

Przemiany związków fenolowych a rola amoniakolizy L-fenyloalaninowej (PAL) w indukcji mechanizmów obronnych rośliny

Anna Gałązka

Zakład Mikrobiologii Rolniczej – Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Polska

Abstrakt. Lipidy fenolowe i rezorcynolowe są specyficznymi produktami szlaku poliketydowego i dzięki swej naturze fenolowej i ampifilowej kształtują właściwości komórki i procesów przez nią realizowanych. Obecnie tego typu badania na świecie skupiają się na poznaniu i wyjaśnieniu szlaku metabolicznego tych związków w roślinach zbożowych (np. *Secale*, *Sorghum*, *Triticale*, *Triticum*, *Hordeum*) i bakteriach glebowych, jak również zbadaniu ich roli jako naturalnych czynników kontroli glebowych patogenów roślin. Zdolność szczepów i ich mutantów do indukcji odporności systemicznej roślin określa się na podstawie analizy aktywności amoniakolizy L-fenyloalaninowej (PAL). Rola PAL w indukcji mechanizmów obronnych rośliny związana jest z biosyntezą fitoaleksyn, z przemianami związków fenolowych do substancji ligninopodobnych, z indukcją syntezy kwasu salicylowego, substancji związanej z przekazywaniem sygnałów indukujących miejscową i systemową odporność rośliny. Dlatego też poziom aktywności tego enzymu jest skorelowany ze stopniem odporności roślin na infekcję oraz z agresywnością patogena.

Amoniakolizacja fenyloalaniny jest enzymem powszechnie występującym w roślinach. Jego znaczenie wiąże się z rolą, jaką w roślinach odgrywa powstający podczas reakcji eliminacji kwas (*E*)-cynamonowy (CA). Jest on prekursorem wielu związków fenylopropanoidowych (1–3), takich jak np. ligniny, flawonoidy, kumaryny i kwas salicylowy. Kwas salicylowy (SA) odgrywa prawdopodobnie rolę wtórnego przekaźnika informacji w procesie powstawania odporności rośliny na wirusy i bakterie.

słowa kluczowe: amoniakolizacja fenyloalaniny, PAL, związki fenolowe, mechanizmy obronne roślin

WSTĘP

Jednym z podstawowych czynników decydujących o skuteczności biologicznej kontroli rozwoju fitopatogenów

Autor do kontaktu:

Anna Gałązka
e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl
tel. +48 81 8863421, faks +48 81 8864547

Praca wpłynęła do redakcji 8 lipca 2013 r.

jest zdolność szczepów bakterii, określanych jako PGPR (z ang. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), do zasiedlenia strefy korzeniowej roślin (Lam, Gaffney, 1993). Jednakże w celu pełniejszego zrozumienia mechanizmów funkcjonowania bakterii w ryzosferze należy także rozpatrywać oddziaływanie ze strony roślin (Bloemberg, Lugtenberg, 2001). Przypuszcza się, że pewne grupy bakterii są wysoce przystosowane do zasiedlenia ryzosfery właściwych dla siebie roślin i że jest to w dużej mierze uzależnione od uwalniania przez korzenie biologicznie czynnych związków fenolowych (Kobayashi i in., 1996). Pojawianie się ich w środowisku jest rozpoznawalne i wykorzystywane przez bakterie wolno żyjące z rodzaju *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, a także *Azospirillum* jako chemiczne sygnały odpowiedzialne za inicjację oddziaływań ryzosferowych, wskazujące na obecność rośliny będącej odpowiednim gospodarzem dla danej grupy drobnoustrojów (Wojtaszek, 1993; Kobayashi i in., 1996; Vereecke i in., 1997). Obecność odpowiednio wyselekcjonowanych bakterii w strefie korzeniowej roślin wpływa pozytywnie na kiełkowanie nasion, wzrost siewek, rozwój korzeni, pobieranie wody i składników odżywczych z gleby, wzrost i zdrowie roślin, a w rezultacie na wielkość plonów.

