

METABOLIZM TREHALOZY U ROŚLIN

TREHALOSE METABOLISM IN PLANTS

Barbara WOLSKA-MITASZKO, Eliza MOLESTAK

Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, UMCS,
Lublin

Streszczenie. Niedawno wyodrębniono i scharakteryzowano roślinne geny kodujące procesy syntezy oraz rozkładu trehalozy. Obecnie coraz więcej danych wskazuje na udział trehalozy i trehalazy w procesach sygnalizacji cukrowej, kontroli alokacji fotoasymilatów oraz w regulacji przemian węglowodanów. Pomimo to funkcja metabolizmu trehalozy u roślin nie jest całkowicie wyjaśniona.

Słowa kluczowe: metabolizm trehalozy, geny *TPS* i *TPP*, trehalaza, TPS1, Tre-6P

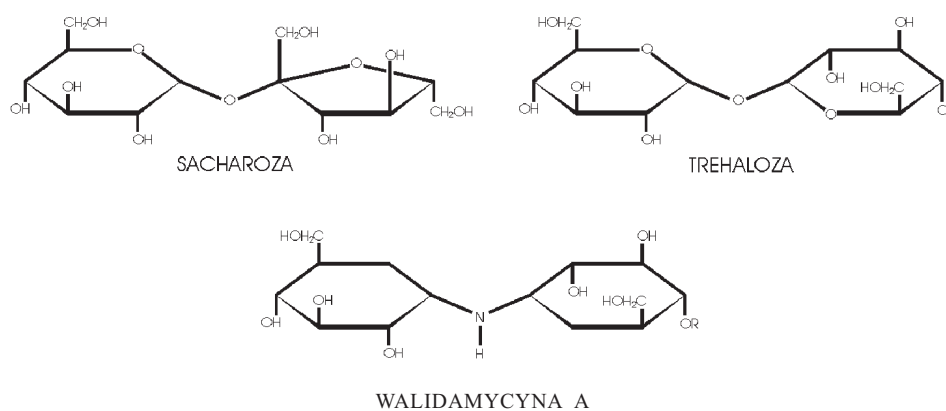
Summary. Plant genes encoding metabolism of trehalose were discovered not so long ago. There are more and more of dates indicating on regulatory function of trehalose and trehalase in sugar sensing and signaling as well as in the control of assimilate allocation. Nevertheless the function of trehalose metabolism in plants is still not clear.

Key words: trehalose metabolism, *TPS* and *TPP* genes, trehalase, TPS1, Tre-6P

Wykaz stosowanych skrótów: **Tre-6P** – trehalozo-6-fosforan, **TPS** – syntaza Tre-6P, **TPP** – fosfataza Tre-6P, **TPS** – gen kodujący syntazę Tre-6P, **TPP** – gen kodujący fosfatazę Tre-6P, **TPH** – hydrolaza Tre-6P, **THA** – trehalaza, **UDP-Glc** – urydynodifosfoglukoz, **Val A** – walidamycyna A.

1. WSTĘP

Disacharyd trehaloza występujący w świecie mikroorganizmów i zwierząt, identyfikowany wcześniej jako tzw. cukier grzybowy – mykoza, zbudowany jest z dwóch cząsteczek glukozy połączonych glikozydowym wiązaniem α,α -1,1. To nietypowe wiązanie łączy anomeryczne węgle w strukturze obu cząsteczek i eliminuje wystąpienie właściwości redukujących. Chemiczna struktura trehalozy jest bardzo zbliżona do struktury sacharozy (ryc. 1), ale trehaloza w przeciwieństwie do sacharozy jest tylko nieznacznie słodka, natomiast jest bardziej stabilna i nie ulega tak łatwo jak sacharoza nieenzymatycznej hydrolizie w niskim pH oraz w podwyższonej tempera-



RYCINA 1. Struktura sacharozy, trehalozy i walidamycyny A

turze. Brak właściwości redukujących jest szczególnie istotny, gdyż podobnie jak sacharoza, nie wykazuje reakcji Maillarda z białkami i nie naraża komórek czy tkanek na drastyczne reakcje oksydacyjno-redukcyjne. Znaczna chemiczna inertność, stabilność oraz całkowity brak toksyczności [19,29] sprawia, że trehaloza jest niemal idealnym czynnikiem ochronnym dla zachowania struktury wielu enzymów, białek szkieletowych i błon [2,4,12,65]. Podobnie jak inne polyole, zabezpiecza i stabilizuje integralność błon przez utrzymywanie lipidów w stanie płynnym [12,18]. Zapobiega to ich niszczeniu przez separację faz, degradację czy fuzję [2,12]. Co więcej, trehaloza nie tylko stabilizuje struktury termowrażliwych białek, ale także zmniejsza stopień ich agregacji [2,19,54], co wiąże się z zastosowaniem trehalozy w stabilizacji i konserwacji leków, kosmetyków, suszonej czy mrożonej żywności oraz z krioprotekcją komórek, tkanek czy nawet narządów [19,29]. Potencjalne wykorzystanie trehalozy w przyszłości to możliwość wspomagania leczenia schorzeń neurodegeneracyjnych związanych z występowaniem nadmiernej agregacji białek bądź amyloidów [2,18,54,67].

Akumulacja trehalozy jest głównym mechanizmem zabezpieczającym komórki grzybów, bakterii oraz bezkręgowców (nicieni, skorupiaków i owadów) przed szkodliwymi warunkami środowiska. Dzięki temu wyspecjalizowane, anhydrobiotyczne formy rozwojowe tych organizmów mogą przetrwać szczególnie niekorzystne działanie wielu czynników [4,5,6,12,15,18,20]. Na uwagę zasługuje znaczne zróżnicowanie roli trehalozy u mikroorganizmów, od magazynowania źródła węgla do funkcji protekcyjnej i sygnałowej. Szczegółowe dane zgromadzone w wielu pracach przeglądowych i doświadczalnych dotyczą organizmów zarówno pro-, jak i eukariotycznych [4,12,18,20,23,26,35,54,65,67].

