

Zastosowanie inhibitorów amoniakolizy *L*-fenyloalaniny w badaniach ekofizjologii roślin

STRESZCZENIE

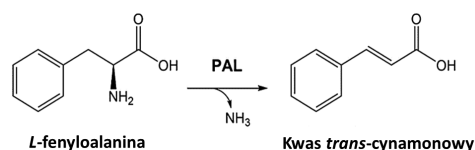
Amoniakolizy *L*-fenyloalaniny (PAL, ang. *Phenylalanine Ammonia-Lyase*) jest kluczowym enzymem biosyntezy związków fenolowych u roślin. PAL katalizuje reakcję eliminacji amoniaku z aminokwasu *L*-fenyloalaniny. Jako produkt powstaje kwas cynamonowy, który jest prekursorem licznej grupy związków fenylopropanoidowych uczestniczących w mechanizmach odpornościowych roślin w warunkach stresów środowiskowych. Inhibitory enzymu PAL obniżając poziom związków fenolowych mogą indukować zmiany w metabolizmie roślin. Niniejsze opracowanie przedstawia aktualny stan wiedzy na temat zastosowania inhibitorów enzymu amoniakolizy *L*-fenyloalaniny w badaniach biologii roślin. Równocześnie zwracamy uwagę na możliwości wykorzystania inhibitorów PAL w rolnictwie w kontekście obserwowanych zmian klimatu, które zwiększają częstotliwość oraz intensywność klęsk żywiołowych jak susze, powodzie czy burze.

WPROWADZENIE

W odpowiedzi na stesy środowiskowe rośliny aktywują różne mechanizmy przystosowawcze, m.in. związane z metabolizmem związków fenolowych [1,2]. Początkowo uważano fenole za zbędne produkty przemiany materii o niejasnym przeznaczeniu, które akumulowane są głównie w organach, tkankach czy komórkach roślin [3]. Jednak na podstawie licznych badań potwierdzono istotną rolę tych substancji w odpowiedziach roślin na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe [4,5]. Wykazano, że związki fenolowe zaangażowane są m.in. w zmíatanie zarówno reaktywnych form tlenu jak i neutralizację rodników organicznych [6], wzmacniają ściany komórkowe [7] oraz efektywnie chronią przed promieniowaniem UV [8]. W warunkach stresów biotycznych pełnią funkcje fitoaleksyn, które hamują rozwój patogennych bakterii i grzybów, a nadając nieprzyjemny smak odstrasżają pasożyty oraz roślinożerców [9]. W literaturze można również znaleźć przykłady niekorzystnego działania związków fenolowych, które powodując brunatnienie warzyw i owoców są poważnym problemem w przechowywalnictwie. Wykazano m.in. związek między brązowieniem skórki banana podczas przechowywania w niskich temperaturach, a aktywnością enzymów uczestniczących w syntezie i utlenianiu związków fenolowych [10].

Na podstawie struktury szkieletu węglowego związki fenolowe można podzielić na trzy grupy, tj. kwasy fenylokarboksylowe, kwasy fenylopropenowe i flawonoidy. Kwasy fenylokarboksylowe są pochodnymi kwasu benzoowego o szkielecie węglowym C_6-C_1 (kwas *p*-hydroksybenzoowy, kwas protokatechowy, kwas galusowy, kwas syringowy, kwas wanilinowy). Kwasy fenylopropenowe to pochodne kwasu cynamonowego o szkielecie węglowym C_6-C_3 (kwas *p*-kumarowy, kwas ferulowy, kwas kawowy, kwas synapinowy). Wśród fenoli najliczniejszą grupę stanowią flawonoidy (ponad 4000 związków) o szkielecie węglowym $C_6-C_3-C_6$, do których zalicza się flawony, flawanole, flawanony, flawany, antocyjany, chalkony, izoflawony i aurony. Związki fenolowe występują u roślin także w formie związanej, jako składowe lignin i tannin, w postaci estrów oraz glikozydów [11,12].

Jednym z kluczowych enzymów w syntezie związków fenolowych jest amoniakolizy *L*-fenyloalaniny (PAL, ang. *Phenylalanine Ammonia-Lyase*, EC 4.3.1.5) [13]. PAL katalizuje odszczepienie grupy aminowej z aminokwasu *L*-fenyloalaniny prowadzące do powstania kwasu *trans*-cynamonowego, który jest prekursorem w syntezie pozostałych związków fenolowych (Ryc. 1) [14].



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie katalitycznej aktywności enzymu PAL.

mgr inż. Karolina Urban✉,
dr hab. Tomasz Hura

Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego, Polska Akademia Nauk, ul. Niezapominajek 21, 30-239 Kraków

https://doi.org/10.18388/pb.2021_471

✉ autor korespondujący: k.urban@ifr-pan.edu.pl

Słowa kluczowe: aktywność enzymatyczna, amoniakolizy *L*-fenyloalaniny, inhibitory, wtórny metabolizm, związki fenolowe

Zastosowane skróty: AIP – kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy; AOA – kwas *a*-aminooksycytowy; AOPP – kwas *a*-aminooksy- β -fenylopropionowy; HBH – hydrazid kwasu 4-hydroksybenzoowego; IC₅₀ – stężenie inhibitora wywołujące hamowanie biosyntezy antocyjanin w 50%; K_i – stała inhibicji enzymu; OBHA – *O*-benzylhydroksyloamina; PAL – amoniakolizy *L*-fenyloalaniny

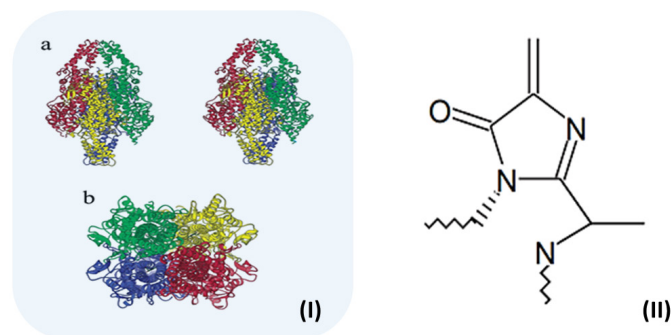
Finansowanie: Działalność badawcza IFR PAN

AMONIAKOLIAZA L-FENYLOALANINY

Liazy amoniakalne, do których należy PAL, około 500 milionów lat temu odegrały istotną rolę w kolonizacji środowiska lądowego przez rośliny [15,16]. Opanowanie ładu konfrontowało rośliny z poważnymi wyzwaniami jak światło (w tym promieniowanie UV), brak wody, wysokie i niskie temperatury, czy destrukcyjne działanie wiatru, roślinożerców oraz patogenów. Stąd pojawienie się wyspecjalizowanego szlaku metabolicznego związanego z deaminacją aromatycznych aminokwasów warunkowało wydajną syntezę związków fenolowych i w konsekwencji efektywne przystosowanie organizmów roślinnych do zmiennych warunków środowiska lądowego [17].

Na podstawie badań filogenetycznych sugeruje się, że amoniakalne liazy po raz pierwszy pojawiły się u bakterii, gdzie pełniły rolę przeciwdrobnoustrojową [18]. Następnie poprzez poziomy transfer genów opanowały wczesną linię grzybów, a w wyniku mikoryzy arbuskularnej zostały przyswojone przez pionierskie rośliny lądowe. Prawdopodobnie na początku amoniakalne liazy pełniły rolę cząsteczek sygnałowych [19]. Kolejne funkcje amoniakoliaz, nabyte w toku ewolucji roślin, wiązały się z ich udziałem w syntezie lignin oraz flawonoidów, a więc struktur chemicznych, które zaangażowane były w mechanizmy obronne przed mikroorganizmami oraz promieniowaniem UV. Ponadto ligniny zmocniały mechanicznie ściany komórkowe, w tym ściany komórkowe naczyń, co zapewniało transport wody na duże odległości u roślin lądowych. Ligniny nadawały odpowiednią sztywność tkankom roślinnym umożliwiając wysoki wzrost i konkurowanie o światło. Amoniakoliaza *L*-fenyloalaniny pojawiła się w rodzinie traw jednoliściennych (Poaceae) około 50–70 milionów lat temu jako efekt duplikacji genów w odpowiedzi na złożoność metabolizmu fenylopropanoidów oraz aby zapewnić wydajną syntezę związków fenolowych w zmieniających się warunkach środowiska lądowego [14,20]. Od roku 1961, gdy po raz pierwszy opisano PAL w jęczmieniu [21], stał się on jednym z najintensywniej badanych enzymów u roślin wyższych z powodu kluczowej roli w biosyntezie związków fenolowych. Podkreślić trzeba, że amoniakoliaza *L*-fenyloalaniny pośredniczy w transferze węgla z pierwotnego metabolizmu (węglowodany) do wtórnego metabolizmu roślin (m.in. związki fenolowe) [2,22].