Kwasy fenolowe, takie jak: kwas kawowy, ferulowy, *p*-kumarowy, *o*-kumarowy, *p*-hydroksybenzoesowy, syringinowy, wanilinowy, występują powszechnie zarówno w tkankach roślin (pszenicy, jęczmienia, owsa, ryżu, sorgo i innych), jak i w glebie, na której rośliny te są uprawiane (Wojtaszek, 1993; Krupa, Latocha, 2007). Zdolność do ich syntezy związana jest z nabyciem przez roślinę odporności na infekcję (Agrios, 1997). Obecność tych związków została stwierdzona w zewnętrznej warstwie ziarniaków zbóż, która jest bogata w związki fenolowe, głównie w kwasy, tj. kwas ferulowy, wanilinowy, *p*-kumarowy i kawowy (Kähkönen i in., 1999; Peterson i in., 2001; Stasiuk, Kozubek, 2010).

Wśród czynników istotnie determinujących przemiany związków fenolowych wymienia się ograniczanie wzrostu

drobnoustrojów przez wykazujące silną aktywność biologiczną związki fenolowe, które występują w tkankach korzeni roślin i wchodzi w skład wydzielin korzeniowych.

Lipidy fenolowe i rezorcynolowe są specyficznymi produktami szlaku poliketydowego i dzięki swej naturze fenolowej i amfifilowej kształtują właściwości komórki i procesów przez nią realizowanych. Obecnie tego typu badania na świecie skupiają się na poznaniu i wyjaśnieniu szlaku metabolicznego tych związków w roślinach zbożowych (np. *Secale*, *Sorghum*, *Triticale*, *Triticum*, *Hordeum*) i bakteriach glebowych, jak również zbadaniu ich roli jako naturalnych czynników kontroli glebowych patogenów roślin (Kozubek i in., 1996; Pietr i in., 2000; Żarnowski i in., 1999; Gottlieb, 2001). Zdolność szczepów i ich mutantów do indukcji odporności systemicznej roślin określa się na podstawie analizy aktywności amoniakolizacji L-fenylalaninowej (PAL). Rola PAL w indukcji mechanizmów obronnych rośliny związana jest z biosyntezą fitoaleksyn, z przemianami związków fenolowych do substancji ligninopodobnych, z indukcją syntezy kwasu salicylowego, substancji związanej z przekazywaniem sygnałów indukujących miejscową i systemową odporność rośliny. Dlatego też poziom aktywności tego enzymu jest skorelowany ze stopniem odporności na infekcję oraz z agresywnością patogena.

Amoniakolizacja fenyloalaniny jest enzymem powszechnie występującym w roślinach. Znaczenie tego enzymu wywodzi się z roli, jaką w roślinach odgrywa powstający podczas reakcji eliminacji kwas (*E*)-cynamonowy (CA). Jest on prekursorem wielu związków fenylopropanoidowych (1–3), takich jak np. ligniny, flawonoidy, kumaryny, stilbeny i kwas salicylowy (SA). Kwas salicylowy odgrywa prawdopodobnie rolę wtórnego przekaźnika informacji w procesie powstawania odporności rośliny na wirusy i bakterie.

AMONIAKOLIZACJA FENYLOALANINY

Amoniakolizacja fenyloalaniny (PAL, EC 4.1.3.5) jest enzymem powszechnie występującym w roślinach. Część cząsteczka PAL jest homotetramerem. Podjednostka enzymu z pietruszki (*Petroselinum crispum*) jest zbudowana z 714 aminokwasów, co odpowiada masie cząsteczkowej $310420 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Ritter, Schulz, 2004). Ritter i Schulz (2004) twierdzą, że struktura PAL ewolucyjnie wywodzi się od prostszej struktury amoniakolizacji histydyny (HAL). PAL z różnych roślin charakteryzuje się różną masą cząsteczkową (Peltonen, Karjalainen, 1995; Hanson, Havir, 1970, 1981). Enzym ten katalizuje reakcję eliminacji amoniaku z cząsteczki (*S*)-fenyloalaniny, prowadzącą do kwasu (*E*)-cynamonowego, substratu w biosyntezie ligniny i różnorodnych związków o dużym znaczeniu dla roślin.

W literaturze opisano dwa silne inhibitory amoniakolizacji fenyloalaniny: kwas (\pm)-2-aminooksy-3-fenylopropionowy i kwas (*R*)-(-)-1-amino-2-fenylotylofosfonowy.

Kwas (\pm)-2-aminooksy-3-fenylopropionowy był używany przez wielu biochemików i fizjologów roślin jako narzędzie do badania metabolizmu i funkcji fizjologicznej związków wywodzących się z kwasu (*E*)-cynamonowego. Specyficzność działania tego inhibitora w warunkach *in vivo* była jednak kwestionowana. Trzecim, najsilniejszym ze znalezionych inhibitorów amoniakolizacji fenyloalaniny jest kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy, który może być zastosowany jako substancja czynna w herbicydach (Zoń, 2005). Syntetyzowane analogi fenyloalaniny, fenyloglicyny i kwasu (*E*)-cynamonowego również mogą być zastosowane jako związki czynne w ochronie roślin (Zoń, 2005). Amoniakolizacja fenyloalaniny (PAL, EC 4.1.3.5) katalizuje reakcję eliminacji amoniaku z (*S*)-fenyloalaniny dającą w rezultacie kwas (*E*)-cynamonowy (Croteau i in., 2001; Silverman, 2002; Hahlbrock, Scheel, 1989). Występowanie tego enzymu w siewkach jęczmienia odkryli Koukol i Conn (1961). Jest to enzym powszechnie występujący w świecie roślin, sporadycznie spotykany w drożdżach, a całkowicie nieznany u zwierząt (Hanson, Havir, 1981). W reakcji katalizowanej przez PAL u roślin i grzybów powstaje *trans*-cynamonian i amoniak, a następnie fenyloalanina w procesie enzymatycznym przechodzi w tyrozynę do fenylopirogonianów.

Konformacja grup odchodzących (protonu *pro-R* i amoniaku) w substracie amoniakolizacji fenyloalaniny jest naprzeciwległa (Wightman i in., 1972), a zatem eliminację tę można zaliczyć do typu *anti* (Smith, March, 2001; Clayden i in., 2001). Substratem amoniakolizacji fenyloalaniny może być także (*S*)-tyrozyna (Marsh i in., 1968; Rösler i in., 1997). PAL z roślin dwuliściennych (np. z pietruszki) ma zdecydowanie większą specyficzność substratową w stosunku do (*S*)-fenyloalaniny niż do (*S*)-tyrozyny, podczas gdy enzym z roślin jednoliściennych (np. z kukurydzy) może mieć porównywalną specyficzność substratową dla (*S*)-fenyloalaniny i (*S*)-tyrozyny.

PAL jest białkiem o dominującej strukturze helikalnej – ponad połowa reszt aminokwasów tworzy α -helisy. Enzym ma rzadko występującą elektrofilową grupę prostetyczną 5-metyleno-3,5-dihydroimidazol-4-onu (MIO). W łańcuchu podjednostki białka można wyróżnić domenę zawierającą grupę prostetyczną, domenę miejsca aktywnego i domenę osłaniającą wejście do miejsca aktywnego. Grupa aminowa substratu jest prawdopodobnie wiązana w miejscu aktywnym przez dwie cząsteczki asparaginy (Asn²⁶⁰ i Asn³⁸⁴), podczas gdy anion grupy karboksylowej substratu znajduje się prawdopodobnie w pobliżu cząsteczki glutaminy (Gln^{348'}) i argininy (Arg^{354'}) sąsiedniej podjednostki oraz tyrozyny (Tyr¹¹⁰) z tej samej podjednostki (Ritter, Schulz, 2004). Ritter i Schulz (2004) twierdzą, że struktura PAL ewolucyjnie wywodzi się od prostszej struktury amoniakolizacji histydyny.

Opublikowana w ostatnich latach struktura amoniakolizacji fenyloalaniny z drożdży (*Rhodospodium torulides*) przedstawia dokładną budowę cząsteczki, której rozkład

podjednostek został rozpoznany za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej (Calabrese i in., 2004). Autorzy pracy podkreślają obecność w cząsteczce enzymu sześciu fragmentów polipeptydowych przyjmujących kształt helis, obdarzonych momentem dipolowym i skierowanych do centrum aktywnego. Otrzymana struktura trójwymiarowa najbardziej przypomina strukturę amoniakolizy histydyny (HAL, EC 4.3.1.3) z bakterii (*Pseudomonas putida*) (Schwede i in., 1999). Znaczenie tego enzymu wywodzi się z roli, jaką w roślinach odgrywa powstający podczas reakcji eliminacji amoniaku kwas (*E*)-cynamonowy (CA). Jest on prekursorem wielu związków fenylopropanoidowych, takich jak np. ligniny, flawonoidy, kumaryny, stilbeny i kwas salicylowy (SA). Spośród wymienionych metabolitów w największej ilości są biosyntetyzowane ligniny (Boudet, 2000; Zieliński, Kozłowska, 2000). Kwas salicylowy, odgrywa prawdopodobnie rolę wtórnego przekaznika informacji w procesie powstawania odporności rośliny na wirusy i bakterie.

Wyniki badań wskazują, że kwas salicylowy może być także wytwarzany przez roślinę na innej drodze biosyntezy niż z kwasu (*E*)-cynamonowego, a mianowicie z kwasu izochoryzmowego (Wildermuth i in., 2001). Kwas izochoryzmowy może być wytwarzany przez niektóre bakterie, np. przez *Klebsiella pneumoniae* szczep 62-1 (Kaiser, Leistner, 1999). Kwas izochoryzmowy był już przebadany w latach 60. jako pośredni związek wytwarzany przy powstaniu kwasu 2,3-dihydroksybenzoesowego (Zhu i in., 2011). Natomiast kwas choryzmowy jest prekursorem kwasów aromatycznych, fenyloalaniny, tyrozyny, indolu, kwasu 2,3-dihydroksybenzoesowego, hormonów roślinnych powstających z kwasu salicylowego oraz wielu alkaloidów (Wildermuth i in., 2001).

MECHANIZM REAKCJI KATALIZOWANEJ PRZEZ AMONIAKOLIAZĘ FENYLOALANINY

Enzym ten katalizuje reakcję eliminacji amoniaku z cząsteczki (*S*)-fenyloalaniny, prowadzącą do kwasu (*E*)-cynamonowego, substratu w biosyntezie lignin i różnorodnych związków o dużym znaczeniu dla roślin. Reakcje eliminacji amoniaku z (*S*)-fenyloalaniny dające w rezultacie kwas (*E*)-cynamonowy nie są jeszcze dokładnie poznane, wymagają m.in. udziału silnej zasady lub podwyższonej temperatury (Smith, March, 2001; Clayden i in., 2001).

Inglett i in. (2010) badali kinetyczne efekty izotopowe reakcji katalizowanej amoniakolizą fenyloalaniny, pierwszo- i drugorzędowe ze znaczną izotopowo (*S*)-fenyloalaniną lub 3-(1,4-cykloheksadienylo)alaniną. Na podstawie otrzymanych wyników nie można zaproponować jednej drogi reakcji, ale są one przydatne do analizy różnych propozycji mechanizmów reakcji.

Duży postęp w badaniach mechanizmu reakcji katalizowanej amoniakolizą fenyloalaniny stanowiło odkrycie niezbędnej w katalizie grupy prostetycznej o charakte-

rze elektrofilowym (Hanson, Havir, 1970). W ostatnich dwudziestu latach wielokrotnie badano i porównywano skład aminokwasowy amoniakolizy fenyloalaniny z różnych roślin oraz skład amoniakolizy fenyloalaniny ze składem amoniakolizy histydyny (HAL). Amoniakolizy histydyny katalizuje reakcję eliminacji amoniaku z (*S*)-histydyny i występuje powszechnie u bakterii i zwierząt. Stwierdzono duży stopień podobieństwa pomiędzy PAL i HAL. Przełomowym osiągnięciem w badaniach amoniakolizy histydyny było poznanie struktury przestrzennej rekombinowanego HAL z *Pseudomonas putida* metodą rentgenograficznej analizy strukturalnej (Schwede i in., 1999). Przeprowadzone badania struktury HAL umożliwiły zaproponowanie nowej struktury elektrofilowej grupy prostetycznej (Schwede i in., 1999) – 5-metyleno-3,5-dihydroimidazol-4-onu (MIO).

Zaproponowano również wyjaśnienie powstawania MIO z fragmentu enzymu w następującej sekwencji reakcji (prawdopodobnie wymuszonej konformacją białka): dehydratacja (reszty seryny) i kondensacja (addycja grupy NH glicyny do grupy CO alaniny i kolejna dehydratacja) lub w kolejności odwrotnej, tzn. najpierw kondensacja, a następnie dehydratacja (Donnelly i in., 2001). Strukturę 5-metyleno-3,5-dihydroimidazol-4-onu zaproponowano także jako grupę prostetyczną aminomutazy tyrozyny (Christenson i in., 2003).

Różnicowe badania spektroskopowe w ultrafiolecie HAL, PAL i odpowiednio dobranych rekombinowanych PAL (z zamienionym jednym aminokwasem) oraz badania struktury HAL sugerowały obecność reszty 5-metyleno-3,5-dihydroimidazol-4-onu jako grupy prostetycznej dla amoniakolizy fenyloalaniny (Röther i in., 2000). Badania struktury krystalicznej amoniakolizy fenyloalaniny potwierdzają budowę tego enzymu wyekstrahowanego z pietruszki (Ritter, Schulz, 2004) i komórek drożdży (Calabrese i in., 2004).

Dane literaturowe (Peltonen, Karjalainen, 1995; Sreelakshmi, Sharma, 2008) potwierdzają istnienie dwóch mechanizmów reakcji eliminacji amoniaku z (*S*)-fenyloalaniny katalizowanej amoniakolizą fenyloalaniny, które różnią się funkcją grupy prostetycznej MIO.

INHIBITORY AMONIAKOLIAZY FENYLOALANINY

Poszukiwanie nowych herbicydów w dużej mierze polega na molekularnym modelowaniu, syntezie i badaniu inhibitorów enzymów ważnych szlaków metabolicznych roślin (Sata i in., 1982). Otrzymano wiele inhibitorów amoniakolizy fenyloalaniny, spośród których najaktywniejszy okazał się kwas (\pm)-2-amino-3-fenylopropionowy (Amrhein, Gödeke, 1977), który biosyntezę antocyjanin ($IC_{50} = 10 \mu M$) hamował znacznie słabiej niż amoniakolizę ($K = 0,0014 \mu M$). Innym silnym inhibitorem omawianego enzymu był kwas (*R*)-(-)-1-amino-2-fenyloety-

lofosfonowy (Janas i in., 1985), analog (*S*)-fenyloalaniny zawierający grupę fosfonową.

Kwas (*E*)-cynamonowy i jego analogi były również badane jako inhibitory amoniakolizacji fenyloalaniny pochodzącej z różnych źródeł (Hodgins, 1971; Sato i in., 1982; Jorin i in., 1988; Donnelly i in., 2001). Liczną grupę inhibitorów amoniakolizacji fenyloalaniny stanowią związki fosfonowe: kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (Silverman, 2002) oraz kwas (+)-1-amino-3',4'-dichlorobenzylfosfonowy (Rychlewski, 1998). Według Zoń (2005) największe znaczenie jako inhibitor *in vivo* amoniakolizacji fenyloalaniny ma kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (AIP), obecnie używany w wielu laboratoriach (Silverman, 2002; Lemanowicz, 2011; Klepacka i in., 2011).

ODDZIAŁYWANIE MIĘDZY AMONIAKOLIZACJĄ FENYLOALANINY A KWASEM 2-AMINO-INDANO-2-FOSFONOWYM (AIP)

Kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy oraz kwas (+)-1-amino-3',4'-dichlorobenzylfosfonowy są bardzo silnymi inhibitorami zarówno amoniakolizacji fenyloalaniny, jak i biosyntezy antocyjanin. Związki te są obecnie używane w wielu laboratoriach jako inhibitor *in vivo* amoniakolizacji fenyloalaniny.

Ze względu na silne właściwości inhibitorowe AIP na amoniakolizację fenyloalaniny przeprowadzono badania strukturalne tego związku (Zoń, 2005). Celem było określenie struktury AIP zarówno jako ciała stałego, jak i w roztworze. Kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy może istnieć w dwóch konformacjach, różniących się stanem protonowania obu grup funkcyjnych. Konformer pseudoekwatorialny (EC) ma grupę fosfonową w pozycji pseudoekwatorialnej, konformer pseudoaksjalny (AC) – w pozycji pseudoaksjalnej.

W przeciwieństwie do struktury AC struktura EC wiąże się na wiele różnych sposobów, w przypadkowych miejscach, co świadczy o gorszym oddziaływaniu inhibitora z modelem enzymu. Wyniki obliczeń teoretycznych sposobu wiązania kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego do modelu amoniakolizacji fenyloalaniny wskazywały, że bardziej uprzywilejowany jest konformer z pseudoaksjalną grupą fosfonową. Badania kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego jako ciała stałego, w roztworze i obliczenia dla cząsteczki izolowanej wskazują natomiast, że preferowana jest konformacja z grupą fosfonową w pozycji pseudoekwatorialnej. Inhibitor podczas przejścia z roztworu do miejsca aktywnego enzymu musi zatem zmienić konformację z pseudoekwatorialnej na pseudoaksjalną. Otrzymane wyniki obliczeń są zgodne z wynikami badań eksperymentalnych. Przypuszcza się, że z powodu zmiany konformacji cząsteczki kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy jest inhibitorem wolnowiązącym (Zoń, 2005).

PODSUMOWANIE

Obecność odpowiednio wyselekcjonowanych bakterii w strefie korzeniowej roślin wpływa pozytywnie na kiełkowanie nasion, wydłużanie się siewek, rozwój korzenia, pobieranie wody i składników odżywczych z gleby, wzrost i zdrowie roślin, a w efekcie na wielkość plonów. Wśród czynników istotnie determinujących ten proces wymienia się ograniczanie wzrostu drobnoustrojów przez wykazujące silną aktywność biologiczną związki fenolowe, które występują w tkankach korzeni roślin i wchodzi w skład wydzielin korzeniowych. Zdolność do ich syntezy jest związana z nabyciem przez roślinę odporności na infekcje, co związane jest z obecnością w żywych komórkach i zwiększoną aktywnością enzymu amoniakolizacji fenyloalaninowej.

PIŚMIENNICTWO

- Agrios G. N., 1997.** Plant diseases caused by Mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. W: Plant Pathology, 4th; ed.: G.N. Agrios. New York: Academic Press., ss. 457-470.
- Amrhein N., Gödeke K.H., 1977.** α -Amino- β -phenylpropionic acid a potent inhibitor of L-phenylalanine ammonia-lyase in vitro and in vivo. Plant Sci. Lett., 8: 313-317.
- Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J., 2001.** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr. Opin. Plant Biol., 4(4): 343-350.
- Boudet A.M., 2000.** Lignins and lignification: selected issues. Plant Physiol. Biochem., 38: 1-16.
- Calabrese J.C., Jordan D.B., Boodhoo A., Sariaslani S., Vannelli T., 2004.** Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis. Biochemistry, 43: 11403-11416.
- Christenson S.D., Liu W., Toney M.D., Shen B., 2003.** A novel dehydroalanine-dependent tyrosine aminomutase in C-1027 enediyne biosynthesis. J. Am. Chem. Soc., 125: 6062-6063.
- Clayden J., Greeves N., Warren S., Wothers P., 2001.** Organic Chemistry, Oxford University Press, New York, Chapt. 19, ss. 477-502.
- Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G., 2001.** Natural products (secondary metabolites). W: Biochemistry & Molecular Biology of Plant; eds.: B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones, Am. Soc. Plant Physiol., Rockville, Maryland, Chapter 24, ss. 1250-1318.
- Donnelly M., Fedeles F., Wirstam M., Siegbahn P.E., Zimmer M., 2001.** Computational analysis of the autocatalytic posttranslational cyclization observed in histidine ammonia-lyase. A comparison with green fluorescent protein. J. Am. Chem. Soc., 123: 4679-4686.
- Gottlieb M., 2001.** Cechy fizjologiczne ryzosferowych bakterii z rodzaju *Pseudomonas* a ich zdolność do kolonizacji siewek pszenicy. Praca dokt., AR Wrocław.
- Hahlbrock K., Scheel D., 1989.** Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol., 40: 347-369.

- Hanson K.R., Havir E.A., 1970.** α -Phenylalanine ammonia-lyase IV. Arch. Biochem. Biophys., 141: 1-17.
- Hanson K.R., Havir E.A., 1981.** Phenylalanine ammonia-lyase. W: The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise; ed.: Conn E. E., Academic Press, New York, 7: 577-625.
- Hodgins D.S., 1971.** Yeast phenylalanine ammonia-lyase: identification, properties and the identification of catalytically essential dehydroalanine. J. Biol. Chem., 246: 2977-2985.
- Inglett G.E., Rose D.J., Chen D., Stevenson D.G., Biswas A., 2010.** Phenolic content and antioxidant activity of extracts from whole buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mönch) with or without microwave irradiation. Food Chem., 119: 1216-1219.
- Janas K.M., Filipiak A., Kowalik J., Mastalerz P., Knypl J.S., 1985.** Mechanizm reakcji katalizowanych przez amoniakoliazę fenyloalaninową. Acta Biochim. Polon., 32: 131.
- Jorin J., Lopez-Valbuena R., Tena M., 1988.** Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. Biochim. Biophys. Acta, 964: 73-82.
- Kaiser A., Leistner E., 1999.** The role of isochlorogenic acid in primary and secondary metabolism. World J. Microbiol. Biotech., 8(1): 92-95.
- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M., 1999.** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J. Agric. Food Chem., 47: 3954-3962.
- Klepcka, J., Gujska E., Michalak J., 2011.** Phenolic compounds as cultivar- and variety-distinguishing factors in some plant products. Plant Foods Hum. Nutr., 66: 64-69.
- Kobayashi A., Myong J.K., Kawazu K., 1996.** Uptake and exudation of phenolic compounds by wheat and antimicrobial components of the root exudate. Z. Naturforsch., 51: 527-533.
- Koukol J., Conn E.E., 1961.** The metabolism of aromatic compounds in higher plants. J. Biol. Chem., 236: 2692.
- Kozubek A., Pietr S., Czerwonka A., 1996.** Alkylresorcinols are abundant lipid component in different strains of *Azotobacter chroococcum* and *Pseudomonas* spp. J. Bacteriol., 178: 4027-4030.
- Krupa T., Latocha P., 2007.** Aktywność przeciwutleniająca oraz zawartość witaminy C i związków fenolowych w owocach różnych genotypów Aktinidii (*Actinidia* Lindl.). Żywn. Nauka Technol. Jakość, 5(54): 237-244.
- Lam S.T., Gaffney T.D., 1993.** Biological activities of bacteria used in plant pathogen control. W: Biotechnology in Plant Disease Control; ed. I. Ched, Willey-Liss, New York, ss. 291-320.
- Lemanowicz J., 2011.** Phosphatases activity and plant available phosphorus in soil under winter wheat (*Triticum aestivum* L.) fertilized minerally. Polish J. Agron., 4: 12-15.
- Marsh H. V., Havir E.A., Hanson K.R., 1968.** L-Phenylalanine ammonia-lyase. 3. Properties of the enzyme from maize seedlings. Biochemistry, 7: 1915-1918.
- Peltonen S., Karjalainen R., 1995.** Phenylalanine ammonia-lyase activity in barley after infection with *Bipolaris sorokiniana* or treatment with its purified xylanase. J. Phytopathol., 143: 239-245.
- Peterson D.M., Emmons C.L., Hibbs A.H., 2001.** Phenolic antioxidant and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. J. Cereal Sci., 33: 97-103.
- Pietr S., Lewicka T., Żarnowski R., 2000.** The role alkylresorcinols in protection of cereal seedlings against infection of some pathogenic fungi. British Society for Plant Pathology Presidential Meeting 2000. Plant pathogen interactions: Understanding mechanisms of resistance and pathogenicity for disease control. Wye College, UK. Dec. 2000, ss. 18-20.
- Ritter H., Schulz G.E., 2004.** Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. Plant Cell, 16: 3426-3436.
- Rösler J., Kreckel F., Amrhein N., Schmid J., 1997.** Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. Plant Physiol., 113: 175-179.
- Röther D., Merkel D., Rétey J., 2000.** Spectroscopic evidence for a 4-methylidene imidazol-5-one in histidine and phenylalanine ammonia-lyases. Angew. Chem. Int. Ed., 39: 2462-2464.
- Rychlewski T., 1998.** Synteza racemicznego kwasu 1-aminoin-dano-1-fosfonowego. Instytut Chemii Organicznej Biochemii i Biotechnologii, Politechnika Wrocławska, Wrocław, praca dyplom., 43 ss.
- Sato T., Kiuchi F., Sankawa U., 1982.** Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by cinnamic acid derivatives and related compounds. Phytochemistry, 21: 845-850.
- Schwede T.F., Retey J., Schulz G.E., 1999.** Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. Biochemistry, 38: 5355-5361.
- Silverman R.B., 2002.** The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions. Academic Press, San Diego, ss. 424-428.
- Smith M.B., March J., 2001.** March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure. Wiley, New York, Chapter 17, ss. 1299-1376.
- Sreelakshmi Y., Sharma R., 2008.** Differential regulation of phenylalanine ammonia lyase activity and protein level by light in tomato seedlings. Plant Physiol. Biochem., 46: 444-451.
- Stasiuk M., Kozubek A., 2010.** Biological activity of phenolic lipids. Cell Mol. Life Sci., 67(6): 841-860.
- Verecke D., Messens E., Klarskor K., de Bruyn A., van Montagu M., Goethals K., 1997.** Patterns of phenolic compounds in leafy galls of tobacco. Planta, 201: 342-348.
- Wightman R.H., Staunton J., Battersby A.R., Hanson K.R., 1972.** Mechanisms of catalysis. Spectrochemistry of enzyme-catalysed reaction of carbon. J. Chem. Soc. Perkin I, s. 2355.
- Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., Ausubel F.M., 2001.** Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature, 414: 562-565.
- Wojtaszek P., 1993.** Fenolowe metabolity wtórne jako sygnały roślin w oddziaływaniach międzygatunkowych. Post. Biochem., 39: 139-146.
- Zhu K.X., Lian C.-X., Guo X.-N., Peng W., Zhou H.-M., 2011.** Antioxidant activities and total phenolic contents of extracts from defatted wheat germ. Food Chem., 126: 1122-1126.
- Zieliński H., Kozłowska H., 2000.** Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. J. Agric. Food Chem., 48: 2008-2016.
- Zoń J., 2005.** Badania nad syntezą i właściwościami inhibitorów oraz substratów amoniakoliazę fenyloalaniny. Prace Naukowe Instytutu Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej, Monografie, 45(26): 3-62.

Żarnowski R., Kozubek A., Pietr S., 1999. Effect of rye 5-n-alkylresorcinols on *in vitro* growth of phytopathogenic *Fusarium culmorum* and *Rhizoctonia* fungi. Bull. Pol. Acad. Sci.: Biol. Sci., 47: 231-235.

A. Galqzka

CONVERSION OF PHENOLIC COMPOUNDS
AND THE ROLE OF L-PHENYLALANINE AMMONIA
LYASE (PAL) IN THE INDUCTION OF PLANT DEFENSE
MECHANISMS

Summary

Phenol and resorcinol lipids are specific products of polyketide path and thanks to their phenolic and amphiphilic nature, they shape the cell properties as well as the processes performed by it. Currently, this type of research in the world is being focused on understanding and explaining the metabolic pathways of these compounds in cereal plants (eg.: *Secale*, *Sorghum*, *Triticale*, *Triticum*, *Hordeum*) and soil bacteria as well as examining their role

as natural control agents of soil plant pathogens. The ability of strains and their mutants to induce systematic plant resistance, is described on the basis of L-phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity. The role of PAL in the induction of defense mechanisms in plants is connected with biosynthesis of phytoalexins, changes of phenolic compounds into lignin-like compounds, induction of salicylic acid synthesis – a substance associated with the transmission of signals that induce local systemic resistance of the plant. Therefore, the level of this enzyme is correlated with the degree of resistance to infection and the aggressiveness of the pathogen.

Phenylalanine ammonia lyase is an enzyme commonly found in plants. Its significance is associated with the role of (*E*)-cinnamic acid (CA) that is produced during the elimination reaction. It is a precursor to many of phenylpropanoid compounds (1-3), such as lignins, flavonoids, coumarins, and salicylic acid. Salicylic acid (SA) probably plays a role of secondary information transmitter in the process of the formation of plant resistance to viruses and bacteria.

key words: L-phenylalanine ammonia lyase (PAL), phenolic compounds, plant defense mechanisms