U roślin wyższych trehaloza jest spotykana sporadycznie, a jej rolę pełni „młodsza siostra”, sacharoza [26,65]. Wyjątek stanowią tzw. rośliny wskrzeszone, które dzięki akumulacji trehalozy mogą przetrwać stan niemal całkowitego odwodnienia, zachowując jedynie około 1% wody [26]. Należy do nich widliczka – *Selaginella lepidophylla* („róża Jerycha”), *Myrothamnus flabellifolia* i trawa *Sporobolus staphianus*. Poziom

trehalozy jest u tych roślin wysoki i osiąga 10–20% suchej masy [26,35]. U innych gatunków roślin obecność trehalozy stwierdzana jest bardzo rzadko, np. w owocach czy kwiatach niektórych przedstawicieli *Apiaceae* [35]. Sądzono więc, że rośliny nie syntetyzują i nie akumulują trehalozy, podobnie jak ssaki [31,39]. Dopiero niedawno zidentyfikowano geny kodujące enzymy biosyntezy trehalozy [7,33,62,63,73]. Spowodowało to gwałtowny wzrost zainteresowania metabolizmem trehalozy w nadziei na uzyskanie nowych odmian roślin wykazujących wzmoczoną tolerancję na suszę i zasolenie [24,71] oraz ze względu na poszukiwanie źródeł taniego i łatwo dostępnego disacharydu. Poza tym wprowadzanie inhibitora trehalazy, walidamycyny A, do rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana* potwierdziło możliwość endogennej syntezy i akumulacji trehalozy [27,35,36], jak również obecność u roślin genów syntezy trehalozy homologicznych do genów *TPS* i *TPP* z drożdży i bakterii [65].

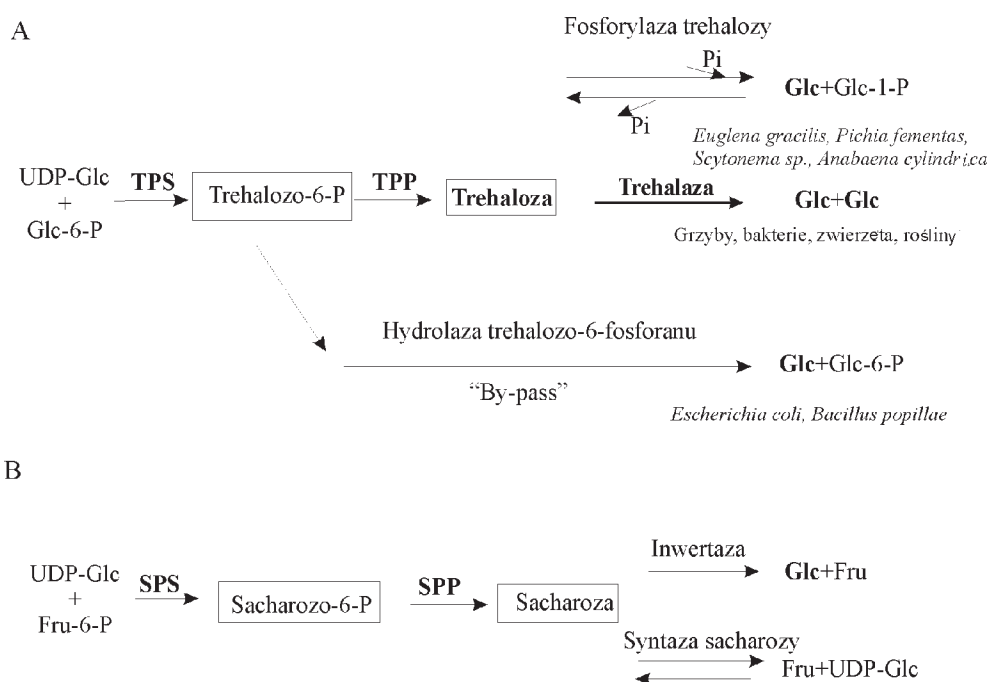
Informacje zawarte w tym artykule są próbą podsumowania zasadniczych wiadomości na temat roli metabolizmu trehalozy u roślin. Stanowią także rodzaj odpowiedzi na wcześniej publikowane prace w Postęпах Biologii Komórki [10,30,57].

2. METABOLIZM TREHALOZY

2.1. Biosynteza trehalozy

Biosynteza trehalozy u większości organizmów [4,18,23,50,54] zbliżona jest do syntezy sacharozy. Jest to dwuetapowy proces transferu glukozy zachodzący w cytoplazmie, gdzie donorem glukozy jest UDP-glukoza, a akceptorem glukozo-6P. W pierwszym etapie, przy udziale syntazy trehalozo-6-P, *TPS* (EC 2.4.1.15) powstaje ufosforylowany intermediat i UDP (ryc. 2). Drugi etap syntezy polega na defosforylacji wytworzonego prekursora, Tre-6P, pod wpływem fosfatazy trehalozo-6P, *TPP* (EC 3.1.3.12) i prowadzi do wytworzenia zdefosforylowanego disacharydu, tj. trehalozy oraz recykliczacji wolnego fosforanu nieorganicznego (Pi).

Podczas sekwencjonowania genomu *Arabidopsis* ujawniono geny kodujące endogenną aktywność syntazy *TPS*. Ekspresja tych genów w drożdżowych mutantach $\Delta tps1$ pozwoliła u *Arabidopsis* zidentyfikować gen *AtTPS1*, a u *Sellaginella lepidophylla* gen *SITPS1* [7,33,63,73]. Obecnie wiadomo, że u *Arabidopsis* występuje aż 11 genów homologicznych do drożdżowego genu *TPS1*, zgrupowanych w dwóch podrodzinach/klasach [33]. W klasie I wyodrębniono 4 zbliżone geny (*AtTPS1-4*) o 63–80% identyczności sekwencji, z których tylko gen *AtTPS1* koduje funkcjonalną aktywność *TPS* wyrażaną w drożdżowych mutantach $\Delta tps1$. Gen ten zawiera unikalne, N-terminalne wydłużenie niespotykane w innych roślinnych homologach *TPS*, jak również w drożdżowym genie *TPS1* (ryc. 3) [33,62]. Geny *AtTPS5-11* klasy II (54–83% identyczności sekwencji) zawierają w swej części C-terminalnej regiony kodujące aktywność fosfatazową. Analogicznie jak u drożdży określono je jako tzw. geny dwuczęściowe, kodujące N-terminalną domenę o aktywności syntazy i C-terminalną domenę o aktywności fosfatazy [33,62,63].