W cząsteczce amoniakoliaz *L*-fenyloalaniny dominuje struktura helikalna, gdzie więcej niż połowa reszt aminokwasowych tworzy *a*-helisy [23]. PAL jest homotetramerem (Ryc. 2-I), którego masa cząsteczkowa różni się w zależności od gatunku rośliny, np. dla enzymów wyizolowanych z pszenicy i ziemniaków wynosi odpowiednio 306 i 330 kDa [11]. Miejsce aktywne enzymu zawiera zmodyfikowany kofaktor aminokwasowy 3,5-dihydro-5-metylideno-4*H*-imidazol-4-on (MIO) (Ryc. 2-II), który powstał w wyniku posttranslacyjnej modyfikacji seryny, alaniny oraz glicyny. Potencjalne mechanizmy katalizy PAL są wciąż przedmiotem dyskusji. Sugeruje się, że mogą one mieć charakter acylacji elektrofilowej typu Friedela-Craftsa, czy też reakcji eliminacji z karbokationem lub bez karbokationu. Eliminacja grupy alfa-aminowej z aminokwasu może być poprzedzona nukleofilowym atakiem MIO na $-NH_2$ (mechanizm katalizy



Rycina 2. (I) Przejrzysta budowa enzymu PAL wyizolowanego z drożdży *Rhodosporidium toruloides*. Cztery monomery zaznaczone są różnymi kolorami, a - perspektywa boczna, b - widok z góry [25]; (II) Grupa prostetyczna PAL: 3,5-dihydro-5-metylideno-4*H*-imidazol-4-on (MIO) [14].

oparty o reakcję eliminacji) lub też elektrofilowym atakiem MIO na aromatyczny pierścień benzenu (mechanizm oparty o reakcję Friedela-Craftsa) [14,24].

Substratem dla enzymu PAL może być również *L*-tyrozyna. W przypadku roślin jednoliściennych enzym PAL ma porównywalną specyficzność substratową w odniesieniu *L*-fenyloalaniny oraz *L*-tyrozyny, natomiast u roślin dwuliściennych specyficzność ta zdecydowanie dotyczy *L*-fenyloalaniny [11,25].

Enzym PAL prawdopodobnie pochodzi od prostszej formy - amoniakoliaz histydyny (HAL, ang. *Histidine Ammonia-Lyase*, EC 4.3.1.3) [11]. Amoniakoliaza *L*-fenyloalaniny powszechnie występuje w komórkach roślin, rzadziej u grzybów, bakterii, natomiast nie spotyka się jej w świecie zwierząt [11,23,26]. W komórce roślinnej amoniakoliaza *L*-fenyloalaniny występuje głównie w cytoplazmie, rzadziej w szorstkim retikulum endoplazmatycznym [26,27]. U większości roślin PAL kodowany jest przez wielogenową rodzinę. Geny kodujące poszczególne izoformy PAL podlegają zmiennej ekspresji w zależności od rodzaju tkanki roślinnej, fazy rozwojowej rośliny czy od rodzaju czynnika stresowego (promieniowanie UV, susza, zranienie, atak patogena) [28-30]. Wykazano także, że poziom transkryptów PAL wzrasta, gdy aktywność amoniakoliaz *L*-fenyloalaniny hamowana jest m.in. przez działanie inhibitorów [31].

INHIBITORY ENZYMU PAL

Inhibitory kompetycyjne PAL, konkurując z właściwym substratem o miejsce aktywne enzymu, hamują przebieg właściwej reakcji enzymatycznej. Znalazły one zastosowanie w badaniach biologii roślin dostarczając dodatkowych informacji o katalitycznej aktywności tego enzymu. Możliwość wpływu na właściwości katalityczne enzymu PAL wynika z obecności w strukturze chemicznej inhibitorów dwóch grup funkcyjnych, aminowej i fosfonowej, oraz silnie hydrofobowego pierścienia benzenu. Inhibitory hamują aktywność PAL poprzez wytworzenie wiązań wodorowych między aktywnymi grupami funkcyjnymi ($-NO_2$, $-NH_2$, $-ONH_2$, $-COOH$, $-PO_2H_2$, $-PO_3H_2$) inhibitora a enzymem, oraz przez hydrofobowe oddziaływania aromatycznego pier-

Tabela 1. Przykłady zastosowania inhibitorów enzymu PAL w badaniach ekofizjologicznych roślin.

Inhibitor	Gatunek	Efekt	Literatura
AIP	Dziurawiec (<i>Hypericum perforatum</i> L., <i>Hypericum canariense</i> L.)	Ograniczenie wzrostu, obniżona aktywność PAL, spadek zawartości związków fenolowych, obniżenie poziomu diantronów, wzrost poziomu hiperforyny, akumulacja proliny, zmiany w lignifikacji oraz w tworzeniu ksylemu.	[32]
	Salata lodowa (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Zahamowanie brązowienia liści.	[31]
	Rzodkiewnik pospolity (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	Blokada promotora <i>PAL1</i> , wzrost podatności na porażenie mączniakiem rzekomym, obniżenie zawartości kwasu salicylowego, zahamowanie lignifikacji ścian komórkowych.	[33]
AOA	Salata lodowa (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Zahamowanie brązowienia liści.	[31]
	Ziemniak (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	Zwiększona podatność na <i>Cladosporium cucumerinum</i> Ellis & Arthur, brak tworzenia lignin.	[34]
	Owies (<i>Avena sativa</i> L.)	Wzrost wrażliwość liści owsa na porażenie mączniakiem prawdziwym.	[35]
AOPP	Pszenica (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Ograniczona lignifikacja komórek gospodarza w warunkach porażenia przez rdzę żółbliwą.	[36]
	Owies (<i>Avena sativa</i> L.)	Wzrost wrażliwości roślin na porażenie mączniakiem, obniżenie zawartości związków fenolowych.	[37]
	Burak cukrowy (<i>Beta vulgaris</i> L.)	Obniżenie poziomu związków fenolowych, przyspieszenie postępu choroby wywołanej przez <i>Rhizoctonia solani</i> .	[38]
	Salata lodowa (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Zahamowanie brązowienia liści.	[31]
HBH	Diploidalna pszenica (<i>Triticum monococcum</i> L.)	Wzrost penetracji liści pszenicy przez mączniaka (<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>).	[39]
OBHA	Soja (<i>Glycine max</i> L. Merr.), gryka (<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.), fasola mung (<i>Vigna radiata</i> L.)	Spadek aktywności amoniakolizy <i>L</i> -fenyloalaniny, obniżenie poziomu antocyjanów i innych związków fenolowych.	[40]
	Pszenica (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Ograniczenie aktywności PAL, spadek zawartości ligniny w ścianie komórkowej.	[41]

AIP – 2-aminoindan-2-phosphonic acid (kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy); AOA – *α*-aminooxyacetic acid (kwas *α*-aminooksyoctowy); AOPP – *α*-aminooxy-*β*-phenylpropionic acid (kwas *α*-aminooksy-*β*-fenylopropionowy); HBH – 4-hydroxybenzoic hydrazide (hydrazyd kwasu 4-hydroksybenzoesowego); OBHA – *O*-benzylhydroksylamine (*O*-benzylhydroksyloamina)

ścienia benzenu z hydrofobową kieszenią substratu w cząsteczce amoniakolizy *L*-fenyloalaniny [11].

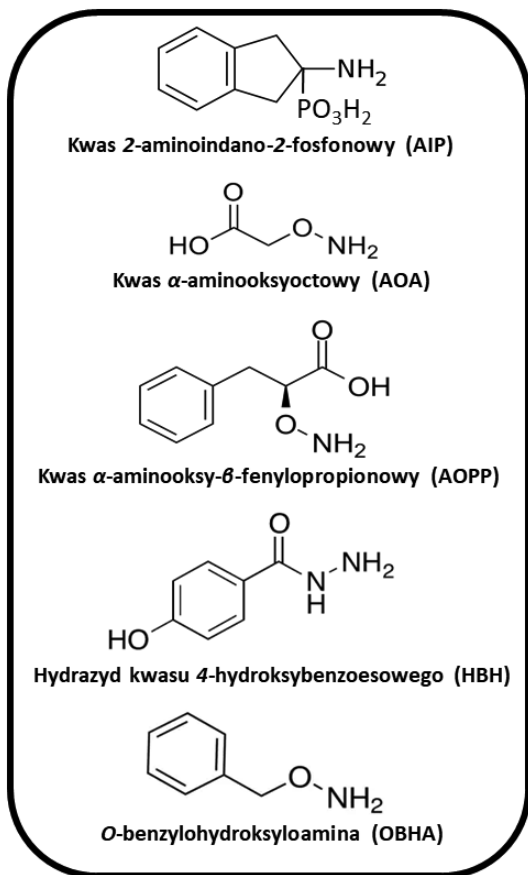
W tabeli 1 zestawiono przykłady pięciu najczęściej stosowanych inhibitorów PAL w badaniach ekofizjologii roślin, a na rycinie 3 ich wzory strukturalne. Ponadto zaprojektowano i opracowano metody syntezy innych związków chemicznych o możliwej aktywności inhibicji enzymu PAL. Badania te obejmowały syntezę analogów fenyloalaniny (kwas (\pm)-2-aminometylo-3-fenylopropionowy, kwas (*E*)-2-aminometylo-3-fenyloakrylowy, 2,6-difluorofenyloalanina), fenyloglicyny (otrzymano 41 kwasów aminofosfonowych) oraz kwasu (*E*)-cynamonowego (otrzymano 18 analogów należących do kwasów karboksylowych, kwasów fosfonowych, kwasów boronowych oraz związków z grupą nitrową) o zróżnicowanych wartościach IC_{50} (stężenie inhibitora wywołujące hamowanie biosyntezy antocyjanin w 50%) i K_i (stała inhibicji enzymu) [11].

