

## ROLE L-FENYLALANINAMONIUMLYASY PŘI OBRANNÉ REAKCI ROSTLIN

ŠÁRKA ADÁMKOVÁ, LENKA LUHOVÁ,  
MAREK PETŘIVALSKÝ a PAVEL PEČ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity  
Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc  
adamkova@upol.cz.

Došlo 4.11.05, přijato 14.3.06.

Klíčová slova: stres, fenylpropanoidy, L-fenylalanin, fenylalaninamoniumlyasa, skořicová kyselina, tyrosin, flavonoidy, kumarová kyselina, salicylová kyselina, systémová rezistence, chalkon

### Obsah

1. Úvod
2. Obranná reakce rostlin
3. Charakteristika L-fenylalaninamoniumlyasy
  - 3.1. Aktivita L-fenylalaninamoniumlyasy při poranění rostlin
    - 3.1.1. Prevence hnědnutí tkáně
    - 3.1.2. Obranné signály rostlin
    - 3.1.3. Vznik systémové rezistence po napadení rostlin patogenem
  - 3.2. Aktivita L-fenylalaninamoniumlyasy vyvolaná ozářením
    - 3.2.1 Úloha flavonoidů při obranné reakci rostlin
  - 3.3. Aktivita L-fenylalaninamoniumlyasy při nízkých teplotách
4. Závěr

### 1. Úvod

Rostliny jsou během růstu vystaveny různým druhům poškození vyvolaného stresem. Biotický stres způsobený infekcemi přenášenými viry, bakteriemi, houbami a abiotický stres způsobený změnami teplot, UV zářením a poraněním jsou nepříznivé vlivy, které působí na rostlinu během života a způsobují poškození rostlinné tkáně nebo morfologické změny ve stavbě rostlin<sup>1</sup>. Rostliny se snaží tyto nepříznivé vlivy eliminovat. Vytvořily si proto komplexní mechanismus obrany, chránící je proti infekci nebo mechanickému poškození. Odolnost rostliny vůči stresu je spojena s rozmanitými druhy obranného mechanismu.

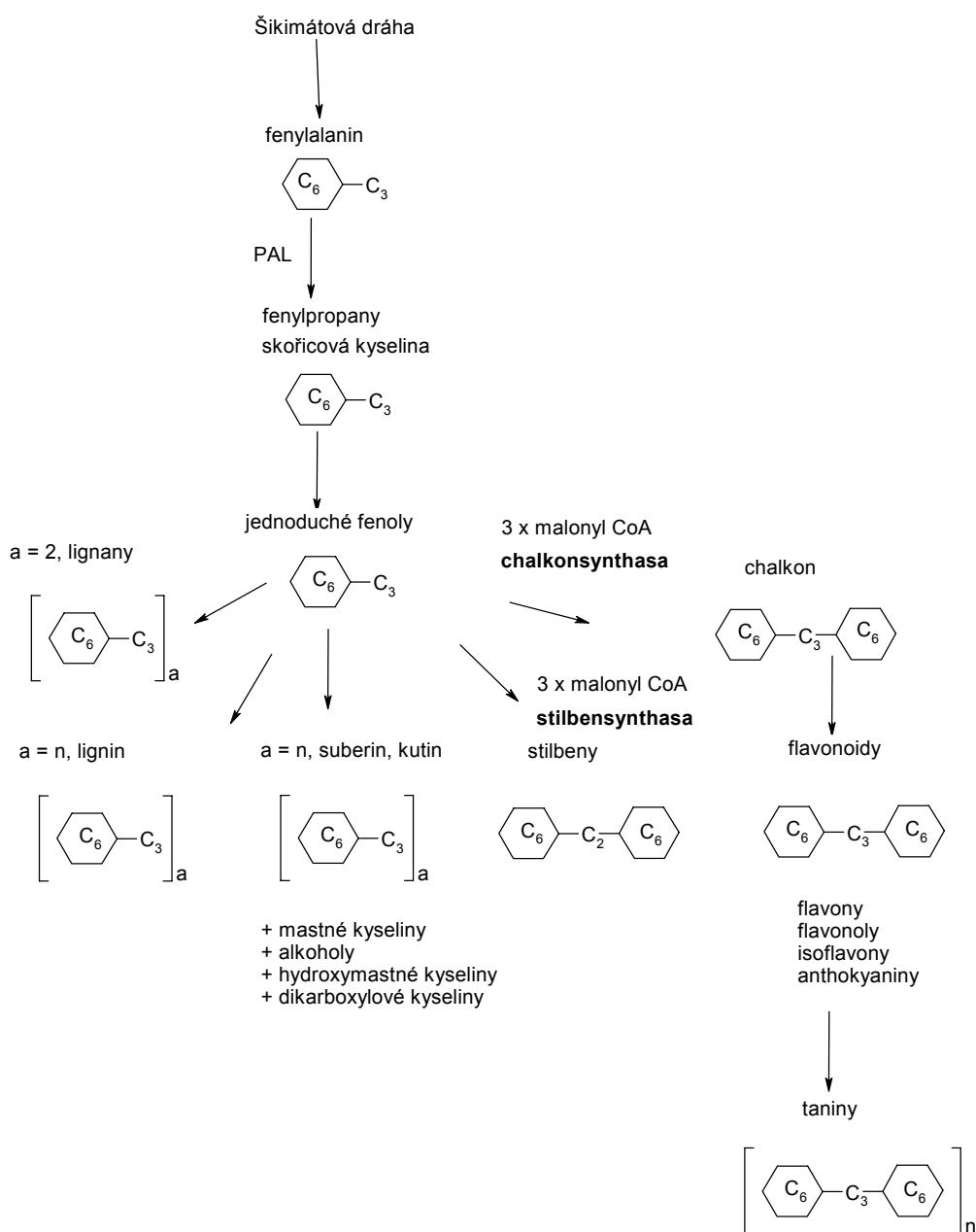
Jedním z nich je produkce fenylpropanoidních látek. Na začátku jejich syntézy se nachází enzym fenylalaninamoniumlyasa, jehož aktivita je ukazatelem obranyschopnosti rostliny vůči stresu<sup>1</sup>.