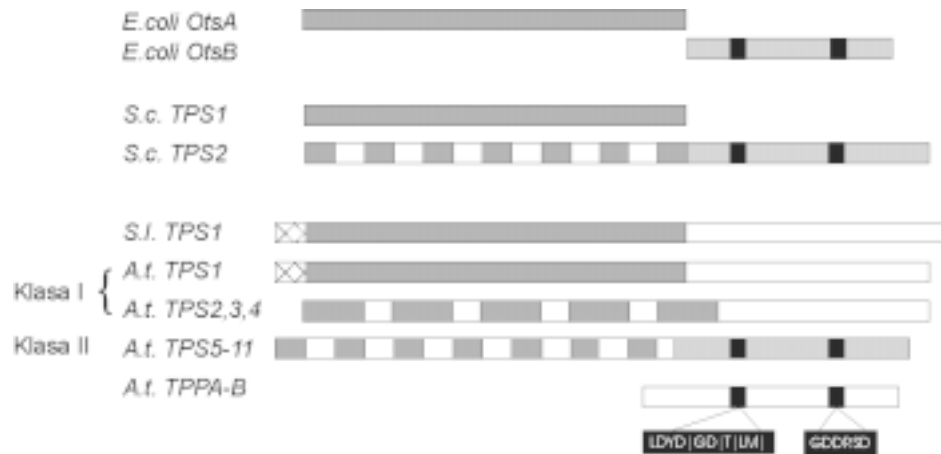


RYCINA 2. Porównanie biosyntezy i degradacji trehalozy (A) oraz sacharozы (B) (wg [26, 35], zmodyfikowane i uzupełnione)

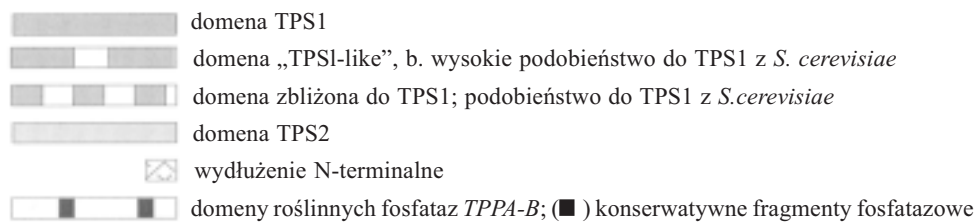
Przy użyciu komplementacji termowrażliwych drożdżowych mutantów $\Delta tps2$ scharakteryzowano u *Arabidopsis* dwa geny kodujące fosfatazę trehalo-6P, TPP: *AtTPPA* i *AtTPPB* [62]. Geny te zawierają konserwatywne fragmenty charakterystyczne dla sekwencji fosfatazowych (ryc. 3) [33]. Poza tymi obszarami podobieństwo do innych genów fosfatazowych nie jest duże. Geny *AtTPPA* i *AtTPPB* wyrażane są w kwiatach i innych młodych, rozwijających się tkankach roślinnych [36,49]. Przy użyciu RT-PCR wykazano tkankowo specyficzną ekspresję tych genów, regulowaną być może zależnie od stadium rozwoju rośliny [26,33]. Ilość genów, homologów *TPP*, może nadal wzrastać. Z dużym prawdopodobieństwem prognozowany jest udział kolejnych homologów *TPP* (*AtTPPC* - *AtTPPJ*), co zwiększałoby do 21 liczbę genów metabolizmu trehalozy u *Arabidopsis* [52].

2.2. Rozkład trehalozy

Trehaloza hydrolizowana jest nieodwracalnie do dwóch cząsteczek glukozy przez trehalazę, specyficzną α, α -glukohydrolazę (EC 3.2.1.28). Alternatywnie trehaloza może być metabolizowana przy udziale fosforylasy trehalozy (EC 2.4.1.64) (ryc. 2). U mikroorganizmów trehaloza wykorzystywana jest jako endo- i egzogenne źródło węgla, co wiąże się z występowaniem np. u grzybów dwóch typów odmiennych trehalaz [4,14,23,50,54]. Intrygujące jest, że u roślin i zwierząt trehalaza jest równie szeroko rozpowszechniona, pomimo braku endogenego substratu [31,39]. Egzogenne trehaloza



RYCINA 3. Struktura genów kodujących biosyntezę trehalozy u mikroorganizmów i roślin (wg [33], zmienione; *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*), *Selaginella lepidophylla* (*S.l.*), *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*)).