Najbardziej znanym inhibitorem *in vivo* amoniakolizy *L*-fenyloalaniny jest kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (AIP) ($K_i = 0.08 \mu\text{M}$, $IC_{50} = 1.5 \mu\text{M}$) [11]. Zastosowano go, (stężenie 20 μM) m.in. w badaniach dotyczących dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum* L.) oraz *Hypericum canariense* L. (endemiczny gatunek dla Wysp Kanaryjskich)

[32]. U *H. perforatum* w porównaniu do *H. canariense* zaobserwowano wyraźne zahamowanie wzrostu roślin, któremu towarzyszyła obniżona aktywność PAL (o 60%), spadek zawartości rozpuszczalnych fenoli, w tym poszczególnych kwasów fenolowych, obniżenie poziomu związków diantronowych (hiperycyna, pseudohiperycyna, protohiperycyna) oraz wzrost poziomu hiperforyny będącej pochodną flo-roglucyny. U obydwu gatunków inhibitor wywołał wzrost akumulacji proliny, a także znaczące zmiany w lignifikacji i tworzeniu wtórnej tkanki naczyniowej (ksylemu).

W innej pracy wykorzystano AIP (w zakresie stężeń 50–100 mM), do oceny roli związków fenolowych w brązowieniu tkanki sałaty. Wykazano, że 50 mM AIP skutecznie hamuje brązowienie liści. W ten sposób potwierdzono, że wzrost aktywności enzymu PAL stymuluje syntezę związków fenolowych, które ulegając utlenieniu i polimeryzacji dają widoczny efekt brązowienia liści sałaty [31].

Z kolei transgeniczne rośliny *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Columbia, Col-0), z wprowadzonym promotorem *PAL1*, po traktowaniu AIP (10^{-4} M) wykazywały wzrost podatności na porażenie mączniakiem rzekomym krzyżowych (*Peronospora parasitica*). Wiązało się to z blokadą aktywności promotora *PAL1*. Zaobserwowano obniżenie poziomu kwasu



Rycina 3. Struktura chemiczna poszczególnych inhibitorów amoniakolizy *L*-fenyloalaniny (PAL).

salicylowego oraz ograniczoną lignifikację ścian komórkowych *A. thaliana* [33].

Kolejny inhibitor PAL, kwas α -aminooksyoctowy (AOA, stężenia w zakresie 3–10 mM), podobnie jak kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (AIP) ogranicza brązowienie liści sałaty, ale jest mniej efektywny w hamowaniu tego niekorzystnego procesu [31]. Natomiast bulwy ziemniaka wstępnie traktowane AOA (stężenia: 0,1 mM, 1,0 mM i 10 mM) i następnie inokulowane *Cladosporium cucumerinum* Ellis & Arthur, charakteryzowały się zwiększoną podatnością na ten patogen, co równocześnie wiązało się z brakiem tworzenia lignin [34]. Zastosowanie tego samego inhibitora PAL (stężenie $\geq 10^{-4}$ M) zwiększało wrażliwość liści owsa na porażenie mączniakiem prawdziwym (*Erysiphe graminis* DC f.sp. *avenae* ex Merat) [35].

Kwas α -aminooksy- β -fenylpropionowy (AOPP) ($K_i = 0,0014 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$), o stężeniu 0,1 mM, w eksperymencie dotyczącym stresu biotycznego ograniczał lignifikację komórek pszenicy w warunkach porażenia przez rdzę żdźbłową (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erics. i E. Henn.) [36]. W innych badaniach Carver i in. [37] wykazali, że AOPP (10^{-3} M) zwiększa wrażliwość owsa na porażenie mączniakiem (*Erysiphe graminis* DC f.sp. *avenae* ex Merat), co wynikało m.in. ze spadku zawartości związków fenolowych. Z kolei u buraka cukrowego kwas α -aminooksy- β -fenylpropionowy (stężenie 100 μM) spowodował obniżenie poziomu związków fenolowych oraz

przyspieszył postęp brunatnej zgnilizny wywołanej przez *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn [38]. Również AOPP (stężenie 200 μM) skutecznie ograniczał brązowienie liści sałaty [31].

Kolejny inhibitor PAL, hydrazyd kwasu 4-hydroksybenzoesowego (HBH), o stężeniach od 0,5 do 1,0 mM spowodował wzrost efektywności penetracji liści pszenicy przez mączniaka (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). Stężenie 2 mM HBH nie wywołało podobnego efektu i było ono toksyczne dla roślin [39].

Do grupy inhibitorów PAL należy także *O*-benzylhydroksyloamina (OBHA, stężenia 10^{-5} M oraz 5×10^{-5} M). U soi (*Glycine max* L. Merr.), gryki (*Fagopyrum esculentum* Moench.) oraz fasoli mung (*Vigna radiata* L.) efektem działania OBHA było obniżenie aktywności amoniakolizy *L*-fenyloalaniny, spadek zawartości antocyjanów oraz związków fenolowych [40]. Natomiast Feduraev i in. [41] zaobserwowali u pszenicy, że OBHA (stężenie 500 μM) redukuje aktywność enzymu PAL (o około 30%) oraz ogranicza lignifikację ściany komórkowej (o około 50%).

MOŻLIWOŚĆ PRAKTYCZNEGO ZASTOSOWANIA INHIBITORÓW PAL

Akumulacja związków fenolowych odbywa się kosztem metabolizmu pierwotnego, gdyż wiąże się z wykorzystaniem węglowodanów w syntezie roślinnych fenoli [42]. Jest to istotny mechanizm przystosowawczy do stresów środowiskowych, gdyż następuje czasowe zahamowanie wzrostu roślin i akumulacja substancji bioaktywnych, w tym związków fenolowych [2]. Natomiast w optymalnych warunkach wzrostu, czy też po okresie działania stresów środowiskowych, bardziej korzystnym mechanizmem będzie przesunięcie aktywności metabolicznej roślin w stronę metabolizmu pierwotnego. W tym przypadku zwiększona akumulacja cukrów staje się czynnikiem stymulującym produktywność roślin w postaci wzrostu biomasy roślin, powierzchni liści czy plonu ziarna. Jedną z możliwości zwiększenia poziomu węglowodanów kosztem syntezy związków fenolowych może być zastosowanie inhibitorów enzymu PAL. Inhibicja PAL po stresie może stymulować produktywność roślin. Następczy efekt suszy glebowej przejawiający się spadkiem aktywności aparatu fotosyntetycznego, jest często trwałe i niemożliwe do wyeliminowania [43]. Dlatego można założyć, że przez zastosowanie inhibitorów enzymu PAL istnieje możliwość ograniczenia strat w plonie po stresach środowiskowych, w tym po suszy glebowej.

PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Zastosowanie inhibitorów PAL w badaniach naukowych odnosi się głównie do stresów biotycznych. Analizowano w nich znaczenie związków fenolowych oraz procesu lignifikacji ścian komórkowych w odpowiedzi roślin na atak patogenów. Dlatego w tym artykule zwracamy uwagę na inne możliwości wykorzystania dostępnych inhibitorów PAL. Interesującym problemem wydaje się być zastosowanie tych substancji do badań regeneracji roślin po stresach środowiskowych. Inhibitory PAL mogą zwiększać akumulację węglowodanów kosztem związków fenolowych i w ten sposób stymulować produktywność roślin po stresach

środowiskowych, takich jak stresy temperaturowe (wysoka/niska temperatura) czy stresy wodne (susza, zalewanie).

PIŚMIENNICTWO

- Hura K, Hura T, Dziurka K, Dziurka M (2014) Biochemical defense mechanisms induced in winter oilseed rape seedlings with different susceptibility to infection with *Leptosphaeria maculans*. *Physiol Mol Plant Pathol* 87:42-50
- Hura T, Dziurka M, Hura K, Ostrowska A, Dziurka K (2016) Different allocation of carbohydrates and phenolics in dehydrated leaves of triticale. *J Plant Physiol* 202:1-9
- Gould KS, Lister C (2006) Flavonoid functions in plants. W: Anderson ØM, Markham KR (red) *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, str. 397-442
- Naikoo MI, Dar MI, Raghib F, Jaleel H, Ahmad B, Raina A, Khan FA, Naushin F (2019) Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: an overview. W: Khan MIR, Reddy PS, Ferrante A, Khan NA (red) *Plant signaling molecules: role and regulation under stressful environments*. Elsevier, Amsterdam, str. 157-168
- Tak Y, Kumar M (2020) Phenolics: a key defence secondary metabolite to counter biotic stress. *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*, Springer, str. 309-329
- Grace S (2005) Phenolics as antioxidants. W: Smirnoff N (red) *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Blackwell Publishing Limited, Oxford, UK, str. 141-168
- Martínez-Rubio R, Centeno ML, García-Angulo P, Álvarez JM, Acebes JL, Encina A (2020) The role of cell wall phenolics during the early remodelling of cellulose-deficient maize cells. *Phytochemistry* 170:112219
- Del Valle JC, Buide ML, Whittall JB, Valladares F, Narbona E (2020) UV radiation increases phenolic compound protection but decreases reproduction in *Silene littorea*. *PLoS One* 15:e0231611
- Sardans J, Gargallo-Garriga A, Urban O, Klem K, Holub P, Janssens IA, Walker TW, Pesqueda A, Peñuelas J (2021) Ecometabolomics of plant-herbivore and plant-fungi interactions: a synthesis study. *Ecosphere* 12:e03736
- Nguyen TBT, Ketsa S, van Doorn WG (2003) Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biol Technol* 30: 187-193
- Zoń J (2005) Badania nad syntezą i właściwościami inhibitorów oraz substratów amoniakolizacji fenyloalaniny. *Prace Naukowe Instytutu Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej, Monografie* 45:3-62
- Kobylińska A, Janas KM (2015) Kwercetyna, ważny flawonoid w życiu roślin. *Kosmos* 64:113-127
- Zhang Q, Yang W, Liu J, Liu H, Lv Z, Zhang C, Chen D, Jiao Z (2021) Postharvest UV-C irradiation increased the flavonoids and anthocyanins accumulation, phenylpropanoid pathway gene expression, and antioxidant activity in sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Postharvest Biol Technol* 175:111490
- Barros J, Dixon RA (2020) Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases. *Trends Plant Sci* 25:66-79
- Kenrick P, Crane PR (1997) The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389:33-39
- Bateman RM, Crane PR, Di Michele WA, Kenrick PR, Rowe NP, Speck T, Stein WE (1998) Early evolution of land plants, phylogeny, physiology, and ecology of the primary terrestrial radiation. *Annu Rev Ecol Syst* 29:263-292
- Wu ZH, Gui ST, Wang SZ, Ding Y (2014) Molecular evolution and functional characterisation of an ancient phenylalanine ammonia-lyase gene (*NtPAL1*) from *Nelumbo nucifera*: novel insight into the evolution of the PAL family in angiosperms. *BMC Evol Biol* 14:1-14
- Emiliani G, Fondi M, Fani R, Gribaldo S (2009) A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. *Biol Direct* 4:7
- Stafford HA (1991) Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiol* 96:680-685
- Jiao Y, Li J, Tang H, Paterson AH (2014) Integrated syntenic and phylogenomic analyses reveal an ancient genome duplication in monocots. *Plant Cell* 26:2792-2802
- Koukol J, Conn EE (1961) The metabolism of aromatic compounds in higher plants: IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J Biol Chem* 236:2692-2698
- Arnold TM, Appel H, Patel V, Stocum E, Kavalier A, Schultz J (2004) Carbohydrate translocation determines the phenolic content of *Populus* foliage: a test of the sink-source model of plant defense. *New Phytol* 164:57-164
- Gałązka A (2013) Przemiany związków fenolowych a rola amoniakolizacji L-fenyloalaninowej (PAL) w indukcji mechanizmów obronnych rośliny. *Pol J Agron* 15:83-88
- Szefczyk B (2005) Teoretyczne metody badania właściwości katalitycznych enzymów oraz inhibicji na przykładzie mutazy choryzmianowej i amoniakolizacji fenyloalaninowej. *Praca doktorska, Politechnika Wroclawska*, str. 1-106.
- Calabrese JC, Jordan DB, Boodhoo A, Sariaslani S, Vannelli T (2004) Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis. *Biochemistry* 43:11403-11416
- Gientka I, Błażej S, Duszkiwicz-Reinhard W (2006) Biokonwersja kwasu trans-cynamonowego do L-fenyloalaniny przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula*. *Biotechnologia* 2:117-129
- Sato T, Takabe K, Fujita M (2004) Immunolocalization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate-4-hydroxylase in differentiating xylem of poplar. *C R Biol* 327:827-836
- Hura T, Hura K, Grzesiak S (2009) Leaf dehydration induces different content of phenolics and ferulic acid in drought-resistant and -sensitive genotypes of spring triticale. *Z Naturforsch C* 64:85-95
- Sirin S, Aslim B (2019) Determination of antioxidant capacity, phenolic acid composition and antiproliferative effect associated with phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in some plants naturally growing under salt stress. *Med Chem Res* 28:229-238
- Feduraev P, Skrypnik L, Riabova A, Pungin A, Tokupova E, Maslennikov P, Chupakhina G (2020) Phenylalanine and tyrosine as exogenous precursors of wheat (*Triticum aestivum* L.) secondary metabolism through PAL-associated pathways. *Plants* 9:476
- Peiser G, Lopez-Galvez G, Cantwell M, Saltveit ME (1998) Phenylalanine ammonia lyase inhibitors control browning of cut lettuce. *Postharvest Biol Technol* 14:171-177
- Klejduś B, Kováčik J, Babula P (2013) PAL inhibitor evokes different responses in two *Hypericum* species. *Plant Physiol Biochem* 63:82-88
- Mauch-Mani B, Slusarenko AJ (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8:203-212
- Hammerschmidt R (1984) Rapid deposition of lignin in potato tuber tissue as a response to fungi non-pathogenic on potato. *Physiol Plant Pathol* 24:33-42
- Carver TLW, Robbins MP, Zeyen RJ (1991) Effects of two PAL inhibitors on the susceptibility and localized autofluorescent host cell responses of oat leaves attacked by *Erysiphe graminis* DC. *Physiol Mol Plant Pathol* 39:269-287
- Moerschbacher BM, Noll U, Gorrion L, Reisener HJ (1990) Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Plant Physiol* 93:465-470
- Carver TLW, Robbins MP, Zeyen RJ, Dearne GA (1992) Effects of PAL-specific inhibition on suppression of activated defence and quantitative susceptibility of oats to *Erysiphe graminis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 41:149-63
- Taheri P, Tarighi S (2011) A survey on basal resistance and riboflavin-induced defence responses of sugar beet against *Rhizoctonia solani*. *J. Plant Physiol* 168:1114-1122
- Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei Y, King J (2009) Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical

- role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *J Exp Bot* 60:509-521
40. Hoagland RE (1985) *O*-Benzylhydroxylamine: an inhibitor of phenylpropanoid metabolism in plants. *Plant Cell Phys* 26:1353-1359
41. Feduraev P, Riabova A, Skrypnik L, Pungin A, Tokupova E, Maslennikov P, Chupakhina G (2021) Assessment of the role of PAL in lignin accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L.) at the early stage of ontogenesis. *Int J Mol Sci* 22:9848
42. Hura T, Hura K, Ostrowska A, Urban K (2022) Non-rolling flag leaves use an effective mechanism to reduce water loss and light induced damage under drought stress. *Ann Bot* 130:393-408
43. Hura T, Hura K, Ostrowska A, Dziurka K (2015) Rapid plant rehydration initiates permanent and adverse changes in the photosynthetic apparatus of triticale. *Plant Soil* 397:127-145

The use of *L*-phenylalanine ammonia lyase inhibitors in plant ecophysiological studies

Karolina Urban✉, Tomasz Hura

Polish Academy of Sciences, The Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Niezapominajek 21, 30-239 Kraków

✉corresponding author: k.urban@ifr-pan.edu.pl

Keywords: enzymatic activity, inhibitors, *L*-phenylalanine ammonia lyase, phenolic compounds, secondary metabolism

ABSTRACT

Phenylalanine ammonia lyase (PAL) is a key enzyme controlling the biosynthesis of phenolic compounds in plants. PAL catalyzes ammonia elimination from *L*-phenylalanine in a reaction that yields cinnamic acid, a precursor of a large group of phenylpropanoid compounds. Phenylpropanoids and their derivatives play an important role in regulating plant resistance mechanisms under environmental stresses. By reducing the level of phenolic compounds, PAL inhibitors can induce changes in plant metabolism. This paper presents the current state of knowledge on the use of PAL inhibitors in plant biology, and draws attention to the possibilities of using PAL inhibitors in agriculture in the context of the witnessed climate changes which increase the frequency and intensity of some disasters such as droughts, floods and storms.