### 2. Obranná reakce rostlin

Dojde-li k napadení rostliny patogenem nebo poranění rostlinné tkáně, dochází k indukci obranného mechanismu. Mechanismy odolnosti proti stresu lze rozdělit do dvou kategorií. Prvními jsou mechanismy zabráňující tomu, aby byla hostitelská rostlina vystavena stresu („avoidance mechanisms“). Tento způsob obrany zahrnuje mechanickou bariéru rostlin, která má převážně pasivní a dlouhodobý charakter (např. silná kutikula na listech, výrazná impregnace buněčných stěn, atd.). Druhou skupinou obranných mechanismů je aktivní obrana rostlin („tolerance mechanisms“), která omezuje negativní dopad stresorů až po jejich proniknutí k plasmatické membráně buněk a do symplastu. V takovém případě dochází ke spuštění řetězce změn, tzv. stresové reakce<sup>2</sup>. K těmto reakcím patří aktivace antioxidantních obranných systémů lokalizovaných v různých buněčných strukturách. Antioxidantní obranné mechanismy zahrnují neenzymové a enzymové systémy. Mezi velmi účinné antioxidanty řadíme askorbát,  $\beta$ -karoten, redukovaný glutathion a  $\alpha$ - tokoferol. Specializované enzymy jako superoxid dismutasa (EC 1.15.1.1), peroxidasa (EC 1.11.1.7), katalasa (EC 1.11.1.6) a enzymy askorbát-glutathionového cyklu zabezpečují univerzální obranu rostlin<sup>2</sup>. K dalším reakcím na stres patří produkce fenylpropanoidních látek jako jsou flavonoidy, fytoalexiny, kumariny a strukturální komponenty typu ligninu a suberinu. Tyto látky komplexně posilují ochranu rostliny proti infekci. Mají v rostlinném organismu zejména antioxidantní a antimikrobiální funkce a dále se podílejí na posílení mechanické odolnosti<sup>3</sup>. Fenylpropanoidy jsou fenolové látky odvozené od fenylalaninu a tyrosinu obsahující C3 postranní řetězec. V rostlinném organismu jsou syntetizovány z *trans*-skořicové kyseliny, která vzniká z L-fenylalaninu reakcí katalyzovanou enzymem L-fenylalaninamoniumlyasou (PAL, EC 4.3.1.5) (obr. 1). Alternativní názvy enzymu jsou tyrasa, fenylalanindeaminasa nebo tyrosinamoniumlyasa (TAL).

### 3. Charakteristika L-fenylalaninamoniumlyasy

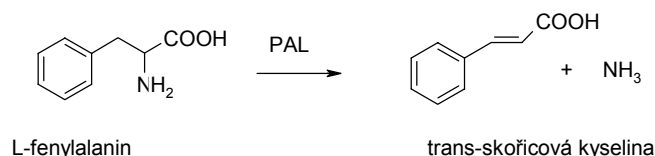
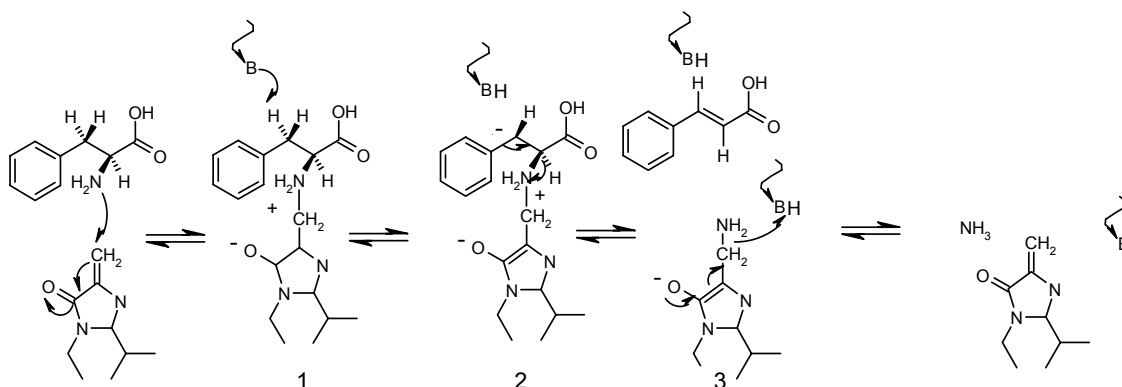
L-Fenylalaninamoniumlyasa (PAL) je enzym, který katalyzuje neoxidativní deaminaci L-fenylalaninu na *trans*-skořicovou kyselinu a amoniak<sup>4</sup> (obr. 2). Tato reakce aktivuje první krok biosyntézy fenylpropanoidních látek. Mechanismus katalýzy je popsán na obr. 3 a 4. Sku-



Obr. 1. **Tvorba fenylpropanoidů**; skořicová kyselina tvořená z fenylalaninu fenylalaninamoniumlyasou (PAL) je prekurzorem řady fenylpropanoidů. U některých rostlin se tvoří 4-hydroxyskořicová kyselina obdobnou drahou z tyrosinu. Další aromatický kruh se tvoří, buď chalkonsynthasou nebo stilbensynthasou ze tří molekul malonyl-CoA (cit.<sup>29</sup>)

pina L-aminokyselinamoniumlyas katalyzuje odštěpení protonu z  $\beta$  uhlíku a následné odštěpení aminoskupiny z aminokyseliny. Enzymy obsahují jako kofaktor 3,5-dihydro-5-methyliden-4H-imidazol-4-on (MIO), který se tvoří cyklizací a dehydratací sekvence tří konzervovaných aminokyselin (Ala-Ser-Gly). MIO je silně elektrofilní. Mechanismus PAL je obdobou mechanismu histidinamoniumlyasy (HAL, EC 4.3.1.3) (cit.<sup>5</sup>). V prvním kroku rea-

guje methylenová skupina MIO s aminoskupinou substrátu za tvorby aduktu 1. Pozitivní náboj na dusíku a schopnost aromatického vedlejšího řetězce substrátu přitahovat elektrony vede k aktivaci C3 L-Phe pro deprotonizaci bázi z aktivního místa PAL za tvorby karbanionu 2. Vazba mezi C2 substrátu a aminoskupinou se rozštěpí za tvorby látky 3 a jednoho z produktů, kterým je skořicová kyselina. Komplex MIO-NH<sub>2</sub> je protonizován kyselou

Obr. 2. Deaminace L-fenylalaninu na *trans*-skořicovou kyselinu fenylalaninamoniumlyasou

Obr. 3. Mechanismus katalýzy fenylalaninamoniumlyasou

skupinou v aktivním místě PAL za odštěpení  $\text{NH}_3$  a regenerace MIO (cit.<sup>5</sup>).

Enzym je rozšířený u vyšších rostlin, některých hub a prokaryotních organismů (tab. I). Nevyskytuje se v živočišných tkáních<sup>4</sup>. V závislosti na biologickém zdroji enzymu, PAL může katalyzovat s větší či menší účinností také reakci s tyrosinem jako substrátem. U dvouděložných rostlin je PAL vysoce specifická pro fenylalanin. U některých druhů fotosyntetických bakterií upřednostňuje PAL tyrosin za vzniku *p*-hydroxyskořicové kyseliny. U jednoděložných rostlin katalyzuje PAL přeměnu tyrosinu i fenylalaninu se stejnou účinností. Studium PAL v souvislosti s obrannými reakcemi rostlin je v současné době středem výzkumného zájmu díky její významné roli při aktivaci prvního kroku v biosyntéze ligninu, druhého nejrozšířenějšího biopolymeru po celulóze, a dalších přírodních produktů<sup>5</sup>.

### 3.1. Aktivita L-fenylalaninamoniumlyasy při poranění rostlin

Poranění je jedním ze všudypřítomných stresů, kterému je rostlina v přírodě vystavena. Změny, které jsou poraněním tkáně vyvolány, indukují promotor PAL, spouští akumulaci PAL mRNA a následně dochází ke zvýšení aktivity PAL (cit.<sup>6</sup>). Zvýšení koncentrace PAL závisí na hloubce a velikosti poranění, šíření signálů a následně

akumulaci látek zahrnutých v sekundárních procesech. V místě poranění dochází ke zhnědnutí rostlinné tkáně, které je způsobené oxidací polyfenolových látek enzymem polyfenoloxidásou (PPO, EC 1.14.18.1) a peroxidásou (POD, EC 1.11.1.7) (cit.<sup>7</sup>). Hnědnutí tkáně bylo blíže zkoumáno na salátu (*Lactuca sativa L.*). U čerstvého salátu je právě hnědnutí jedním z faktorů, který snižuje jeho kvalitu. Aktivita PAL tak může být významným činitelem při určení kvality uskladnění. U ovocných plodů jako je jablko nebo banán začne místo, kde došlo k odkrojení části plodu, hnědnout během hodiny, zatímco u kapusty nebo salátu se jedná o několikadenní proces. Tento časový rozdíl souvisí s biosyntézou polyfenolů. Jablka jsou bohatá na polyfenolové látky v porovnání se salátem<sup>8</sup>. Z kofeyl-CoA, který vzniká při syntéze fenylpropanoidů, je následně tvořena dikofeylvinná kyselina a 5-kofeylchinová kyselina. Tyto kyseliny jsou oxidovány PPO na hnědé pigmenty, které jsou chinony těchto kyselin. Enzym PAL, který stojí na počátku syntézy fenolových látek, svou zvýšenou aktivitou vyvolanou poraněním nebo odkrojením tkáně výrazně ovlivňuje rychlost těchto přeměn<sup>7</sup>. Bylo zjištěno, že obsah polyfenolových látek se během skladování poškozených vzorků salátu mění pouze se zvýšením aktivity PAL a aktivity PPO zůstává stejná. Po použití inhibitoru PAL, 2-aminoindan-2-fosfonové kyseliny (AIP), bylo hnědnutí potlačeno, zatímco inhibitor 4-hexylresorcinol použitý jako inhibitor PPO zcela hnědnutí tkáně nepotlačil. Obsah fenolových látek a PPO tedy nemají na hnědnutí žádný

Tabulka I  
Zdroje a molekulové vlastnosti PAL

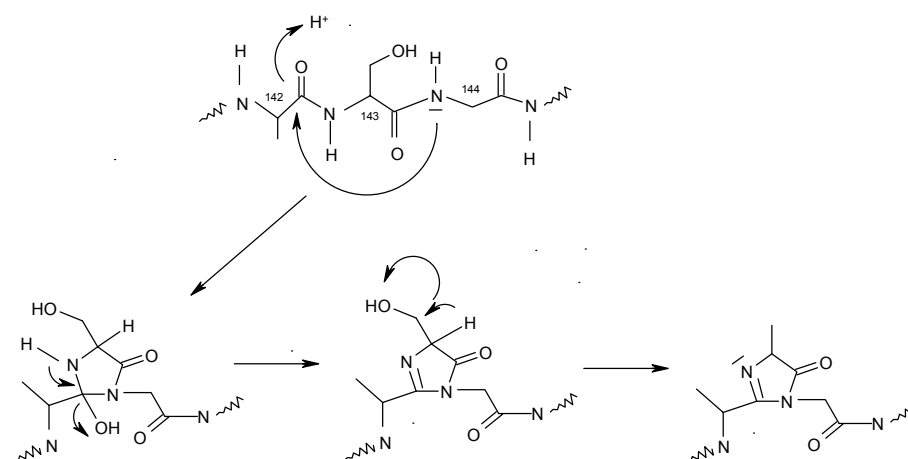
| Organismus lokalizace   | M <sub>r</sub> podjednotky | Substrát K <sub>m</sub> (mM)                               | Inhibitory  | pH optimum |
|---|----------------------------|--|---|------------|
| Okurka setá ( <i>Cucumis sativus</i> )<br>mikrosom <sup>18</sup> ,<br>hypokotyl <sup>19</sup> | 316 000                    | L-Phe 0,043–0,29   | <i>trans</i> -skořicová kyselina,<br>D-Phe, galová kyselina,<br><i>o</i> -kumarát kamferol, kvercetin   | –          |
| Ječmen obecný <sup>8,18,20</sup><br>( <i>Hordeum Vulgare</i> )<br>etioplast, chloroplast      |                            | L-Phe<br>1,7   | 4-kumarát, <i>trans</i> -kumarát,<br>3,4-dihydroxyfenyl-DL-Ala,<br>β-fenylethylamin, Ca <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> ,<br>CN <sup>-</sup> | 8,8–9,2    |
| Locika setá <sup>21</sup><br>( <i>Lactuca sativa</i> )  |                            | L-Phe<br>0,29  | 2-aminoindan-2-fosforitá<br>kyselina  | –          |
| Tolice vojtěška <sup>8,22</sup><br>( <i>Medicago sativa</i> )                                 | 316 000<br>311 000         | L-Phe<br>0,04–0,11   | 4-kumarát, tyrosin, katechin,<br>ferulát, kafeát, skořicová ky-<br>selina, <i>p</i> -hydroxybenzoát   | 8,8–9,2    |
| Tabák virginský <sup>20,23</sup><br>( <i>Nicotiana tabacum</i> )                              | 280 000<br>tetramer        | L-Phe:<br>0,011–0,22                                       | <i>o</i> -kumarát, Tyr, CN <sup>-</sup> , NABH <sub>4</sub>   | 8,8–9      |
| Rýže setá <sup>4,8,15</sup><br>( <i>Oryza sativa</i> )  | 320 000<br>tetrametr       | L-Phe<br>0,5   | 3,4-dihydroxybenzoát,<br>4-kumarát, kafeát, ferulát,<br>naringenin  | 8,9        |
| Hrách setý <sup>19,20</sup><br>( <i>Pisum sativum</i> )                                       |                            | L-Phe<br>0,052–0,8   |   | –          |
| Brambor obecný <sup>18,19,24,25</sup><br>( <i>Solanum tuberosum</i> )<br>mikrosom             | 330 000                    | L-Phe<br>0,038–0,26  | 1-amino-3-fenylethyl, fosfori-<br>tá kyselina, 1-amino-3-fenyl-<br>propylfosforitan, CN <sup>-</sup> ,<br>skořicová kyselina, D-Phe           | 8,7        |
| Kukuřice setá <sup>18,24,26</sup><br>( <i>Zea mays</i> )<br>chloroplast, thylakoid            | 306 000                    | L-Phe 0,029–0,27   |   | 7,7        |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i> <sup>27</sup>  | 165 000<br>dimer           | L-Phe<br>0,29<br>L-Tyr<br>0,18                             | <i>p</i> -chloromerkuribenzoát  | 8,5        |
| <i>Streptomyces Verticillatus</i> <sup>18,23</sup>  | 226 000                    | L-Phe<br>0,16  | 4-fluorofenylalanin, skořicová<br>kyselina, His, NABH <sub>4</sub> , CN <sup>-</sup>  | 8,5        |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> <sup>15,18,20,24,28,29</sup>                                      | 270 000–<br>300 000        | L-Phe<br>0,25:<br>L-Tyr<br>0,15<br>NH <sub>3</sub><br>3170 | glycin, <i>m</i> -kresol, <i>m</i> -kresol/<br>glycin, <i>o</i> -kresol, <i>o</i> -kresol/<br>glycin, fenol                                   | 9          |

vliv, zatímco PAL zvyšuje množství polyfenolů, které jsou dále oxidovány PPO a objeví se zhnědnutí tkáně. PAL je tedy důležitým regulátorem těchto procesů<sup>9</sup>.

### 3.1.1. Prevence zhnědnutí tkáně

Některé studie uvádí, že zvýšení teploty až na 47 °C před uskladněním může potlačit aktivitu PAL a tím také syntézu fenolových látek a následně zhnědnutí salátových listů. Efekt teplotního šoku ukázal, že dochází ke značné

redukci aktivity PAL, nebyla však zaznamenána změna obsahu fenolových látek. Zvýšený obsah fenolových látek po teplotním šoku byl nalezen ve fotosyntetických tkáních, ačkoliv zhnědnutí zde bylo méně intenzivní v porovnání s cévnatými tkáněmi<sup>9</sup>. Tento jev zřejmě souvisí s enzymem peroxidasou. POD se podílí na recyklaci askorbátu – antioxidantu snižujícího zhnědnutí odřezaných částí u ovoce a zeleniny. Navzdory velkému potenciálu fenolových látek pro zhnědnutí u fotosyntetických tkání, skutečný obsah



Obr. 4. Navrhovaný mechanismus biosyntézy 3,5-dihydro-5-methyliden-4H-imidazol-4-onu (MIO) posttranslační modifikací<sup>30</sup>; MIO byl identifikován spektrofotometricky ve struktuře PAL, ačkoliv krystalografický model enzymu nebyl dosud vyřešen. Za použití krystalografické struktury HAL byl později navržen homologický model PAL<sup>30</sup>

hnědých pigmentů je tedy menší právě díky antioxidačnímu obrannému systému. Existuje velké množství mechanismů, kterými může teplotní šok redukovat aktivitu PAL vyvolanou poraněním. Ve většině experimentů, u kterých došlo ke snížení aktivity PAL, byla teplotní změna aplikována před poraněním v době, kdy aktivita PAL byla nízká. Změna teploty tedy nemohla ovlivnit zvýšení akumulace PAL mRNA, která se objevila až několik hodin po teplotním šoku. Rozdíly v aktivitě PAL jsou zřejmě výsledkem rozdílů translace mRNA indukované poraněním<sup>6</sup>.

### 3.1.2. Obranné signály rostlin

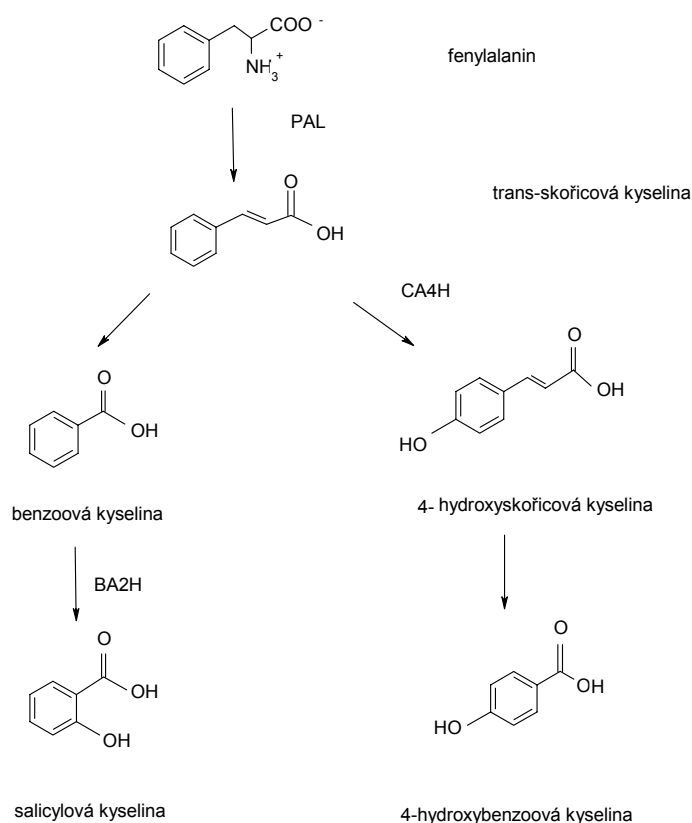
U některých rostlinných druhů byla popsána souvislost mezi aktivitou PAL a vzdáleností od místa poranění. V plátcích bramborové hlízy byla naměřena největší aktivita enzymu nejbližší poraněné části. Poraněné listy jahodníku vykazovaly zvýšenou aktivitu PAL do 0,8 cm od místa poranění a ledový salát 2,5 cm od místa poranění<sup>10</sup>. Lze předpokládat účast signálních molekul podílejících se na indukcii aktivity PAL v tkáních v okolí místa působení stresového faktoru. Poranění obvykle vyvolá zvýšení obsahu ethylenu v tkáních, takže se nabízí hypotéza vlivu ethylenu na indukcii aktivity PAL. Kinetická analýza ale prokázala, že ethylen není tímto primárním signálem<sup>10</sup>. Další látky, které mohou sloužit jako signální molekuly, jsou kyseliny salicylová, abscisová (ABA), jasmonová (3-oxo-2-/2'-cis-pentyl/-cyklopentan-1-acetát, JA) a její methyl-ester – methyljasmonát (MeJA). Jasmonová kyselina a MeJA zvyšují produkci PAL mRNA a aktivitu PAL u buněčných kultur sójových bobů a indukují akumulaci sekundárních metabolitů jako jsou *N*-substituované amidy hydroxyškořicové kyseliny (HCA), strukturně obsahující polyaminy (putrescín, spermidin a spermin), které jsou vázány kovalentní vazbou na hydroxyškořicové kyseliny, např. kyselinu kumarovou a kávovou<sup>11</sup>. Zvýšená koncentrace HCA byla pozorována po infekci patogeny<sup>11</sup>. ABA zvyšuje aktivitu PAL u buněčných kultur brambor. Někte-

ré zdroje také spojují ABA s indukcí PAL při vývoji plodu, v tomto případě dochází ke zvýšení aktivity PAL několik dnů po poškození. Tyto signální molekuly působí odlišně u mladé a u vzrostlé listové tkáně. Zatímco u mladých listů methyljasmonát, salicylová kyselina a jasmonát způsobily vzrůst aktivity PAL, akumulaci fenolových látek a zhnědnutí listu u dospělých listů tyto změny nevyvolaly<sup>6</sup>.

### 3.1.3. Vznik systémové rezistence po napadení rostliny patogenem

Systémová rezistence (systemic acquired resistance – SAR) je aktivována lokálními nekrosami způsobenými houbovou, bakteriální nebo virovou infekcí. V experimentech s transgenními rostlinami tabáku se ukázalo, že k tomu, aby se vytvořila systémová získaná odolnost, musí napřed dojít k nahromadění salicylové kyseliny. Expresí genu *nahG* v rostlinách vytváří naopak rostlinu se zvýšenou citlivostí k onemocnění. Přítomnost salicylové kyseliny nebo jejího funkčního analoga kyseliny 2,6-dichloroisoinikotinové může zvrátit citlivost v odolnost<sup>12</sup>. Zajímavé je, že podobné efekty byly popsány i u poruch imunitního systému u savců. Biosyntéza salicylové kyseliny, která byla zkoumána na rostlině tabáku (*Nicotiana tabacum*), je popsána na obr. 5. PAL katalyzuje první krok této biosyntézy, kterým je konverze fenylalaninu na *trans*-skořicovou kyselinu, která se dále oxidativně převádí na benzoovou kyselinu. Konečným krokem je hydroxylace benzoové kyseliny za katalýzy benzoátu-2-hydroxylasy (BA2H).

U některých bakterií probíhá alternativní biosyntéza salicylové kyseliny šikimátovou dráhou přes isochorismát na SA. Tato přeměna je pravděpodobně katalyzována enzymem isochorismátpyruvátlyasou (IPL) (cit.<sup>13</sup>). Nedávno bylo také zjištěno, že rostlina tabáku, u které byla genetiky potlačena aktivita PAL, nebyla schopna vytvořit systémovou odolnost. Vzrůst aktivity PAL předchází akumulací SA a 4HBA ve floému. Vodivé pletivo má pravděpodobně



Obr. 5. Schéma biosyntézy salicylové a 4-hydroxybenzoové kyseliny; enzymy: PAL, CA4H (cinnamát-4-hydroxylasa; EC 1.14.13.11), BA2H (benzoát-2-hydroxylasa; EC 1.14.13.12)

velký význam při přenosu mobilního signálu. Obě hydroxykyseliny jsou syntetizovány *de novo* pravděpodobně ve vodivém pletivu řapíku a listu jako mobilní signál z inokulovaného listu. Mechanismus působení, kterým SA indukuje rezistenci, však není zcela jasný.

### 3.2. Aktivita L-fenylylalaninamoniumpylysy vyvolaná ozářením

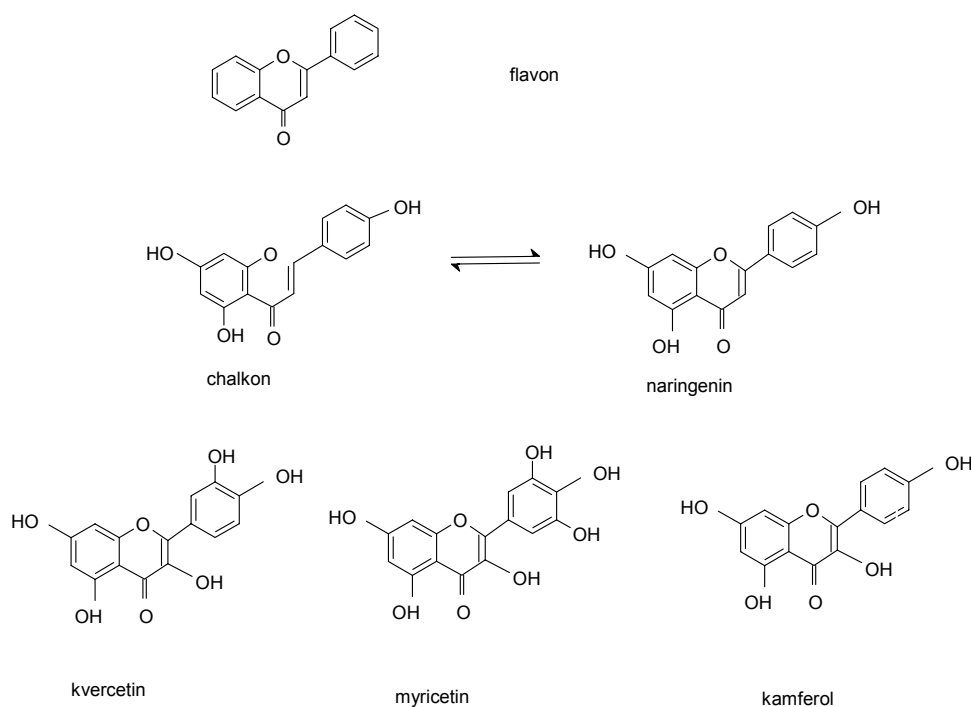
Rostlinné pletivo, které je delší dobu vystaveno škodlivému UV-B záření (280–320 nm), vykazuje různé druhy poškození, jako je snížení rychlosti růstu, redukce fotosyntetické účinnosti a produkce biomasy<sup>14</sup>. Ozáření rostlinného pletiva je jeden ze stresových faktorů, na které rostlina reaguje obrannou reakcí. Zvyšuje se syntéza látek, které absorbují UV záření, zvyšuje se metabolismus fenylylpropanoidů a flavonoidů, úzce spjatý s indukcí aktivity PAL, a následně dochází k morfologickým změnám, jako je zmenšení rostliny, zmenšení listů a zvětšení tloušťky listu<sup>15,16</sup>. Mezi tyto odpovědi patří také akumulace látek absorbujících UV záření jako jsou flavony, flavonoly, isoflavonoidy a anthokyaniny<sup>16</sup> (obr. 6).

#### 3.2.1. Úloha flavonoidů při obranné reakci

Flavonoidy jako největší skupina fenylylpropanoidů

patří mezi rozpustná barviva velmi rozšířená v rostlinné říši tvořící barvu květů, plodů a někdy i listů. První zkoumané rostlinné druhy byly nápadně svojí žlutou barvou. Odtud je také odvozen název této skupiny látek z latinského *flavus* znamenající žlutý. V rostlinách vznikají flavonoidy z kyseliny *p*-kumarové vzniklé hydroxylací kyseliny *trans*-skořicové. Tato reakce je katalyzována *trans*-cinnamát-4-monooxygenasou (EC 1.14.13.11), cytochrom P-450-dependentní monooxygenasou. Další klíčovou roli sehrává 4-kumaroyl-*CoA*-ligasa (E.C.2.3.1.74), která z kyseliny *p*-kumarové a *CoA* vytváří 4-kumaroyl-*CoA*. V další fázi reagují tři molekuly malonyl-*CoA* s *p*-kumaroylem-*CoA* za katalýzy chalkonsynthasy (CHS) za vzniku chalkonu. Chalkony v roztoku samovolně cyklizují na příslušné flavanony. V rostlinném organismu je tento krok řízen enzymem chalkonisomerasou (CHI, EC 5.5.1.6) a ze žlutě zbarveného 4,2',4',6'-tetrahydroxychalkonu vzniká stereospecifickou isomerací bezbarvý flavanon – naringenin. V tomto stupni syntézy dochází k celé řadě dalších kroků katalyzovaných enzymy.

Flavonoidy ochraňují rostlinu před nadměrným UV zářením (280–320 nm), při kterém se uvolňuje velké množství reaktivních forem kyslíku. Mohou přímo zhaset superoxid, hydroxylový radikál, singletový kyslík. Protože jsou převážně lokalizované ve vakuole, je však velmi ne-



Obr. 6. Vzorče flavonů

pravděpodobně, že by zasahovaly *in vivo* přímo proti vysoce reaktivním formám kyslíku, které jsou uvolňovány z chloroplastů při fotosyntéze. Reagují s peroxidem vodíku, který je stabilní a je schopen difundovat přes membránu. Studie, které se zabývaly biosyntézou flavonoidů, ukázaly, že jejich vznik je indukován právě ozářením<sup>14</sup>. Akumulaci fotoindukovaných flavonoidů předchází fotoindukce enzymu PAL. Předpokládaná funkce světlem indukované PAL se vztahuje k produktům v určité větvi fenyylpropanoidního metabolismu, která specificky zvýší syntézu látek absorbujících UV záření<sup>14</sup>. Fotoindukce genů PAL, CHS, CHI a dihydroflavonolreduktasy (DFR) u *Arabidopsis* začíná akumulací mRNA pro tyto geny ve stejném pořadí jako jsou kroky v biosyntetickém metabolismu flavonoidů. Jeden ze způsobů, jak dosáhnout regulace těchto kroků, je aktivace/inhibice mechanismů využívajících meziprodukty fenyylpropanoidů. Aktivita PAL byla zkoumána za přítomnosti nebo absence několika fenolových sloučenin. Výsledky ukázaly, že enzym byl velmi citlivý na metabolity flavonolové a anthokyaninové syntézy, zejména na hydroxykoičovou kyselinu, naringenin a kvercetin, které silně inhibovaly enzymovou aktivitu. Enzymová inhibice těmito sloučeninami tedy zpětně reguluje biosyntézu fenyylpropanoidů<sup>14</sup>. Enzym PAL jako klíčový enzym tohoto metabolismu je inhibován produkty syntézy. Další významnou funkci v obranně rostliny mají flavonoidy jako fytoalexiny. V luštěninách typu sóji, hrachu a fazole se rapidně zvyšuje aktivita PAL, která předznamenává aku-

mulaci antimikrobiálních isoflavonoidních fytoalexinů v pletivech, které byly v kontaktu s houbovou infekcí nebo byly vystaveny působení mikrobů. Typickým příkladem je isoflavon medikarpin z vojtěšky (*Medicago sativa* L.). Flavonoidy inhibují řadu rostlinných enzymů např. malátdehydrogenasu (EC 1.1.1.37), glutamátdehydrogenasu (EC 1.4.1.2). Jako součást potravy vykazují flavonoidy protizánětlivou a antialergickou aktivitu, dále antithrombotické a vasoprotektivní účinky. Mnoho rostlin obsahujících flavonoidy (petržel, lékořice) působí jako diuretika a spasmolytika.

### 3.3. Aktivita L-fenylalaninamoniumlyasy při nízkých teplotách

Rostliny, které jsou pěstovány při nízkých teplotách, vykazují morfologické změny. Citlivost na chlad může být odlišná u různých částí rostliny. Kořeny, oddenky a cibulky jsou na chlad citlivější než např. stonkové vegetativní orgány. Nízké teploty způsobují zvýšení obsahu fenolových látek rozpustných ve vodě a jejich následnou inkorporaci do buněčných stěn ve formě suberinu a ligninu. Akumulace rozpustných fenolových látek je tedy spojená s lignifikací a inhibicí růstu. Tento efekt fenolových kyselin na růst je však velmi komplexní proces. Tyto sloučeniny mohou participovat na metabolismu auxinu, změně membránové permeability, mohou ovlivňovat respiraci a oxidativní fosforylaci nebo syntézu proteinů. Během

aklimatizace rostliny na nízké teploty dochází ke zvýšení aktivity PAL, která byla sledována u jablek, brambor, rajčat, kukuřice a řepkového semene. Bylo zjištěno, že aktivita PAL se během podchlazení zvyšuje díky tomu, že rychlost syntézy proteinu PAL je menší než rychlost jeho rozkladu. Při nízkých teplotách tak dochází ke zdvojnásobení obsahu fenolových kyselin. Koncentrace volných fenolových kyselin je v rostlinném organismu pod kontrolou z důvodů jejich potenciální toxicity. Tyto sloučeniny podléhají degradaci, konjugaci a polymerizačním reakcím s dalšími fenolovými a nefenolovými látkami. Vyskytují se nejčastěji jako glykosidy nebo estery. Glykosylace a esterifikace umožňují buňce předejít negativnímu efektu jejich akumulace. U kořenů, které jsou vystaveny nízkým teplotám, dochází ke zvýšení esterifikačních reakcí, zvláště esterifikace ferulové kyseliny<sup>17</sup>. U fotosyntetizujících pletiv ve vakuole jsou přítomné estery hydroxyskořicové kyseliny, které slouží jako substráty pro vakuolární peroxidasu v systému peroxidasa/fenolová látka/askorbát, který chrání buňku proti aktivnímu kyslíku. Podobně k tomu dochází i u kořene. Fenolové látky mají tedy antioxidační vlastnosti. Zatímco aktivita PAL se zvyšuje a akumulace rozpustných esterově vázaných fenolových látek roste, množství fenolových látek, které jsou vázány v buněčných stěnách, se snižuje. Je to způsobeno tím, že během ochlazení ubývá polysacharidů v buněčných stěnách a kyseliny tedy nemohou tvořit estery. Tento nedostatek kyselin v buněčných stěnách způsobuje fyziologické změny ve vlastnostech buněčných stěn, např. jejich menší roztažitelnost.

#### 4. Závěr

Mezi významné mechanismy obranných reakcí rostlin na působení stresových faktorů patří tvorba fenylypropanoidních látek, které mají v rostlinném organismu antimikrobiální, antioxidační a strukturální funkce. Jejich biosyntéza je jednou z nejdůležitějších metabolických drah vedoucí ke vzniku přírodních produktů jako jsou lignany, ligniny, fenoly a flavonoidy. Prvním a současně i klíčovým enzymem biosyntézy fenylypropanoidních látek je L-fenylalaninamoniumlyasa (PAL). Zvýšení koncentrace PAL je odezvou na poranění, infekci, teplotní změny nebo radiaci. Zvýšená aktivita PAL byla detegována i v místech vzdálených od centra poškození případně napadení patogenem. Na přenosu signálu se podílí i vznikající kyselina salicylová a hydroxyskořicová. Zvýšená aktivita PAL při poškození některých rostlin vyvolává reakce, vedoucí ke zvýšení obsahu polyfenolů, které jsou dále oxidovány a způsobují hnědnutí rostlinného pletiva. Teplotním šokem nebo použitím inhibitorů PAL dochází ke snížení aktivity PAL, a tím také k redukci hnědnutí pletiva. Tento poznatek bude mít praktický význam při způsobu uskladnění některých potravin. Enzym PAL je klíčovým enzymem biosyntézy flavonoidů – látek, které jsou schopny absorbovat UV záření a chránit rostlinu před jeho škodlivými účinky. Produkce flavonoidů je indukována ozářením a jejich akumu-

laci v organismu předchází fotoindukce PAL. Konečné produkty biosyntézy fenylypropanoidů jsou v některých případech také inhibitory PAL. Dochází zde tedy ke zpětné regulaci těchto procesů. PAL je důležitým kontrolním bodem regulace fenylypropanoidní dráhy a jeho aktivita ukazatelem protistresových reakcí rostlin.

#### Seznam zkratk

|             |  |
|-------------|--|
| ABA         | kyselina abscisová                                 |
| AIP         | kyselina 2-aminoindan-2-fosfonová                  |
| BA2H        | benzoát-2-hydroxylasa                              |
| CA4H        | cinnamát-4-hydroxylasa                             |
| CHI         | chalkoniserasa                                     |
| CHS         | chalkonsynthasa                                    |
| DFR         | dihydroflavonolreduktasa                           |
| HAL         | histidinamoniumlyasa                               |
| HCA         | amid hydroxyskořicové kyseliny                     |
| 4HBA        | 4-hydroxybenzoová kyselina                         |
| IPL         | isochorismátpyruvátlyasa                           |
| JA          | jasmonová kyselina                                 |
| MeJA        | methyljasmonát                                     |
| MIO         | 3,5-dihydro-5-methyliden-4 <i>H</i> -imidazol-4-on |
| <i>nahG</i> | salicyláthydroxylasový gen                         |
| PAL         | fenylalaninamoniumlyasa                            |
| POD         | peroxidasa   |
| PPO         | polyfenoloxidasa                                   |
| SA          | kyselina salicylová                                |
| SAR         | systémová získaná odolnost                         |
| TAL         | tyrosinamoniumlyasa                                |

#### LITERATURA

1. Chaman E. M., Copaja V. S., Argandoña H. V.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 2227 (2003).
2. Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P.: *Chem. Listy* 99, 455 (2005).
3. Sarma A. D., Sreelakshmi Y., Sharma R.: *Phytochemistry* 49, 2233 (1998).
4. Cunha G. B. D.: *Enzyme Microb. Technol.* 36, 498 (2005).
5. Calabrese Joseph C., Douglas Jordan B., Boodhoo A., Sariaslani S., Vanelli T.: *Biochemistry* 43(36), 11403 (2004).
6. Campos-Vargas R., Nonogaki H., Suslow T., Saltveit M. E.: *Physiol. Plant.* 23, 82 (2005).
7. Fukumoto L. R., Toivonen P. M. A., Delaquis P.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 4503 (2002).
8. Koukol J., Conn E. E.: *J. Biol. Chem.* 236, 2692 (1961).
9. Kang H., Saltveit M. E.: *Physiol. Plant.* 119, 450 (2003).
10. Campos R., Nonogaki H., Suslow T., Saltveit M. E.: *Physiol. Plant.* 121, 429 (2004).
11. Walters D., Cowley T., Mitchel A.: *J. Ex. Bot.* 53, 747



- (2002).
12. Jyouti Shah.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 365 (2003).
  13. Kawano T., Furuichi T., Muto S.: *Plant Biotech.* 21, 319 (2004).
  14. Reddy Suba V., Goud Venkateshwar K., Sharma R., Reddy R. A.: *Plant Physiol.* 105, 1059 (1994).
  15. Fritz R. R., Hodgins D. S., Abell C. W.: *J. Biol. Chem.* 251, 4646 (1976).
  16. Sarma A. D., Sharma R.: *Phytochemistry* 50, 729 (1999).
  17. Janas K. M., Cvikrová M., Palagiewicz A., Eder J.: *Plant Physiol. Biochem.* 38, 587 (2000)
  18. Janas K. M., Olechnowicz D.: *Acta Biochim. Pol.* 41, 191 (1994).
  19. Jangaard N. O.: *Phytochemistry* 13, 1765 (1974).
  20. Hanson K. R., Havir E. A.: *Biochem. Plants* 7, 577 (1981).
  21. Iredale S. E., Smith H.: *Phytochemistry* 13, 575 (1974).
  22. Watanabe S. K., Hernández-Velazco G., Iturbe-Chinas F., Lopez-Mungia A.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 406 (1992).
  23. Hisaminato H., Murata M., Homma S.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 65, 1016 (2001).
  24. Hodgins D. S.: *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 91 (1972).
  25. Alunni S., Cipiciani A., Fioroni G., Ottavi L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 170 (2003).
  26. Havir E. A., Hanson K. R.: *Biochemistry* 12, 1583 (1973).
  27. Smith-Becker J., Marois E., Huguet E. J., Midland S. L., Sims J. J., Keen N. T.: *Plant Physiol.* 116, 231 (1998).
  28. Nagai N., Kojima Y., Shimosaka M., Okazaki M.: *Agric. Biol. Chem.* 52, 2617 (1988).
  29. Minami E., Ozeki Y., Matsuoka M., Koizuka N., Tanaka Y.: *Eur. J. Biochem.* 185, 19 (1989).
  30. Rétey J.: *Biochim. Biophys. Acta* 1647, 179 (2003).

**Š. Adámková, L. Luhová, M. Petřivalský, and P. Peč** (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*): **Characterization of Enzyme Phenylalanine Ammonia-lyase and Its Role in Activation of Defensive Mechanisms in Plants**

This review summarizes the current knowledge on induction, reaction mechanism, occurrence and activity of phenylalanine ammonium-lyase. Attention was paid to defence reactions of plants based on the phenylpropanoid biosynthesis. These diverse compounds include flavonoids, lignin, coumarins and many phenols with a multiplicity of functions in their structural support, pigmentation, defence and signalling. The role of the enzyme as the catalyst of the gate metabolic step from primary metabolism into the phenylpropanoid pathway is also described.

Vážená paní, vážený pane,  
dovolujeme si Vás pozvat na seminář

## BIOINFORMATIKA III

### Strukturní bioinformatika a molekulové modelování

**Datum konání:** 12. 10. 2006, 13.00 - 18.00 hod.  
**Místo:** Pavilon E - Press Centrum - brněnské výstaviště

**Plenární přednáška:** Prof. Pavel Hobza, ÚOCHB Praha,  
„Evoluce a struktura DNA“

**Řečníci:** R. Ettrich, P. Hobza, M. Křavina, B. Schneider,  
J. Šponer, R. Svobodová-Kaňková, J. Vondrášek

**Témata:** modelování DNA – ribozomu – membránových proteinů  
– enzymů – design léčiv – tvorba strukturálních databází

**Registrace:** <http://loschmidt.chemi.muni.cz/bioinf>

**Kontakt:** Dr. Jiří Damborský, Loschmidtovy laboratoře,  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Bohunice 5/A4, 615 00 Brno, jiri@chemi.muni.cz