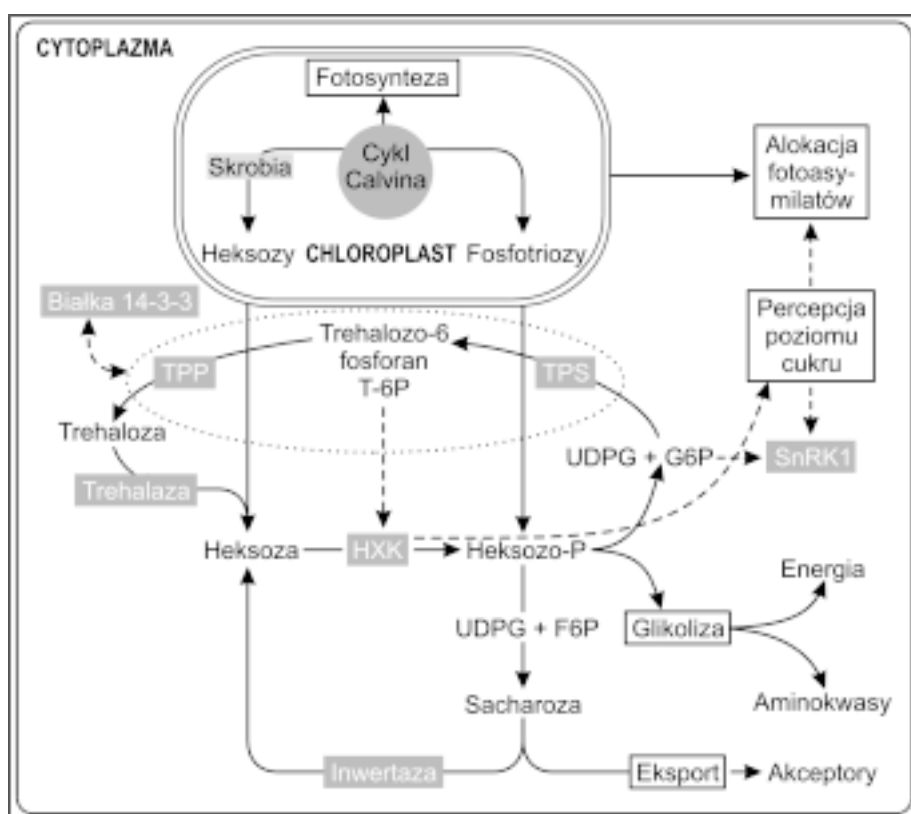


generalnie nie jest wykorzystywana przez rośliny. Wyjątkiem są sym-biotyczne interakcje z mikoryzalnymi grzybami czy bakteriami wiążącymi azot, gdzie poziom wytwarzanej trehalozy zależy zarówno od genotypu bakterii, jak i genotypu gospodarza roślinnego [28,35]. W brodawkach roślin motylkowatych obniżeniu ilości trehalozy towarzyszy wzrost ilości sacharozy, natomiast podczas stresu poziom trehalozy i sacharozy rośnie równocześnie [26,35]. Interakcje roślina – drobnoustroje wytwarzające trehalozę nie są odosobnione, niemniej na tle niezbyt licznych doniesień charakteryzujących trehalazę roślinne niełatwo jest wnioskować, jaki typ trehalazy jest szczególnie rozpowszechniony.

2.2.1. Trehalaza

Aktywność trehalazy wykazano przede wszystkim u roślin motylkowatych (soja, lucerna, łubin) [1,35,66,68], ale również u innych gatunków roślin, takich jak: pomidory, tytoń, trzcina cukrowa czy rzodkiewnik [35,36]. Aktywność trehalazy u tych roślin, jak i w pyłku kwiatowym *Camellia japonica* oraz *Lilium* charakteryzuje się wysoką specyficznością substratową, optimum pH 4–7 oraz znaczną termostabilnością [1,35]. Tak jak u drożdży, roślinna trehalaza jest specyficznie hamowana przez walidamycynę A, antybiotyk pochodzący ze *Streptomyces hygroscopicus* [26,27,36]. Zahamowanie

aktywności trehalazy u *Arabidopsis* powoduje nie tylko akumulację trehalozy, ale równoczesną redukcję zawartości sacharozy i skrobi, zahamowanie wydłużenia korzeni siewek oraz gromadzenie skrobi w pędach; przy czym gromadzona trehaloza zmienia aktywność syntazy sacharozy i inwertazy [35,49]. Niewykluczone, że trehaloza może być toksyczna dla roślin powodując zakłócenia metabolizmu sacharozy oraz zahamowanie syntezy ściany komórkowej [35]. U roślin motylkowatych trehalaza występuje przede wszystkim w brodawkach korzeniowych, ograniczając lokalizację trehalozy wytwarzanej przez mikroorganizmy [26,28,35]. Poza brodawkami trehalaza jest stwierdzana także w innych organach i tkankach roślin motylkowatych [26,35,68]. Aktywność trehalazy z brodawek korzeniowych soi (*Glycine max*) charakteryzuje się szerokim zakresem optymalnego pH (3,5–7) oraz wysokim optimum temperatury (59°C) [1]. Enzym ten (glikoproteina o masie cząsteczkowej 66 kDa) wykazuje duże podobieństwo do kwaśnych trehalaz grzybowych i jest niewrażliwy na kationy dwuwartościowe, związki chelatowe i sulfhydrylowe [1]. Obecność trehalazy wykazano w sterylnych hodowlach tkanek korzenia soi, co sugeruje, że w brodawkach korzeniowych enzym ten jest pochodzenia roślinnego [28,35]. Aktywność trehalazy lokalizowana nie tylko w zainfekowanej strefie brodawek, lecz także w ich rdzeniu, świadczy o potencjalnym



RYCINA 4. Powiązanie metabolizmu trehalozy z przemianami sacharozy i fotosyntezą (wg [41] zmienione)

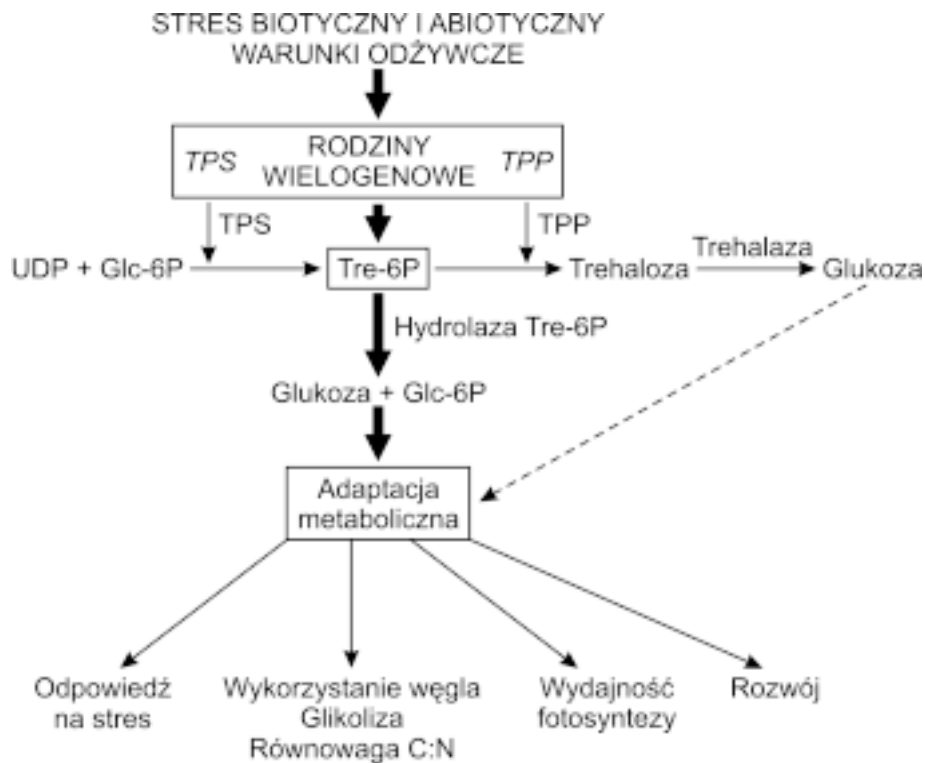
zabezpieczeniu roślin przed obecnością tego disacharydu [1,35]. Gen *GMTRE1*, kodujący trehalazę w komórkach soi, ulega ekspresji we wszystkich organach, na niskim, lecz stałym poziomie [1]. Podczas sekwencjonowania genomu *Arabidopsis* zidentyfikowano izolog T19F06.1 wykazujący wysoką homologię do genu *GMTRE1*, chociaż homologia na poziomie sekwencji aminokwasów wynosi tylko 59% [36]. Przypuszcza się, że pojedynczy gen koduje trehalazę nie tylko u *Glycine max* i *Arabidopsis*, ale najprawdopodobniej także u innych gatunków roślin [1,26,36].

Ekspresja genu kodującego trehalazę i aktywność tego enzymu mogą być indukowane podczas infekcji *Arabidopsis* przez produkujący trehalozę fitopatogen *Plasmodiophora brassicae* [8]. Indukcja trehalazy zachodzi również przy infekcji ryżu przez grzyb *Magnaporthe grisea*, który dla swego rozwoju wymaga rozkładu trehalozy w tkankach rośliny [22,58]. Związane jest to z post-translacyjną aktywacją trehalazy zlokalizowanej w grzybowej ścianie komórkowej [58]. Co więcej, infekcyjność patogenicznych dla człowieka szczepów *Candida* oraz innych patogenów grzybowych dotyczy także zmian metabolizmu trehalozy [3,60,69,70,72].

3. REGULACYJNE WŁAŚCIWOŚCI SYNTAZY TPS I TREHALOZO-6 FOSFORANU

Możliwość heterologicznej ekspresji roślinnych genów TPS w komórkach mikroorganizmów i *vice versa* ujawniła szereg niespodziewanych obserwacji [26,27,33,44,73]. Okazało się, że funkcja genu *AtTPS1* prowadzi do wytworzenia letalnego fenotypu w rozwoju zarodkowym *Arabidopsis*, gdyż zatrzymywany jest etap inicjacji odkładania materiałów zapasowych podczas dojrzewania nasion [16]. *In vitro* przy niskim poziomie sacharozy zablokowanie rozwoju zarodków mutantów *tps1* wskazuje, że funkcja *AtTPS1* związana z metabolizmem cukrów niezbędna jest dla prawidłowego wzrostu i rozwoju tej rośliny. Poza tym mutanty *tps1*, letalne w embriogenezie zarodków, wykazują zredukowany poziom Tre-6P, co powoduje niemożność wykorzystywania dostępnych cukrów i w konsekwencji zmniejsza efektywność fotosyntezy [16,17]. N-terminalne skrócenie genów *AtTPS1* i *SITPS1* wzmacnia aktywność ekspresyjnego białka TPS w komórkach drożdży, prowadząc do wzrostu poziomu trehalozy przewyższającego jej endogenne stężenie w komórkach tych mikroorganizmów [59]. Mutacje Arg¹⁷ i Leu²⁷ zmieniają niską aktywność enzymów TPS o pełnej sekwencji aminokwasowej, tak więc domeny N-końca roślinnych TPS mogą stanowić region aktywacji enzymu, w którym Arg i Leu działają jako potencjalne miejsca interakcji z białkami regulatorowymi, np. z białkami 14-3-3 [34,59]. Uszkodzone syntazy zarówno z widliczki, jak i z rzodkiewnika wykazują wysoką, ale zróżnicowaną aktywność. TPS z *Selaginella* może wykazywać nawet 5-krotnie wyższą aktywność w porównaniu z analogicznie skróconą syntazą TPS z *A. thaliana*, co wyjaśnia wysoką akumulację trehalozy u *Selaginella* i praktyczny jej brak u *Arabidopsis* [59]. Różnica w akumulacji trehalozy może

wynikać z odmiennej regulacji na poziomie białka TPS, jak i z różnicy w aktywności trehalaz z obu roślin [59]. Potencjalnie wysoka aktywność TPS wskazuje na funkcję sygnałową, tym bardziej że może wzrastać okazjonalnie, np. podczas transdukcji sygnału, podobnie jak aktywność cyklazy adenylanowej w komórkach drożdży [37]. Ilość trehalozy, którą można zidentyfikować w komórkach roślinnych, jest znikoma (0,15 mg/g suchej masy lub mniej [41,47]), niewykluczone więc, że roślinne białka TPS mają genetycznie uwarunkowaną niższą aktywność katalityczną w porównaniu z syntazami TPS z drożdży [59]. Ekspresja genów metabolizmu trehalozy z *E. coli*, kodujących fosfatazę TPP i hydrolazę TPH w mutantach *A. thaliana* [52] potwierdziła niezbędność AtTPS1 dla procesów prawidłowej embriogenezy u tej rośliny [16]. Trehaloza (100 μ M) dostarczana do hodowli zarodków mutantów *tps1* niwelowała efekt tej mutacji, a ekspresja trehalazy z *E. coli* zabezpieczała siewki przed toksycznym oddziaływaniem wysokiego stężenia tego cukru w podłożu [52]. Wynika stąd, że komórki roślinne mogą pobierać zewnątrzkomórkową trehalozę, a fenotyp letalnego mutantu *Attps1* może być wyeliminowany przez ekspresję *TPS1* z *E. coli* [52]. Poza tym komplementacja mutantów *Attps1* przez TPS z *E. coli*, wykazuje dodatkowo, że nie trehaloza, lecz Tre-6P niezbędny jest dla prawidłowego wykorzystania węglowodanów, wzrostu i rozwoju tej rośliny [41,42,51]. *In vitro*, Tre-6P nie jest inhibitorem aktywności HXK z *Arabidopsis* i liści szpinaku [16,17] i być może u roślin w regulacji metabolizmu cukrów funkcjonuje „molekularny przełącznik” inny niż HXK [38,43]. Poza tym, przez tzw. karmienie cukrowe wykazano, że proces glikolizy także u roślin jest regulowany zależnie od poziomu Tre-6P, a niewykluczone, że ten związek może również pośredniczyć w kontroli oddychania i szlaku pentozowego [52,64]. Regulacyjne oddziaływanie Tre-6P, którego brak jest letalny w rozwoju zarodków *Arabidopsis* [16], udokumentowane w pracach zespołu Smeekens [52,61] wykazało, że akumulacja Tre-6P powoduje gwałtowne zahamowanie wzrostu siewek rosnących na trehalozie, wynikające z niedostatecznej defosforylacji Tre-6P, spowodowanej wysokim poziomem trehalozy [52]. Przez analizę ekspresji 35 genów związanych z metabolizmem Tre-6P, z których połowę stanowią geny uczestniczące w odpowiedzi roślin na stres, wykazano, że poziom Tre-6P skorelowany jest z ekspresją części z tych genów, w tym *AtPK19*, genu kinazy rybosomalnego białka S6 oraz genu *AtKIN11*, kinazy związanej z wykorzystaniem cukrów u *Arabidopsis* [52]. Postulowana obecnie centralna rola Tre-6P w metabolizmie trehalozy zwraca szczególną uwagę na funkcję TPS1 w generalnej regulacji metabolizmu węglowodanów, powiązanej z oddziaływaniem czynników stresowych, hormonów, statusem związków azotowych i efektywnością fotosyntezy (ryc. 5) [11,21,42,44,51,52], tym bardziej że, jak wykazano ostatnio, syntaza TPS1 niezbędna jest nie tylko do wegetatywnego wzrostu, ale również do procesów kwitnienia [61].



RYCINA 5. Centralne umiejscowienie T-6P w procesach adaptacji metabolicznej u roślin (wg [42, 52]; opracowane i zmienione)

UWAGI KOŃCOWE

Obecność endogennej trehalozy przez długi czas była przypisywana jedynie tzw. roślinom wskrzeszonym [26,35]. U innych roślin stosunkowo niedawno stwierdzono obecność funkcjonalnych genów syntezy tego disacharydu [7,33,63,73]. Pomimo że metabolizm trehalozy i sacharozy u roślin wykazuje wyraźną analogię (ryc. 2) [18,26,35], nie jest jasne, jak dokładnie trehaloza wpływa na ekspresję genów, aktywność enzymów i efektywność fotosyntezy. Oprócz roślin jedynie cyjanobakterie zdolne są do syntezy sacharozy zachodzącej w plastydach pochodzących od cyjanobakteryjnych przodków [13,40,45]. Młodsza ewolucyjnie sacharoza ma przewagę nad „starszą siostrą” – trehaloza, wykazując większą rozpuszczalność w niskich temperaturach i lepsze parametry transportu floemowego przy wysokich, zbliżonych do 1 M [55] stężeniach tego cukru [26,65]. Poza tym hydroliza sacharozy zachodzi przy udziale dwóch enzymów: inwertazy, ale również syntazy sacharozy, co ma znaczenie regulacyjne [32,48,56,57]. Zredukowana dostępność sacharozy podczas interakcji rośliny – drobnoustroje może być korzystna dla roślin, gdyż tylko niektóre z fito-

patogenów czy symbiontów mają zdolność wykorzystania sacharozy, podczas gdy inne, np. grzyby ektomikoryzalne są często pozbawione aktywności inwertazy [35]. Natomiast akumulacja trehalozy nie jest korzystna, to też rośliny wyewoluowały w kierunku gromadzenia innych niż trehaloza związków zabezpieczających ich komórki przed szkodliwymi wpływami środowiska [33,65]. Poza tym wytworzyły precyzyjnie kontrolowany system syntezy, jak i degradacji trehalozy [41,42]. Intermediat biosyntezy, Tre-6P aktualnie zaczyna być rozpatrywany jako nowy czynnik regulujący procesy percepcji i sygnalizacji poziomu cukrów, skorelowanych z intensywnością fotosyntezy (ryc. 5) [17,41,42,44,51,52].

Zwiększenie wydajności fotosyntezy pomimo stosowania nowych odmian roślin i różnego rodzaju nawożenia stanowi ciągle wyzwanie dla fizjologów i producentów żywności. Poszukiwane są nowe możliwości zwiększenia asymilacji węgla, poprzez zmiany ekspresji genów czy modulację aktywności enzymów regulujących szybkość fotosyntezy [41,42]. Wzrost wydajności fotosyntezy w roślinach transgenicznych można osiągnąć przez insercję genu *ostA* z *E. coli* [41], co powoduje zwiększenie ilości Tre-6P prowadzące do zwiększenia wydajności fotosyntezy [41,42,44]. Natomiast rośliny rzodkiewnika czy tytoniu z nadekspresją genu *TPP* wykazują znikomy poziom Tre-6P i ekspresja genów fotosyntezy jest obniżona [17,41]. Sugeruje to, że poziom Tre-6P, nie trehalozy, kontroluje asymilację węgla (ryc. 4) [41]. Zastosowanie HPLC i użycie specyficznych izoform HXK z *Yarrowia lipolytica* [47] pozwala obecnie wykryć niewielkie zmiany ilości Tre-6P i uzyskać wiarygodne wyniki potwierdzające informację, że wysoka ekspresja *TPS* może zwiększyć wydajność fotosyntezy nawet 5-krotnie [41].

Zdolność percepcji sygnałów węglowych i azotowych aktywuje geny regulujące zarówno wydajność fotosyntezy, jak i asymilację azotu (ryc. 5) [11,21,46]. W wielokomórkowym organizmie roślinnym jest to dodatkowo skomplikowane, gdyż w optymalizacji całościowego przepływu metabolitów zaangażowane są zintegrowane sieci sygnałów cukrowo-azotowych [11,21], krzyżujące się z drogami sygnałów hormonalnych i stresowych [11,30,46], transmitowanych przez procesy fosforylacji/defosforylacji, ubikwitynacji czy farnezytacji [53,64]. Połączenie tych różnorodnych mechanizmów wymaga komunikacji między szlakami (*cross-talk*), jak i między odpowiednimi kompartmentami subkomórkowymi [21,30,53,64]. Niedawno wykazano, że mutanty *tps1* owadów są również letalne [9]. Powstaje mnóstwo pytań, na które brak dziś odpowiedzi, np. czy istnieją konserwatywne, wspólne miejsca interakcji Tre-6P u drożdży, roślin i owadów, organizmów zróżnicowanych genetycznie i fizjologicznie; czy anonsowana możliwość genetycznych manipulacji poziomem Tre-6P [41,44] doprowadzi do znaczącej regulacji efektywności fotosyntezy; jak regulowana jest aktywność białka TPS1 – czy na poziomie aktywacji preprokursora, przez wiązanie białek 14-3-3, czy przez zmiany konformacyjne kompleksu donor-TPS-akceptor [25]. Pomimo że obecnie pojawiają się ciągle nowe informacje dotyczące zaangażowania TPS1 i Tre-6P w procesach kontroli fotosyntezy, asymilacji N₂, wzrostu i rozwoju roślin, dalsze badania są nadal niezbędne dla pełnego wyjaśnienia ich funkcji [17,41,42,44,46,52].

LITERATURA

- [1] AESCHBACHER RA, MÜLLER J, BOLLER T, WIEMKEN A. Purification of the trehalase *GMTRE1* from soybean nodules and cloning of its cDNA. *GMTRE1* is expressed at a low level in multiple tissues. *Plant Physiol* 1999; **119**: 489–495.
- [2] ALLISON SD, CHANG B, RANDOLPH T, CARPENTER JF. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch Biochem Biophys* 1999; **365**: 289–298.
- [3] ALVAREZ-PERAL FJ, ARGUELLES JC. Changes in external trehalase activity during human serum-induced dimorphic transition in *Candida albicans*. *Res Microbiol* 2000; **151(10)**: 837–843.
- [4] ARGÜELLES JC. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeast: a comparative analysis. *Arch Microbiol* 2000; **174**: 217–224.
- [5] BEHM CA. The role of trehalose in the physiology of nematodes. *Int J Parasitol* 1997; **27**: 215–229.
- [6] BELTRAN FF, CASTILLO R, VICENTE-SOLER J, CANSADO J, GACTO M. Role for trehalase during germination of spores in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; **193(1)**: 117–121.
- [7] BLAZQUEZ MA. Isolation and molecular characterization of *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J* 1998; **13**: 685–689.
- [8] BRODMAN A, SCHULLER A, LUDWIG-MÜLLER J, AESCHBACHER RA, WIEMKENA, BOLLER T, WINGLER A. Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Mol Plant Microb Int* 2002; **7**: 693–700.
- [9] CHEN Q, MA E, BEHAR KL, XU T, HADDAD GG. Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 2002; **277**: 3274–3279.
- [10] CIERESZKO I. Regulacyjna rola cukrów, percepcja cukrów i przekazywanie sygnału w komórkach roślinnych. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 269–289.
- [11] CORUZZI MG, ZHOU L. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging matrix effects. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 247–253.
- [12] CROWE JH, CARPENTER JF, CROWE LM. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 1998; **60**: 73–103.
- [13] CURATTI L, PORCHIA AC, HERRERA-ESTRELLA L, SALERNO GL. A procaryotic sucrose synthase gene (*sus A*) isolated from a filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium encodes a protein similar to those of plants. *Planta* 2000; **211**: 729–735.
- [14] D'ENFERT C, BONINI BM, ZAPPELLA PDA, FONTAINE T, da SILVA AM, TEREZI HF. Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 1999; **32**: 471–483.
- [15] DMITRYJUK M, ŻÓŁTOWSKA K. Purification and characterization of acid trehalase from muscle of *Ascaris suum* (Nematoda). *Comp Biochem and Physiol* 2003; **136**: 61–69.
- [16] EASTMOND PJ, van DIJCKEN AJ, SPIELMAN M, KERR A, TISSIER AF, DICKINSON HG, JONES JD, SMEEKENS SC, GRAHAM IA. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis is essential for *Arabidopsis* embryos maturation. *Plant J* 2002; **29**: 225–235.
- [17] EASTMOND PJ, LI Y, GRAHAM A. Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants. *J Exp Bot* 2003; **54**: 533–537.
- [18] ELBEIN AD, PAN YT, PASTUSZAK I, CARROLL D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 2003; **13**: 17R–27R.
- [19] EROGLU A, RUSO MJ, BIEGANSKI R, FOWLER A, CHALEY S, BAYLEY H, TONER M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnol* 2000; **18**: 163–167.
- [20] FILLINGER S, CHAVEROCHE MK, van DIJCK P, de VRIES R, RUIJTER G, THEVELEIN J, d'ENFERT C. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 2001; **147**: 1851–1862.
- [21] FOYER CH, PARRY M, NOCTOR G. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J Exp Bot* 2003; **54**: 585–593.
- [22] FOSTER AJ, JENKINSON JM, TALBOT NJ. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *Eur Mol Biol Org* 2003; **22**: 225–235.
- [23] FRANÇOIS J, PARROU JL. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 2001; **25**: 125–145.

- [24] GARG AK, KIM JK, OWENS TG, RANWALA AP, CHOI YD, KOCHIAN LV, WU RJ. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 15898–15903.
- [25] GIBSON RP, TARLING CA, ROBERTS S, WITHERS SG, DAVUES GJ. The donor subsite of trehalose-6-phosphate synthase. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1950–1955.
- [26] GODDIJN OJM, van DUN K. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 315–319.
- [27] GODDIJN OJM, VERWOERD TC, VOOGD E, KRUTWAGEN RWHH, de GRAAF PTHM, POELS J, van DUN K, PONSTEIN AS, DAMM B, PEN J. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol* 1997; **113**: 181–190.
- [28] GORDON AJ, LEA PJ, ROSENBERG C, TRINCHANT JC. Nodule formation and function in legumes. W: LEA PJ and J-F Morot-Gaudry, „Plant Nitrogen”. Springer-Verlag/INRA-Editions, Versailles, FR ISBN; 2001: 101–146.
- [29] GUO N, PUHLEV I, BROWN DR, MANSBRIDGE J, LEVINE F. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnol* 2000; **18**: 168–171.
- [30] HETMANN A, KOWALCZYK S. Mono- i disacharydy – drożdżowymi, roślinnymi i zwierzęcymi cząsteczkami sygnałowymi regulującymi ekspresję genów. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 87–112.
- [31] ISHIHARA R, TAKETAMI S, SASAI-TAKEDATSU M, KINO M, TOKUNAGA R, KOBAYASHI Y. Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human trehalase. *Gene* 1997; **202**: 69–74.
- [32] KOCH K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 235–246.
- [33] LEYMAN B, van DIJCK P, THEVELEIN JM. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 510–513.
- [34] MOORHEAD G. Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J* 1999; **18**: 1–12.
- [35] MÜLLER J, WIEMKEN A, AESCHBACHER RA. Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Sci* 1999; **147**: 37–47.
- [36] MÜLLER J, AESCHBACHER RA, WINGLER A, BOLLER T, WIEMKEN A. Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1086–1093.
- [37] NOWAK JZ. Cykliczny AMP: synteza, inaktywacja i mechanizmy działania w komórce. W: Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. PWN 2004: 37–63.
- [38] OESTERHELT C, GROSS W. Different sugar kinases are involved in the sugar sensing of *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol* 2002; **128**: 291–299.
- [39] OESTERREICHER TJ, MARKESICH DC, HENNING SJ. Cloning, characterization and mapping of the mouse trehalase (Treh) gene. *Gene* 2001; **270**: 211–220.
- [40] PAGE-SHARP M, BEHM CA, SMITH GD. Involvement of the compatible solutes trehalose and sucrose in the response to salt stress of a cyanobacterial *Scytonema species* isolated from desert soils. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1472**: 519–528.
- [41] PAUL M, PELLNY T, GODDIJN O. Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 197–200.
- [42] PAUL M, PELLNY T. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J Exp Bot* 2003; **54**: 539–547.
- [43] PEGO JV, SMEEKENS SCM. Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 531–536.
- [44] PELLNY TK, GHANNOUM O, CONROY JP, SCHLUEPMANN H, SMEEKENS S, ANDRALOJC J, KRAUSE KP, GODDIJN O, PAUL MJ. Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnol* 2004; **2**: 71–82.
- [45] PORCHIA AC, SALERNO GL. Sucrose biosynthesis in a procaryotic organism: sucrose synthase from *Anabaena sp.* strain PCC 7119 is remarkably different from the plant enzymes with respect to substrate affinity and amino-terminal sequence. *Planta* 1999; **210**: 34–40.
- [46] POURTAU N, MARES M, PURDY S, QUENTIN N, RUEL A, WINGLER A. Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence. *Planta* 2004; **219**: 765–772.
- [47] ROESSNER U, WAGNER C, KOPKA J, TRETHERWEY RN, WILLMITZER L. Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J* 2000; **23**: 131–142.
- [48] ROITCH T, BALIBREA ME, HOFMANN M, PROELS R, SINHA AK. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J Exp Bot* 2003; **54**: 513–524.

- [49] ROLLAND F, MOORE B, SHEEN J. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 2002; **14**: 185–205.
- [50] ROLLAND F, WINDERICKX J, THEVELEIN JM. Glucose-sensing and signaling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research* 2002; **2**: 183–201.
- [51] SCHLUEPMANN H, PELLNY T, VAN DIJKEN A, SMEEKENS S, PAUL M. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 6849–6854.
- [52] SCHLUEPMANN H, van DIJKEN A, AGHDASI M, WOBES B, PAUL M SMEEKENS S. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol* 2004; **135**: 879–890.
- [53] SHINOZAKI K, DENNIS E. Cell signalling and gene regulation. Global analyses of signal transduction and gene expression profiles. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 405–409.
- [54] SINGER MA, LINDQUIST S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotech* 1998; **16**: 460–469.
- [55] SOWIŃSKI P. Rurki sitowe – fenomen funkcjonalności. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 619–634.
- [56] STURM A, TANG GQ. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 401–406.
- [57] SZADEL A, LORENC-PLUCIŃSKA G. Metabolizm sacharozy u roślin oraz jego regulacja w warunkach stresów środowiskowych. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 47–59.
- [58] TALBOT NJ, FOSTER AJ. Genetics and genomics of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: developing an experimental model for understanding fungal diseases of cereal. *Adv Bot Res* 2001; **34**: 263–287.
- [59] van DIJCK P, MASCORRO-GALLARDO JO, de BUS M, ROYACKERS K, ITURRIAGA G, THEVELEIN JM. Truncation of *Arabidopsis thaliana* and *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast. *Biochem J* 2002; **366**: 63–71.
- [60] van DIJCK P, De ROP L, SLUFCIK K, van AEL E, THEVELEIN JM. Disruption of the *Candida albicans* TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase decreases infectivity without affecting hypha formation. *Infect Immun* 2002; **70**: 1772–1782.
- [61] van Dijken AJH, SCHLUEPMANN H, SMEEKENS SCM. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol* 2004; **135**: 969–977.
- [62] VOGEL G, FIEHN O, JEAN-RICHARD-dit-BRESSEL L, BOLLER T, WIEMKEN A, AESCHBACHER RA, WINGLER A. Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. *J Exp Bot* 2001; **52**: 1817–1826.
- [63] VOGEL G, AESCHBACHER RA, MÜLLER J, BOLLER T, WIEMKEN A. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation on the yeast *tps2* mutant. *Plant J* 1998; **13**: 673–683.
- [64] WANG R, OKAMOTO M, XING X, CRAWFORD N. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol* 2003; **132**: 556–567.
- [65] WINGLER A. The function of trehalose biosynthesis in plant. *Phytochemistry* 2002; **60**: 437–440.
- [66] WOLSKA-MITASZKO B, MAŁEK W. Trehalase from *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) and *Lupinus polyphyllus*. *J Basic Microbiol* 1999; **39**: 43–50.
- [67] WOLSKA-MITASZKO B. Trehaloza – substancja przedziwna. Właściwości, występowanie, zastosowania. *Biotechnologia* 2001; **2**: 36–53.
- [68] WOLSKA-MITASZKO B, MOLESTAK E. Properties of trehalase from different organs of alfalfa, *Medicago sativa*. *Acta Physiol Plant* 2004; in press.
- [69] XIA Y, CLARKSON J, CHARNLEY AK. Trehalose-hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Inverteb Pathol* 2002; **80**: 139–147.
- [70] XIA Y, GAO M, CLARKSON JM, CHARNLEY AK. Molecular cloning, characterisation, and expression of a neutral trehalase from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Inverteb Pathol* 2002; **80**: 127–137.
- [71] YEO ET, KWON HB, HAN SE, LEE JT, RYU JC & BYUN MO. Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 2000; **10**: 263–268.

- [72] ZARAGOZA O, de VIRGILIO C, PONTON J, GANCEDO C. Disruption in *Candida albicans* of the *TPS2* gene encoding trehalose-6-phosphate affects cell integrity and decreases infectivity. *Microbiology* 2002; **148**: 1281–1290.
- [73] ZENTELLA R, MASCORRO-GALLARDO JO, van DIJCK P, FOLCH-MALLOL J, BONINI B, VAN VAEC C, GAXIOLA R, COVARRUBIAS AA, NIETO-SOTELO J, THEVELEIN JM, ITURRIAGA G. *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps* mutant. *Plant Physiol* 1999; **119**: 1473–1482.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano 17.08. 2004 r.

Przyjęto: 21.01.2005 r.

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin