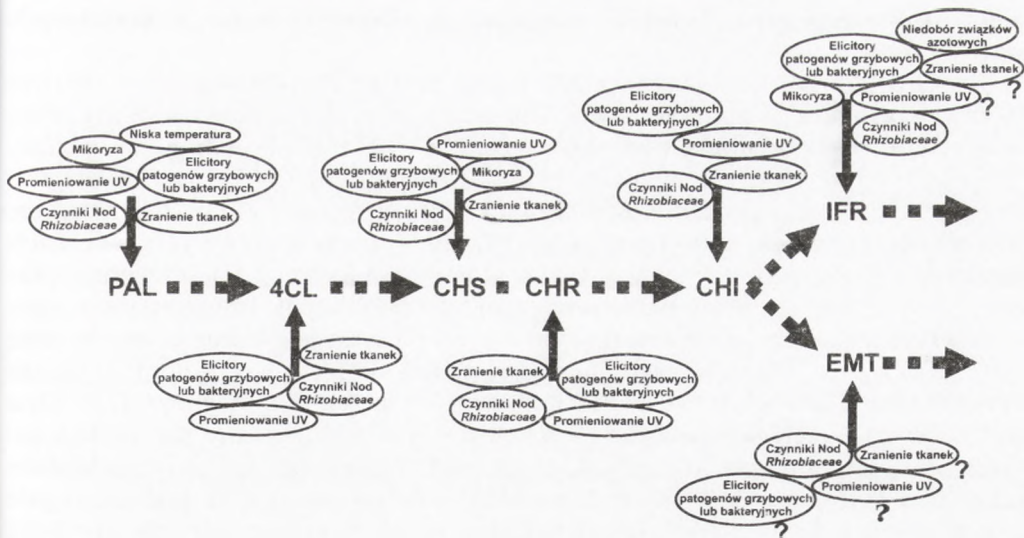
Już dawno zauważono, że efektem działania licznych i różnorodnych czynników biotycznych i abiotycznych jest podwyższenie poziomu transkrypcji genów kodujących enzymy szlaku syntezy fenylopropanoidów (71). Amonia-ko-liaza fenyloalaninowa (PAL) i syntaza chalkonowa (CHS) są indukowane przez niską temperaturę w fotosyntetyzujących komórkach liści *Arabidopsis* (72). Promotory niektórych z omawianych genów mogą być regulowane przez światło (w tym również w zakresie UV) (51,73-75). Wskazuje się przy tym jednak, że wpływ światła nakłada się tylko na inne czynniki indukujące. Dowodzą tego wyniki badań nad ekspresją PAL, CHS, CHI i DFR (reduktaza dihydroflawonolowa) w nasionach *Arabidopsis*, w których wrażliwość genu CHS na światło zmienia się z czasem (74). Niebieskie światło indukuje ekspresję genu CHS najsilniej w ciągu krótkiego okresu w początkowej fazie powstawania nasion. Podwyższoną ekspresję genów CHS i CHI (76-78), a także genów PAL (79,80) wywołuje również zranienie tkanek.

Do czynników, które szczególnie często opisuje się jako induktory ekspresji genów kodujących omawianą grupę enzymów należą elicitory pojawiające się w wyniku kontaktu rośliny z mikroorganizmami. Co ciekawe, podwyższony poziom transkrypcji tych genów obserwuje się niezależnie od tego, czy mikroorganizmem wchodzącym w interakcje jest patogen (47,73,81,82), symbiotyczny szczep *Rhizobium* (48,50,52,78), czy też grzyb mikoryzowy (83). Różna jest jednak w każdym z tych przypadków intensywność stymulującego wpływu mikroorganizmu. Interakcje typu patogenicznego indukują ekspresję znacznie silniej niż szczepy symbiotyczne. Nieefektywne mutanty tych ostatnich zacho-

wują się zresztą pod względem omawianej cechy jak patogeny. Indukcja biosyntezy flawonoidów w korzeniach *Vicia sativa* subsp. *nigra* była zróżnicowana w zależności od tego, który szczep (efektywny czy nieefektywny) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* dokonywał infekcji rośliny (44). Nieefektywny szczep powodował 1,5-2-krotnie wyższy niż szczep efektywny, poziom mRNA dla CHS oraz aktywności enzymatycznej PAL i EMT w korzeniach rośliny. Również w lucernie nieefektywny w zakresie diazotrofii (Fix⁻) szczep *Rhizobium meliloti* powodował wzmożoną ekspresję genów CHS (49). Podobne obserwacje poczyniono w przypadku grochu (48) i soi (52). W przypadku tego ostatniego gatunku stwierdzono zresztą, że wzmożona ekspresja PAL i CHS ma miejsce również w przypadku infekcji restryktywnych genotypów soi przez szczepy typu dzikiego (Sadowsky i in. dane przygotowane do publikacji). Wskazuje to na fakt, że ważny jest w istocie typ interakcji, a nie genotyp mikrosymbionta. Dodatkowym dowodem potwierdzającym takie twierdzenie są wyniki pomiarów poziomu mRNA dla PAL i CHS w czasie rozwoju brodawek korzeniowych grochu (48) i łubinu (Narożna i Mądrzak — dane przygotowane do publikacji). Stwierdza się mianowicie, że podwyższony poziom tych transkryptów obserwuje się dwukrotnie w czasie funkcjonowania brodawek korzeniowych. Najpierw w ciągu pierwszych godzin po infekcji, później w momencie, gdy pojawiają się pierwsze objawy starzenia się brodawek i niektóre z komórek tkanki bakteroidalnej ulegają lizie. Można wnioskować, że w obu tych stadiach proces symbiotyczny szczególnie mocno przypomina infekcję przez patogena. We wczesnych etapach infekcji musi nastąpić rozpoznanie symbiotycznego charakteru mikroorganizmu inicjującego kolonizację; W momencie starzenia się brodawek, produkty lizy komórek mogą zaś działać jako elicytory. W obu tych fazach podwyższonej ekspresji genów PAL i CHS w soi daje się zauważyć tworzenie gliceoliny — fitoaleksyny pterokarpanowej. Synteza fitoaleksyny w interakcji typu symbiotycznego może w pierwszej chwili wydawać się czymś niezwykłym, jednak po bliższym zapoznaniu się ze zjawiskiem indukowanej odporności *Bradyrhizobium japonicum* na gliceolinę (30) (rys. 3.) okazuje się, że może ona funkcjonować jako dodatkowy czynnik selekcyjny w odniesieniu do mikroorganizmów glebowych, działając w istocie na korzyść potencjalnego mikrosymbionta (36).

Bardzo interesujące jest również spostrzeżenie, że czynnikiem indukującym ekspresję CHS i IFR w korzeniach lucerny jest niedobór związków azotowych (84). Wynik ten, wraz z wykazaniem podwyższeniem syntezy flawonoidów wskazuje na interesujące powiązanie stanu troficznego rośliny, z jej oddziaływaniem (poprzez eksudaty korzeniowe) na populację mikrosymbionta potencjalnie obecne w ryzosferze. Jakkolwiek nie znamy molekularnego mechanizmu przenoszącego sygnał na poziom transkrypcji genów roślinnych, to jednak poczyniona obserwacja potwierdza nasze intuicyjne przekonanie o tym, że również roślina posiada możliwość wyboru momentu, kiedy wejście w interakcję z mikroorganizmami diazotroficznymi jest dla niej szczególnie korzystne.

Zestawienie niektórych czynników indukujących transkrypcje genów kodujących enzymy szlaku syntezy fenylopropanoidów przedstawiono na rysunku 4.



Rys. 4. Czynniki indukujące ekspresję niektórych genów biosyntezy fenylopropanoidów. Znakiem zapytania oznaczono domniemane efekty, na które brakuje jednak dowodów doświadczalnych. W większości przypadków nie znamy niestety molekularnej natury czynników wpływających bezpośrednio na ekspresję genów kodujących przedstawione na rysunku enzymy. **PAL** — amoniako-liaza fenyloalaninowa; **4CL** — ligaza 4-kumaran : CoA; **CHS** — syntaza chalkonowa; **CHR** — reduktaza chalkonowa; **CHI** — izomeraza chalkonowa; **IFR** — reduktaza izoflawonoidowa; **EMT** — metylotransferaza eriodiktiolowa.

4.2. Regulacja ekspresji genów kodujących niektóre enzymy syntezy fenylopropanoidów

Istnieją dane wskazujące na tkankowospecyficzną ekspresję poszczególnych elementów rodzin genów kodujących omawiane enzymy. W soi stwierdzono, że inne geny rodzin *PAL* i *CHS* ulegają indukcji w korzeniu, inne zaś w brodawce (52). Stwierdzono ponadto, że wzmocnienie transkrypcji poszczególnych tworzących je sekwencji było zależne również od typu interakcji. W przypadku, gdy mikroorganizmem infekującym roślinę był mutant *Bradyrhizobium japonicum* (Nod⁺, Fix⁻), wykrywano inny zestaw transkryptów. Podobnie w lucernie, z biblioteki cDNA z brodawek korzeniowych udaje się wyizolować cztery różne klony kodujące *CHS*, co wskazuje, że te właśnie sekwencje ulegają ekspresji indukowanej w czasie powstawania systemu symbiotycznego (50). Co więcej, poszczególne geny tej grupy wykazują różny poziom i lokalizację transkrypcji w zależności od czynników zewnętrznych.

Spośród dziewięciu zidentyfikowanych sekwencji kodujących *CHS* w koniczynie (*Trifolium subterraneum*), dominującym transkryptem odnajdywanym po infekcji przez mikrosymbionta był produkt genu *CHS5* (78). Co ciekawe, ten sam gen był indukowany przez zranienie tkanki hipokotyłu. W obrębie promotora tego genu znaleziono sekwencje o dużym podobieństwie do frag-

mentu sojowego genu *Gmchs7*, ulegającego ekspresji w soi w podobnych warunkach.

Rodziny genów kodujących CHS mogą obejmować sekwencje o różnym stopniu wzajemnego podobieństwa. Wspomniana grupa genów z lucerny obejmuje najprawdopodobniej dwie klasy genów *CHS* (85). Podobnie w łubinie, spośród trzech zidentyfikowanych genów *CHS*, dwa (*LICHS 3.1* i *LICHS 4.1*) są do siebie bardzo podobne (95% homologii), trzeci zaś (*LICHS 2.1*) różni się od nich znacznie (ok. 60% homologii). Tak jak w innych opisanych rodzinach genów dla *CHS*, różnica dotyczy także przebiegu ekspresji tej sekwencji (Narożna i Mądrzak — dane przygotowywane do publikacji). Interesującym spostrzeżeniem, dobrze korespondującym z tymi danymi jest doniesienie, że dwa geny *CHS* z jęczmienia (*Hordeum vulgare*) różnią się nie tylko poziomem transkrypcji, lecz także właściwościami kodowanych przez nie enzymów (73). Gen *HvCHS2*, w przeciwieństwie do *CHS1*, jest silnie indukowany po infekcji jęczmienia przez patogena grzybowego *Blumeria graminis*. Enzymy kodowane przez oba geny różnią się specyficznością substratową. *CHS1* preferencyjnie przekształca cynamonylo-CoA i 4-kumarylo-CoA, podczas gdy dla *HvCHS2* optymalnym substratem jest feruloylo-CoA i kafeinylo-CoA.

Istnienie rodzin genów i wykazanie, że poszczególne ich elementy ulegają transkrypcji pod wpływem różnych czynników i w różnych częściach rośliny skłania rzecz jasna, do podjęcia badań nad strukturą promotorów tych genów i molekularnymi mechanizmami ich aktywacji. W obrębie rodziny genów kodujących *PAL* w pietruszce stwierdzono istnienie co najmniej trzech silnie zachowawczych sekwencji w obrębie regionów promotorowych (86). Sekwencje te (elementy *cis*) nazwane zostały kasetami P, A i L. Co ciekawe, w *Arabidopsis* odnaleziono te elementy w promotorach genów *PAL1* i *PAL2*, oraz *C4H*. Nie stwierdzono ich obecności w promotorze genu *PAL3*, a ściślej wykryto krótką sekwencję zgodną z kasetą A, położoną jednak znacznie bliżej miejsca startu transkrypcji (87). Geny posiadające kasety P, A i L podlegały skoordynowanej ekspresji — ich indukcje wywoływało zranienie rośliny. Gen *PAL3* (a także gen *CHS*) na ten czynnik nie odpowiadały podwyższoną transkrypcją.

Analizę funkcjonalną promotorów genów kodujących *PAL* w grochu przeprowadzono badając ekspresję tych genów w protoplastach transformowanych skonstruowanymi chimerycznymi genami i indukowanych elitorami patogenicznego grzyba *Mycosphaerella pinoides* (47). Konstrukty genowe składały się z genu reporterowego (*CAT*) poddanego pod kontrolę promotorów genów *PAL*. Konstrukty poddawano również analizie delecyjnej, by określić sekwencje niezbędne dla funkcjonowania promotorów. Okazało się, że do indukcji genu *PAL1* (*PSPAL1*) niezbędne są elementy *cis* zlokalizowane w rozległym regionie od pozycji -340 do -95. Tę samą funkcję pełnił w genie *PSPAL2* region -406 do -158. Udało się ponadto stwierdzić, że powyżej promotorów badanych genów (w regionie od -2196 do -406) znajduje się element o właściwościach wzmacniających transkrypcję (*enhancer*).

Metoda transformacji roślin posłużyła również do badania elementów *cis*, a także funkcjonowania domniemanych czynników *trans* wpływających na

działanie promotora genu *CHS15* fasoli (88). Udało się stwierdzić, że gen ten jest aktywny w kiełkujących nasionach, a także w zawiązkach korzeni bocznych. Delecje w obrębie regionu promotorowego owocowały zanikiem ekspresji genu reporterowego (GUS) w zawiązkach korzeni bocznych, choć w większości przypadków utrzymywała się ekspresja w kiełkujących nasionach. Stwierdzono również, że w ekstraktach jądrowych fasoli występuje czynnik (SBF-1) specyficznie wiążący się z trzema fragmentami badanego regionu DNA. W badaniach nad pietruszką udało się stwierdzić, że w regulacji ekspresji genu *CHS* uczestniczy czynnik transkrypcyjny CPRF1 (*common plant regulatory factor*) rozpoznający specyficzne sekwencje nukleotydowe zawierające rdzeń ACGT. Takie sekwencje zlokalizowane są, między innymi w regionie LRU1 (*light regulatory unit*), którego obecność jest wymagana (i wystarczająca) dla indukowanej światłem ekspresji genu *CHS*. Lista domniemanych elementów *cis* obejmuje również sekwencje odnalezione w promotorach genów indukowanej syntezy fitoaleksyn izoflawonoidowych (17). Szereg fragmentów promotorów genów *CHS*, *PAL*, i *IFR* z fasoli, lucerny i pietruszki (choć w tym przypadku fitoaleksyny są furanokumarynami) wykazywało obecność krótkich fragmentów zachowawczych sekwencji.

Niezwykłych wyników dostarczyły badania nad dziedziczeniem barwy okrywy nasiennej u soi. Definiowany metodami genetyki klasycznej locus/(inhibitor) zawierający cztery allele decydujące o obecności lub braku barwników antocjanowych, jak się okazało, był regionem zawierającym zduplikowane geny *CHS*. Obecność dodatkowych kopii genów *CHS* obniża poziom ich ekspresji. Delecja w regionie przywraca normalny poziom ekspresji rodziny genów kodujących syntazę chalkonową w soi.

Wyniki dotychczasowych badań nie wystarczają niestety na sformułowanie modelu opisującego organospecyficzną lub indukowaną ekspresję genów *CHS*, a także genów kodujących inne enzymy szlaku syntezy fenylopropanoidów, których funkcjonowanie jest precyzyjnie skoordynowane. Można mieć jednak nadzieję, że sytuacja ta wkrótce ulegnie zmianie. Wobec ciągłego postępu w zakresie technik badawczych i gromadzenia coraz liczniejszych danych coraz lepiej poznajemy mechanizmy regulujące ekspresję genów roślinnych. Jakkolwiek cel jest jeszcze z pewnością odległy, to jednak w przypadku omawianej grupy enzymów, optymizmem napawa ich przydatność, jako modelowego obiektu badawczego.

Literatura

1. The Merck Index, (1996), 12th ed., Merck and Co. Inc., Whitehouse Station, NJ.
2. Bentley R., (1997), *Persp. Biol. Med.*, 40, 197-221.
3. Bentley R., (1997), *Persp. Biol. Med.*, 40, 364-394.
4. Rhodes M. J. C., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 24, 1-20.
5. Clark A. M., (1996), *Pharm. Res.*, 13, 1133-1141.
6. Stafford A., (1992), *Agro-Food Ind. Hi-Tech*, March/April, 9-13.
7. Hahlbrock K., Scheel D., (1989), *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40, 347-369.
8. Dewick P. M., (1994), in: *The Flavonoids. Advances in Research since 1986*, Ed. Harborne J. B., Chapman and Hall, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 117-238.

9. Dewick P. M., (1988), in: *The Flavonoids. Advances in Research Since 1980*, Ed. Harborne J. B., Chapman and Hall, London, New York, 125-209.
10. Stafford H. A., (1990), *Flavonoid Metabolism*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
11. Peters N. K., Frost J. W., Long S. R., (1986), *Science*, 233, 977-980.
12. Redmond J. W., Batley M., Djordjevic M. A., Innes R. W., Kuempel P. L., Rolfe B. G., (1986), *Nature*, 323, 632-635.
13. Kosslak R. M., Bookland R., Barkei J., Paaren H. E., Applebaum E. R., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7428-7432.
14. Peters N. K., Long S. R., (1988), *Plant Physiol.*, 88, 396-400.
15. Firmin J. L., Wilson K. E., Rossen L., Johnston A. W. B., (1986), *Nature*, 324, 90-92.
16. Darvill A. G., Albersheim P., (1984), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 243-275.
17. Dixon R. A., Harrison M. J., Paiva N. L., (1995), *Physiol. Plant.*, 93, 385-392.
18. Binns A. N., Chen R. H., Wood H. N., Lynn D. G., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 980-984.
19. Long S. R., Cooper J., (1988), in: *Proc. 4th International Conference on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Eds. Palacios R., Verma D. P. S., Acapulco Mexico, 163-178.
20. Jacobs M., Rubery P. H., (1988), *Science*, 241, 346-349.
21. Hirsch A. M., Bhuvaneswari T. V., Torrey J. G., Bisseling T., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1-5.
22. Mo Y., Nagel C., Taylor L. P., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 7213-7217.
23. Vogt T., Pollak P., Tarlyn N., Taylor L. P., (1994), *Plant Cell*, 6, 11-23.
24. Murkies A. L., Wilcox G., Davis S. R., (1998), *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 83, 297-303.
25. Nogowski L., (1994), *Arch. Vet. Polon.*, 34, 267-273.
26. Nogowski L., (1993), *J. Anim. Physiol. a Anim. Nutr.*, 70, 53-58.
27. Nogowski L., Maćkowiak P., Kandulska K., Szkudelski T., Nowak K. W., (1998), *Annals Nutr. Metab.*, 42, 360-366.
28. Nogowski L., Maćkowiak P., Nowak K. W., (1998), *J. Anim. Physiol. a Anim. Nutr.*, 80, 1-9.
29. Schlaman H. R. M., Horvath B., Vijgenboom E., Okker R. J. H., Lugtenberg B. J. J., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 4277-4287.
30. Parniske M., Ahlborn B., Werner D., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 3432-3439.
31. Käss E., Wink M., (1995), *Bot. Acta*, 108, 149-162.
32. Matsuura N., Iinuma M., Tanaka T., Mizuno M., (1995), *Biochem. Syst. Ecol.*, 23, 539-545.
33. Ingham J. L., (1981), in: *Advances in legume systematics*, Eds. Polhill R. M., Raven P. H., Royal Botanic Garden, Kew, 599-626.
34. Graham T. L., (1991), *Plant Physiol.*, 95, 594-603.
35. Tahara S., Moriyama M., Ingham J. L., Mizutani J., (1993), *Phytochemistry*, 34, 303-315.
36. Mądrzak C. J., (1995), *Molekularne mechanizmy symbiozy Rhizobiaceae z roślinami motylkowatymi*, Wyd. AR, Poznań.
37. Mulligan J. T., Long S. R., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6609-6613.
38. Innes R. W., Kuempel P. L., Plazinski J., Canter-Cremers H., Rolfe B. G., Djordjevic M. A., (1985), *Mol. Gen. Genet.*, 201, 426-432.
39. Hungria M., Joseph C. M., Phillips D. A., (1991), *Plant Physiol.*, 97, 759-764.
40. Györgypal Z., Kiss G. B., Kondorosi A., (1991), *BioEssays*, 13, 575-581.
41. Kondorosi A., Kondorosi E., John M., Schmidt J., Schell J., (1991), in: *Genetic Engineering*, vol.13, Ed. Setlow J. K., Plenum Press, New York, 115-136.
42. van Brussel A. A. N., Recourt K., Pees E., Spaink H. P., Tak T., Wijffelman C. A., Kijne J. W., Lugtenberg J. J., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 5394-5401.
43. Dakora F. D., Joseph C. M., Phillips D. A., (1993), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 6, 665-668.
44. Recourt K., van Tunen A. J., Mur L. A., van Brussel A. A. N., Lugtenberg B. J. J., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 19, 411-420.

45. Paiva N. L., Edwards R., Sun Y., Hrazdina G., Dixon R. A., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 17, 653-667.
46. Sharon A., Gressel J., (1991), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 41, 142-149.
47. Yamada T., Sriprasertsak P., Kato H., Hashimoto T., Shimizu H., Shiraishi T., (1994), *Plant Cell Physiol.*, 35, 917-926.
48. Yang W. C., Canter Cremers H. C. J., Hogendijk P., Katinakis P., Wijffelman C. A., Franssen H. J., van Kammen A., Bisseling T., (1992), *Plant J.*, 2, 143-151.
49. Grosskopf E., Ha D. T. C., Wingender R., Röhrig H., Szecsi J., Kondorosi E., Schell J., Kondorosi A., (1993), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 6, 173-181.
50. McKhann H. I., Paiva N. L., Dixon R. A., Hirsch A. M., (1997), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 10, 50-58.
51. Schnitzler J. P., Jungblut T. P., Heller W., Kofferlein M., Hutzler P., Heinzmann U., Schmelzer E., Ernst D., Langebartels C., Sandermann H., (1996), *New Phytol.*, 132, 247-258.
52. Estabrook E. M., Sengupta-Gopalan C., (1991), *Plant Cell*, 3, 299-308.
53. Klüber H. D., Lechner S., Conrad R., (1995), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 16, 167-175.
54. Cramer C. L., Edwards K., Dron M., Liang X., Dildine S. L., Bolwell G. P., Dixon R. A., Lamb C. J., Schuch W., (1989), *Plant Mol. Biol.*, 12, 367-383.
55. Edwards K., Cramer C. L., Bolwell G. P., Dixon R. A., Schuch W., Lamb C. J., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6731-6735.
56. Butland S. L., Chow M. L., Ellis B. E., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 37, 15-24.
57. Feinbaum R. L., Ausubel F. M., (1988), *Mol. Cell Biol.*, 8, 1985-1992.
58. Durbin M. L., Learn G. H., Huttley G. A., Clegg M. T., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 3338-3342.
59. Herrmann A., Schulz W., Hahlbrock K., (1988), *Mol. Gen. Genet.*, 212, 95-98.
60. Harker C. L., Ellis T. H. N., Coen E. S., (1990), *Plant Cell*, 2, 185-194.
61. An C., Ichinose Y., Yamada T., Tanaka Y., Shiraishi T., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 21, 789-803.
62. Arioli T., Howles P. A., Weinman J. J., Rolfe B. G., (1994), *Gene*, 138, 79-86.
63. Dalkin K., Edwards R., Edington B., Dixon R. A., (1990), *Plant Physiol.*, 92, 440-446.
64. Junghans H., Dalkin K., Dixon R. A., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 22, 239-253.
65. Wingender R., Rohrig H., Horicke C., Wing D., Schell J., (1989), *Mol. Gen. Genet.*, 218, 315-322.
66. Akada S., Dube S. K., (1995), *Plant Mol. Biol.*, 29, 189-199.
67. Ryder T. B., Hedrick S. A., Bell J. N., Liang X., Clouse S. D., Lamb C. J., (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 210, 219-233.
68. Koes R. E., Spelt C. E., van den Elzen P. J. M., (1989), *Gene*, 81, 245-257.
69. El Euch C., Jay-Allemand C., Pastuglia M., Doumas P., Charpentier J. P., Capelli P., Jouanin L., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 38, 467-479.
70. Cain C. C., Saslowsky D. E., Walker R. A., Shirley B. W., (1997), *Plant Mol. Biol.*, 35, 377-381.
71. Prusky D., (1994), *Induction of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase in avocado suspension cells treated with biotic and abiotic elicitors*, (Unpub).
72. Leyva A., Jarillo J.A., Salinas J., Martinez-Zapater J. M., (1995), *Plant Physiol.*, 108, 39-46.
73. Christensen A. B., Gregersen P. L., Schröder J., Collinge D. B., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 37, 849-857.
74. Kubasek W. L., Ausubel F. M., Shirley B. W., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 37, 217-223.
75. Feldbrügge M., Sprenger M., Dinkelbach M., Yazaki K., Harter K., Weisshaar B., (1994), *Plant Cell*, 6, 1607-1621.
76. Leigh J. A., Walker G. C., (1994), *T.I.G.*, 10, 63-67.
77. McKhann H. I., Hirsch A. M., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 25, 759.
78. Lawson C. G. R., Djordjevic M. A., Weinman J. J., Rolfe B. G., (1994), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 7, 498-507.
79. Lawton M. A., Lamb C. J., (1987), *Mol. Cell Biol.*, 7, 335-341.

80. Ni W. T., Fahrendorf T., Ballance G. M., Lamb C. J., Dixon R. A., (1996), *Plant Mol. Biol.*, 30, 427-438.
81. Haberer H., Schröder G., Ebel J., (1989), *Planta*, 177, 58-65.
82. van Soom C., Rumjanek N., Vanderleyden J., Neves M. C. P., (1993), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 615-624.
83. Harrison M. J., Dixon R. A., (1993), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 6, 643-654.
84. Coronado C., Zuanazzi J. A. S., Sallaud C., Quirion J. C., Esnault R., Husson H. P., Kondorosi A., Ratet P., (1995), *Plant Physiol.*, 108, 533-542.
85. McKhann H. I., Hirsch A. M., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 24, 767-777.
86. Logemann E., Parniske M., Hahlbrock K., Schulz W., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5905-5909.
87. Mizutani M., Ohta D., Sato R., (1997), *Plant Physiol.*, 113, 755-763.
88. Hotter G. S., Kooter J., Dubery I. A., Lamb C. J., Dixon R. A., Harrison M. J., (1995), *Plant Mol. Biol.*, 28, 967-981.
89. Todd J. J., Vodkin L. O., (1996), *Plant Cell*, 8, 687-699.
90. Colliver S. P., Morris P., Robbins M. P., (1997), *Plant Mol. Biol.*, 35, 509-522.

Plant genes encoding some of the enzymes of phenylpropanoid metabolism pathway

Summary

The phenylpropanoid metabolism in plants is an important source of numerous compounds of great importance in development and defense. In particular, flavonoids play a significant role as signal compounds, phytoalexins, UV-protectants, pigments etc. Numerous enzymes (PAL, CHS, CHI, CHR, IFR and many others) are involved in this branched metabolic pathway. The key enzymes of phenylpropanoid biosynthesis are phenylalanine ammonia-lyase (PAL), and chalcone synthase (CHS). Both enzymes (as well as some other of the pathway) are encoded by multigene families. The organospecific expression of different members of these families is presumably the key factor for the regulation of the entire pathway. Several *cis*-elements, and *trans*-acting factors have been already described, however it is too early to formulate the conclusive model of the overall transcriptional regulation of the phenylpropanoid metabolism.

Key words:

phenylpropanoid metabolism, flavonoids, PAL, CHS, regulation of plant gene expression, defense genes, phytoalexins, secondary metabolites.

Adres do korespondencji:

Cezary J. Mądrzak, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnictwa, im. Augusta Cieszkowskiego, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań.