

UDZIAŁ KWAŚNYCH FOSFATAZ W GOSPODARCE FOSFORANOWEJ KOMÓREK ROŚLINNYCH*

ACID PHOSPHATASES ROLE IN PLANT CELLS PHOSPHATE HOMEOSTASIS

Ewa ŻEBROWSKA, Iwona CIERESZKO

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

Streszczenie: Kwaśne fosfatazy (EC 3.1.3.2) są grupą enzymów katalizujących hydrolizę zróżnicowanych estrów ortofosforanowych. Występują powszechnie w komórkach roślinnych, a także zwierzęcych. Wśród kwaśnych fosfataz wyróżniamy kilka grup enzymów charakteryzujących się zróżnicowaną specyficznością substratową i lokalizacją komórkową. Fosfatazy wykazujące wysoką specyficzność substratową zostały stosunkowo dobrze opisane i ich funkcja w procesach metabolicznych jest znana, natomiast rola niespecyficznych kwaśnych fosfataz nie została w pełni poznana. Ze względu na lokalizację można wyróżnić kwaśne fosfatazy zewnątrzkomórkowe uczestniczące w pozyskiwaniu fosforanu nieorganicznego – Pi z podłoża oraz wewnątrzkomórkowe biorące udział w mobilizacji Pi z puli organicznych związków fosforu w komórkach roślin. Niespecyficzne kwaśne fosfatazy uczestniczą w reakcji roślin na niedobór fosforu, ale także na deficyt wody, zasolenie, czy w odpowiedzi roślin na patogeny. Purpurowe kwaśne fosfatazy, zawierające jony metali w centrum aktywnym, są najlepiej poznane spośród niespecyficznych fosfataz. U roślin ze względu na masę molekularną wyróżniamy dwie grupy tych enzymów: małe (ok. 35 kDa) i duże (ok. 55 kDa) purpurowe kwaśne fosfatazy. Pełnią one istotną rolę w uwalnianiu Pi z trudno dostępnych roślinom organicznych źródeł oraz prawdopodobnie uczestniczą w usuwaniu reaktywnych form tlenu w starzejących się lub poddanych stresowi tkankach. Szczegółowa rola purpurowych fosfataz w komórkach roślinnych jest obecnie intensywnie badana. Fitazy są wysoko specyficznymi fosfatazami, które uczestniczą w hydrolizie trudno ulegającego degradacji kwasu fitynowego (oraz jego soli). Enzymy te biorą udział w udostępnianiu zapasowych form fosforu w kielkujących nasionach, ale także mogą być wydzielane przez mikroorganizmy i niektóre rośliny do podłoża. Prezentowana praca przedstawia najnowsze doniesienia oraz podsumowuje dotychczasowy stan wiedzy na temat zróżnicowanej roli kwaśnych fosfataz, głównie ich udziału w gospodarce fosforanowej roślin.

Słowa kluczowe: deficyt fosforu, fitazy, purpurowe kwaśne fosfatazy, sekrecja.

Summary: Acid phosphatases (EC 3.1.3.2) are enzymes catalyzing the hydrolysis of different orthophosphate esters. They are abundant among both plant and animal tissues. Acid phosphatases can be divided into few groups of enzymes with differential substrate specificity and cellular localization. High substrate specific acid phosphatases are relatively well described and their role in metabolic processes is well known. On the other hand, role of nonspecific acid phosphatases is still not clear. Acid phosphatases can be divided in terms of localization on extracellular (take part in Pi scavenging from soil) and intracellular

*Praca finansowana z grantu MNiSW nr N N303 3764 33.

(play role in Pi mobilization from internal organic phosphorus sources). Nonspecific acid phosphatases take part in plant reaction not only on phosphorus deficiency but also water stress and pathogen defense. Purple acid phosphatases are the largest group of nonspecific phosphatases containing metal ions in their active site. Plant purple acid phosphatases can be distinguished into small (about 35 kDa) and large (about 55 kDa). They play a significant role not only in Pi releasing from unavailable, organic Pi sources but probably also in reactive oxygen species scavenging during senescence or in stressed tissues. However their role in plant metabolism is currently under investigation. In contrast, phytases are highly specific phosphatases which hydrolyze phytic acid (and phytates). These enzymes hydrolyze storage forms of phosphorus in seeds but they can also be secreted into the rhizosphere by microorganisms and some plants. This review summarizes our current knowledge about diverse roles of acid phosphatases, especially their role in plant phosphorus nutrition.

Key words: purple acid phosphatases, phosphate deficiency, phytase, secretion.

WSTĘP

Fosfatazy to grupa enzymów hydrolizujących estry kwasu fosforowego (V), odpowiedzialnych za uwalnianie fosforanu nieorganicznego (Pi) ze związków organicznych [10, 42]. Fosfor jest niezbędnym składnikiem wielu związków organicznych, m.in. kwasów nukleinowych, fosforanów cukrów, tłuszczowców złożonych i adenozyntrifosforanu, pełni istotną rolę w procesach metabolicznych w komórkach roślinnych, m.in. wpływa na przebieg i intensywność fotosyntezy i oddychania, a także pełni funkcje regulatorowe, np. oddziałując na ekspresję genów [7, 69]. Dla prawidłowego funkcjonowania procesów metabolicznych w komórkach roślinnych musi być utrzymywane stałe stężenie Pi w cytozolu. Fosforan nieorganiczny występuje w komórkach roślinnych głównie w postaci puli cytoplazmatycznej i wakuolarniej. Pula wakuolarna stanowi rezerwuuar Pi (od 80% do 95% całości) i służy do utrzymania metabolicznej puli cytoplazmatycznej na stałym poziomie [7, 69]. Sprawne pobieranie i dystrybucja jonów fosforanowych pomiędzy komórkami roślinnymi, a także organellami w obrębie danej komórki odbywa się dzięki różnorodnym błonowym transporterom Pi o zróżnicowanym powinowactwie do fosforanu, a także dzięki aktywności fosfataz uwalniających Pi z organicznych związków fosforu [7, 12, 25, 29, 69].

Wyróżnia się trzy podstawowe grupy fosfataz, ze względu na liczbę wiązań estrowych danego substratu: fosfomonoesterazy (hydrolazy monoestrów fosforanowych – EC 3.1.3), fosfodiesterazy (hydrolazy diestrów fosforanowych – EC 3.1.4) oraz fosfotriesterazy (hydrolazy triestrów fosforanowych – EC 3.1.5 [1]. Zarówno fosfodiesterazy katalizujące reakcję uwalniania reszt fosforanowych z kwasów nukleinowych, jak i fosfotriesterazy są dosyć słabo poznane. W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono natomiast fosfomonoesterazom. Ze względu na optimum pH wśród nich można wyróżnić: kwaśne fosfomonoesterazy (kwaśne fosfatazy, EC 3.1.3.2) wykazujące maksymalną aktywność przy pH 4–6 oraz alkaliczne fosfomonoesterazy (alkaliczne fosfatazy, EC 3.1.3.1) optimum pH 8–10 [10, 42, 48]. Fosfatazy zasadowe generalnie wykazują absolutną specyficzność substratową (np. cytozolowa fosfataza fruktozo-1,6-bisfosforanu czy sacharozo-6-fosforanu). Fosfata-

zy kwaśne są bardziej zróżnicowaną grupą enzymów i mimo że zwykle nie wykazują absolutnej specyficzności substratowej, można wyróżnić wśród nich dwie grupy enzymów. Do pierwszej należą niespecyficzne enzymy wykazujące niewielką specyficzność lub wcale niewykazujące specyficzności (ryc. 1). Enzymy z tej grupy pełnią istotną rolę w uwalnianiu, transporcie i mobilizacji Pi. Drugą grupę tworzą kwaśne fosfatazy o wyraźnej, choć nie absolutnej specyficzności (np. fosfataza 3-fosfoglicerynianowa czy fosfoenolopirogronianowa) pełniące różnorodne funkcje w metabolizmie komórkowym [10, 42].

W regulacji procesów komórkowych roślin uczestniczą specyficzne fosfatazy białkowe (EC 3.1.3.3, EC 3.1.3.16, EC 3.1.3.48), które katalizują reakcje defosforylacji białek. Specyficzne białkowe fosfatazy biorą udział w wielu procesach regulacyjnych oraz szlakach transdukcji sygnałów [32, 59]. U roślin wyróżnia się m.in. serynowo-treoninowe fosfatazy białkowe, takie jak: PP1 (ang. *Protein Phosphatase 1*), PP2A, PP2C oraz tyrozynowe fosfatazy białkowe – PTP (ang. *Protein Tyrosine Phosphatase*). Białkowe fosfatazy *Arabidopsis thaliana* uczestniczą w regulacji procesów, takich jak: transport auksyn czy przekazywanie sygnałów z udziałem ABA [59]. Fosfatazy PP2A i PP2B mogą także uczestniczyć w szlakach transdukcji sygnałów wywołanych podaniem sacharozy, które prowadzą do zmian ekspresji genów odpowiedzialnych za metabolizm cukrów [9]. PTPazy odgrywają ważną rolę w adhezji komórek, regulują aktywność MAPK (ang. *Mitogen Activated Protein Kinase*) (u roślin i zwierząt), które są składnikami szlaków sygnałowych [32].

Hydrolizę fosforanów mogą przeprowadzać również nieorganiczne pirofosfatazy (EC 3.6.1.1), które rozkładają pirofosforan (PPi) [1, 40]. PPi może być produkowany w szeregu reakcji biochemicznych zachodzących w komórkach roślinnych; jest on także dostarczany roślinom uprawnym w postaci nawozów. Duże ilości pirofosforanu gromadzone są na terenie cytozolu komórek, gdzie jest wykorzystywany jako alternatywne źródło energii w warunkach deficytu ATP [38, 40].

Kwaśne fosfatazy są bardzo zróżnicowaną grupą enzymów pełniących wiele różnorodnych funkcji w komórkach roślinnych. Pierwsze doniesienia dotyczące obecności tych enzymów w komórkach roślinnych pojawiły się już w latach dwudziestych ubiegłego stulecia. Jednak w pełni poznana jest rola jedynie fosfataz wykazujących wąską specyficzność substratową. W ostatnich latach, dzięki rozwojowi technik biologii molekularnej, na nowo podjęto intensywne badania zwłaszcza fosfataz niespecyficznych, pełniących wiele funkcji w metabolizmie roślin. Niniejsze opracowanie ma na celu uporządkowanie wiedzy i przedstawienie najważniejszych informacji dotyczących kwaśnych fosfataz (głównie niespecyficznych).

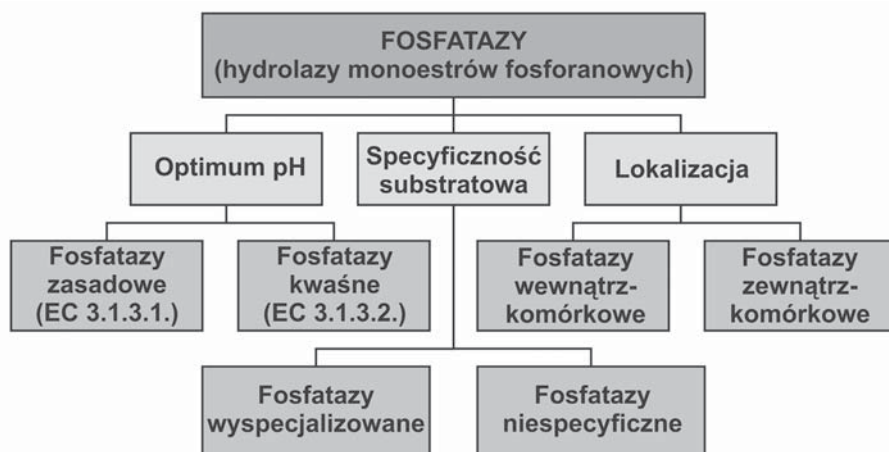
WŁAŚCIWOŚCI I FUNKCJE KWAŚNYCH FOSFATAZ

Masa molekularna kwaśnych fosfataz waha się od 20 kDa (w nasionach traw) do 240 kDa (w nasionach soi); średnio wynosi ok. 50–70 kDa [10, 42]. Enzymy o masie powyżej 70 kDa wykazują budowę podjednostkową, przy czym mogą być

homodimerami lub heterodimerami, a także homotetramerami lub heterotetrametrami. Większość kwaśnych fosfataz to glikoproteiny o zróżnicowanej zawartości reszt cukrowych (do ok. 10% masy enzymu). Właściwości kwaśnych fosfataz (masa cząsteczkowa, optimum pH, V_{max} , specyficzność substratowa) zostały już szczegółowo opisane [10, 42]. Enzymy te cechują się wysoką heterogennością uwarunkowaną genetycznie bądź nabytą dzięki modyfikacjom potranslacyjnym białka. Występuje wiele izoenzymów kwaśnych fosfataz zarówno w tkankach roślinnych, jak i zwierzęcych. W tkankach *A. thaliana* zidentyfikowano kilka izoform kwaśnych fosfataz (pięć w pędzie i trzy w korzeniu), przy czym jedna z nich była indukowana w warunkach deficytu fosforu [55]. Niektóre kwaśne fosfatazy zawierają w centrum aktywnym jony metali (purpurowe fosfatazy).

Mechanizm działania fosfataz jest dobrze poznany. Reakcja polega na sekwencyjnym uwalnianiu produktów hydrolizy monoestrów fosforanowych. Jako pierwszy uwalniany jest produkt alkoholowy, który nie hamuje aktywności enzymu bądź hamuje go niekompetycyjnie. Kończącym produktem reakcji jest P_i , który hamuje kompetycyjnie enzym [42]. Aktywność kwaśnych fosfataz może być stymulowana przez niektóre dwuwartościowe kationy metali (Ni^{2+} , Ca^{2+} czy Mg^{2+}). W obecności jonów metali ciężkich czy związków, takich jak: arsenian, molibdenian, winian czy szczawian, aktywność tych enzymów jest hamowana [42, 53].

Wśród kwaśnych fosfataz wyróżniamy enzymy niespecyficzne oraz wyspecjalizowane (ryc. 1). Fosfatazy niespecyficzne uczestniczą w odzyskiwaniu fosforanu z wielu typów estrów kwasu ortofosforowego i ich rola jest słabo poznana. Natomiast rola fosfataz wyspecjalizowanych w regulacji szlaków metabolicznych została dobrze poznana i opisana. Przykładowo, w komórkach roślinnych fosfataza fosfoenolopirogronianowa (enzym wakuolarny) razem z kinazą pirogronianową bierze udział w utrzymaniu ogólnej puli PEP (ang. *PhosphoEnoloPyruvate*) i pośrednio acetylo-CoA. Poziom fosfatazy PEP i

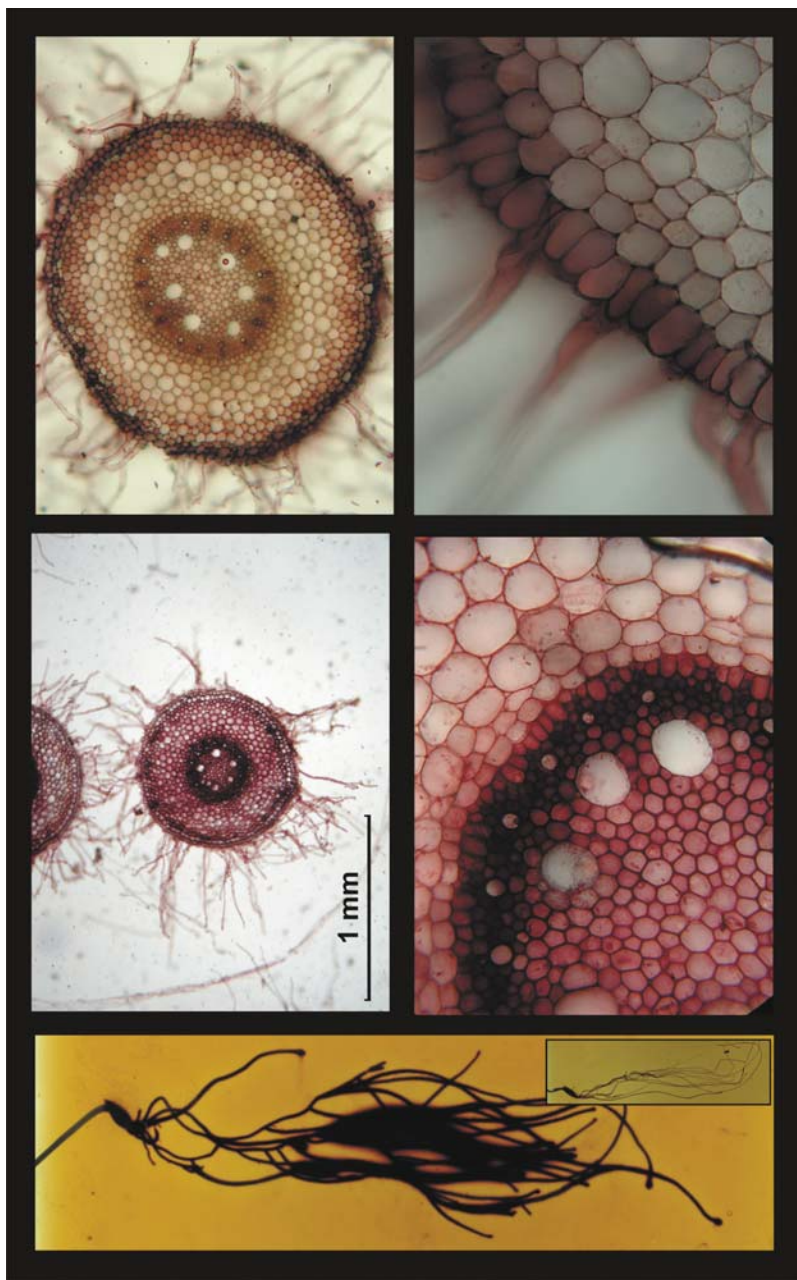


RYCINA 1. Schemat przedstawiający przyjętą klasyfikację fosfataz
FIGURE 1. Phosphatases classification

ADP-zależnej kinazy pirogronianowej ulega zmianom w zależności od dostępności fosforanu nieorganicznego. W warunkach nadmiaru Pi poziom i aktywność fosfatazy PEP maleje, zaś wzrasta aktywność i ilość kinazy pirogronianowej. Natomiast, w warunkach deficytu fosforanu kinaza pirogronianowa jest eliminowana z komórek, a ilość i aktywność fosfatazy PEP wzrasta [10]. Niskie optimum pH fosfatazy PEP (ok. pH 5,6) w zawiesinie komórek *Brassica nigra* sugeruje jej lokalizację na terenie wakuoli, skąd może uwalniać Pi z PEP niezależnie od aktywności cytozolowej kinazy pirogronianowej [10]. W tkankach cebuli zidentyfikowano fosfatę PEP o wyższym optimum pH (ok. 7). Istnienia tego typu fosfataz PEP nie można też wykluczyć także u innych roślin wyższych [52]. W fotooddechaniu istnieje dodatkowy szlak powstawania seryny z kwasu 3-fosfoglicerynowego (3-PGA) przy udziale fosfataz. Uruchomienie tego szlaku zachodzi prawdopodobnie podczas gwałtownego spadku poziomu ATP, ADP i Pi. Rola specyficznych kwaśnych fosfataz została szeroko omówiona w kilku artykułach [10, 42, 52].

Ze względu na lokalizację możemy wyróżnić fosfatazy wewnątrzkomórkowe, które uczestniczą w remobilizacji Pi ze źródeł wewnętrznych oraz zewnątrzkomórkowe (sekrecyjne), które uczestniczą w pozyskiwaniu Pi z podłoża (ryc.1 i 2). Fosfatazy wewnątrzkomórkowe znajdują się zarówno w roślinach, jak i generatywnych organach roślin, głównie na terenie wakuoli. Enzymy te mogą uczestniczyć w mobilizacji magazynowanych w wakuoli organicznych fosforanów, takich jak fityna [10, 42].

Wzmoczoną syntezę i wydzielanie fosfataz zewnątrzkomórkowych przez korzenie obserwuje się zwłaszcza w warunkach deficytu fosforu, zasolenia czy deficytu wody [26, 49]. W warunkach deficytu fosforu obserwuje się gwałtowny wzrost ekspresji genów, następnie aktywności kwaśnych fosfataz w przestrzeniach ściany komórkowej korzenia i szybkie uwalnianie tych enzymów do podłoża [18]. Wykazano znaczący wzrost aktywności kwaśnych fosfataz na terenie ryzosfery, w odległości ok. 3 mm (strefa wyczerpania Pi) od korzeni koniczyny i pszenicy [54]. Fosfatazy wydzielane przez korzenie roślin do roztworu glebowego charakteryzują się wysoką stabilnością w szerokim zakresie pH (4,0–7,6) i temperatury (22–48°C) [54, 55]. Sekrecyjne kwaśne fosfatazy, podobnie jak wiele innych białek sekrecyjnych, są glikozylowane, co chroni je przed proteolityczną degradacją oraz wpływa na ich stabilność w szerokim zakresie pH [42, 55]. Wzmoczoną produkcję i sekrecję kwaśnych fosfataz z komórek korzeni do podłoża obserwowano u wielu roślin m.in. roślin uprawnych, takich jak: pomidor (*Lycopersicon esculentum* L.), łubin (*Lupinus* spp.), soja (*Glycine max* L.), bawełna (*Gossypium hirsutum* L.) czy zboża: pszenica (*Triticum aestivum* L.), kukurydza (*Zea mays* L.), ryż (*Oryza sativa* L.) i owies (*Avena sativa* L.) (ryc. 2) [4, 8, 21, 54, 60, 61, 63]. Intensywność syntezy i sekrecji kwaśnych fosfataz jest różna u różnych gatunków, a nawet odmian roślin, np. jęczmienia, kukurydzy, owsa czy pszenżyta [31, 63, 68]. Spośród roślin uprawnych najwyższą aktywność sekrecyjnych kwaśnych fosfataz udokumentowano u łubinu, zwłaszcza w korzeniach proteidowych roślin rosnących w warunkach niedoboru Pi [61]. Sekrecja kwaśnych fosfataz u roślin żyjących w symbiozie z grzybami może być aktywowana przez grzybowego partnera. Analiza ekspresji genu *TpPAP1* w



RYCINA 2. Lokalizacja kwaśnych fosfataz w całych korzeniach owsa (A) i na przekroju poprzecznym korzeni (B). Korzenie wybarwione mieszaniną barwnika Fast Blue B i substratu fosfataz – fosforanu naphylu. Fioletowe i brunatno-czerwone zabarwienie świadczy o aktywności kwaśnych fosfataz. Aktywność kwaśnych fosfataz obserwowano w korzeniach, a także w podłożu wokół korzeni (fosfatazy sekrecyjne). Na przekroju poprzecznym korzeni najwyższą aktywność kwaśnych fosfataz zlokalizowano na terenie walca osiowego, wokół wiązek przewodzących (niepublikowane)

FIGURE 2. Acid phosphatase localization in oat roots: intact roots (A) and in root transverse cross-sections (B). Roots were treated with Fast Blue B (dye) and naphyl phosphate (substrate for acid phosphatases). Purple and brown colours indicate acid phosphatase activity. On the transverse root section, highest activity was localized around vascular tissues (unpublished)

tkankach *Tagetes patula* w symbiozie z *Archaeospora leptoticha* wykazała 8-krotny wzrost poziomu transkryptu tego genu pod wpływem kolonizacji grzybem [11].

Badania z zastosowaniem mikromacierzy cDNA wykazały wzrost ekspresji genów kodujących kwaśne fosfatazy u kukurydzy, już po 3 dniach wzrostu w warunkach deficytu Pi. Podczas tego eksperymentu obserwowano wzmożoną ekspresję genów aż 28 różnych fosfataz [5]. W innych badaniach, prowadzonych na zawiesinach komórkowych *A. thaliana* okazało się, że dwa geny o najwyższej ekspresji w warunkach deficytu Pi kodują kwaśne fosfatazy [37].

Wyizolowanie i badania mutantów roślin o zmienionej ekspresji kwaśnych fosfataz umożliwiły poznanie roli tych enzymów. Scharakteryzowano mutanty *A. thaliana* z obniżoną produkcją fosfataz: *pup1*, *pup3*, *pho3* [55, 56] oraz z podwyższoną ich ekspresją – *cps* [55]. Mutanty *pup* (ang. *phosphatase underproducer*) charakteryzują się obniżoną sekrecją kwaśnych fosfataz, ale poza tym wykazują normalne reakcje na deficyt fosforu [7, 12, 55, 56]. Z kolei mutant *pho3* wykazuje niższą aktywność kwaśnych fosfataz w korzeniach zarówno w warunkach optymalnego żywienia fosforanowego, jak i w warunkach deficytu fosforu. Mutant *pho3* przejawia cechy typowe dla roślin z deficytem fosforu, takie jak: obniżona zawartość Pi w tkankach (zwłaszcza w korzeniach), zahamowanie wzrostu pędu, gromadzenie antocyjanów oraz akumulację skrobi w liściach [55]. Wyselekcjonowano także mutanty *cps* (ang. *constitutive phosphatase secretors*) wykazujące silniejszą indukcję aktywności kwaśnych fosfataz w korzeniach w warunkach niedoboru Pi niż rośliny kontrolne [55]. Mutanty te mogą być przydatne w badaniach mechanizmów decydujących o sekrecji fosfataz, a także innych odpowiedzi roślin na niedobór fosforu [7]. W ostatnich latach udało się uzyskać transgeniczne rośliny wykazujące nadekspresję kwaśnych fosfataz (tab.1). Przykładem takich roślin jest *A. thaliana* z genem *OsACPI* pochodzącym z ryżu, u której obserwuje się wzrost aktywności tych enzymów w porównaniu z roślinami kontrolnymi [21]. Uzyskano również transgeniczny ryż z nadekspresją genów kodujących sekrecyjną fosfatazę (*LASAP2*) pochodzącą z łubinu [17]. Nadekspresja genów kodujących kwaśne fosfatazy może prowadzić do zwiększenia uwalniania Pi ze źródeł organicznych, które normalnie są słabo dostępne dla roślin.

Niespecyficzne kwaśne fosfatazy, oprócz udziału w gospodarce fosforanowej roślin, mogą uczestniczyć również w odpowiedzi na stres biotyczny. U fasoli wśród genów, których zwiększoną ekspresję obserwowano podczas reakcji nadwrażliwości (HR), zidentyfikowano gen *Hra28* (ang. *Hypersensitive reaction associated*), który najprawdopodobniej koduje kwaśną fosfatazę [22]. Wykazano zwiększoną ekspresję tego genu w tkankach fasoli w odpowiedzi na obecność bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* wywołujących HR. Udział kwaśnych fosfataz w reakcjach odporności na choroby wykazano także u innych roślin. W tkankach jęczmienia obserwowano zwiększenie ilości transkryptu genu kwaśnej fosfatazy podczas reakcji systemicznej odporności na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis*) wywołanej podaniem pochodnych kwasu salicylowego [22]. Podobnie, obserwowano wzrost aktywności kwaśnych fosfataz w tkankach tytoniu po inokulacji bakteriami wywołującymi HR [22]. Kwaśne fosfatazy mogą również pełnić funkcję ochronną przeciw

TABELA 1. Rośliny transgeniczne z nadekspresją genów kodujących niespecyficzne kwaśne fosfatazy

TABLE 1. Transgenic plants with overexpression of nonspecific acid phosphatases genes

Organizm	Gen	Pochodzenie genu	Wzrost ekspresji	Literatura
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>MtPAP1</i>	<i>Medicago truncatula</i>	4,6–9,9	[65]
<i>Oryza sativa</i>	<i>LASAP2</i>	<i>Lupinus albus</i>	18	[17]
<i>A. thaliana</i>	<i>OsACP1</i>	<i>O. sativa</i>	–	[21]*
<i>Trifolium repens</i>	<i>MtPAP1</i>	<i>M. truncatula</i>	1,40–3,1	[34]

* W pracy nie podano wartości liczbowych

owodom, tak jak jedno z wegetatywnych białek zapasowych VSP2 (ang. *Vegetative Storage Proteins*) w tkankach *A. thaliana* indukowane m.in. w warunkach deficytu fosforu i ataku insektów [30].

PURPUROWE KWAŚNE FOSFATAZY

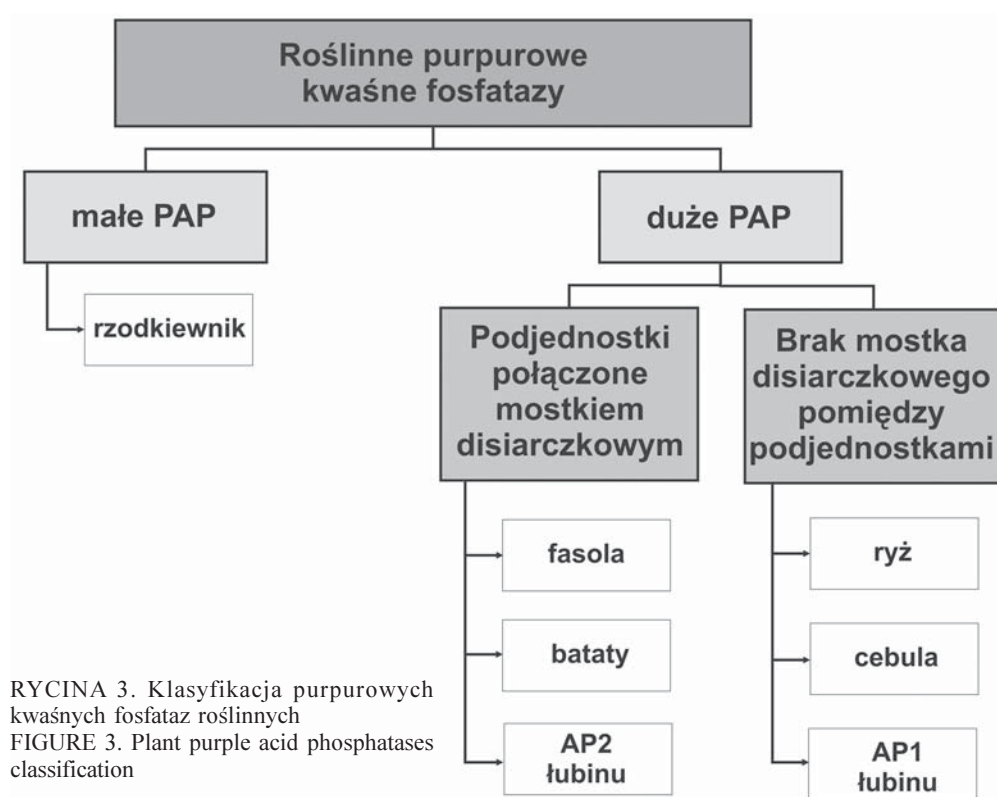
Spośród niespecyficznych kwaśnych fosfataz do tej pory najlepiej poznane są purpurowe kwaśne fosfatazy – PAP (ang. *Purple Acid Phosphatases*). Zawierają one jony metali w centrum aktywnym i wykazują w roztworze zabarwienie od różowego (enzym w formie aktywnej) po purpurowe (enzym nieaktywny). Enzymy te swoje zabarwienie w roztworze wodnym zawdzięczają transferowi ładunków pomiędzy chromoforowym jonem żelaza (Fe (III)) i resztą tyrozynową [28, 43]. Są to enzymy niespecyficzne, katalizujące uwolnienie Pi z różnorodnych związków organicznych w zakresie pH od 4 do 7 [50]. Analiza porównawcza struktury PAP wykazała konserwatywne sekwencje (DXG/GDXXY/GNH(D/E)/VXXH/GHXXH) i motywy strukturalne zarówno wśród ssaków, jak i roślin i innych eukariontów [28]. Potencjalne sekwencje kodujące PAP zostały zidentyfikowane także u bakterii, jednak dotąd informacje na ich temat są niepełne. Motyw strukturalny, konserwatywny wśród wszystkich metalo-fosfomonoesteraz, to $\beta\alpha\beta\alpha$ harmonijka. Pomimo dość konserwatywnej struktury, jak i sekwencji, PAP pochodzące z różnych gatunków (a nawet z tego samego gatunku) mogą się znacznie różnić między sobą. Enzymy występujące w komórkach ssaków i bakterii w centrach aktywnych zawierają koordynacyjnie związane dwa jony żelaza Fe(III)-Fe(II) [28, 43, 51]. Rola PAP u ssaków jest stosunkowo dobrze poznana. Uczestniczą one w transporcie żelaza, resorpcji kości, reakcjach odpornościowych, a także w niektórych reakcjach redoks, czy generacji RFT w sposób podobny do reakcji Fentona u roślin [28, 43].

U roślin w centrum aktywnym drugi jon żelaza może być zastąpiony jonem cynku Fe(III)-Zn(II) (KBPAP z fasoli, czy PAP soi, jedna z PAP u batata) lub manganu Fe(III)-Mn(II) (jedna z PAP u batata) [28, 51]. Ostatnio wykazano, że trzecia izoforma PAP u batata, podobnie jak u zwierząt, może zawierać dwa jony żelaza w centrum aktywnym [62].

Wszystkie znane purpurowe fosfatazy, podobnie jak większość białek sekrecyjnych, są glikoproteinami wykazującymi wysoką konserwatywność i zróżnicowane

rozmieszczenie miejsc glikozylacji (reszta cukrowa połączona jest z białkiem resztą asparaginową – *N*-glikozylacja) [43]. Znaczenie *N*-glikozylacji w stabilności purpurowych fosfataz wykazano stosując ekspresję roślinnych genów PAP z *Lupinus luteus* (Lu_AP) i *Phaseolus vulgaris* (Ph_AP) w tkankach owadów. Wykazano, że enzymy te różnią się pod względem konserwatywności. Ph_AP należy do konserwatywnej grupy glikoprotein (wymaga zajęcia wszystkich miejsc glikozylacji aby enzym mógł być wydzielany i aktywny). Lu_AP, z kolei zachowuje swoją funkcję mimo braku obsadzenia niektórych miejsc glikozylacji [44].

U roślin, na podstawie masy molekularnej, wyróżniono 2 grupy PAP: pierwszą z nich stanowią monomery o masie molekularnej ok. 35 kDa, tzw. małe PAP (stosunkowo niedawno zidentyfikowane u roślin) [28, 43]. Drugą rodzinę stanowią tzw. duże PAP – homodimery ok. 55 kDa, homologiczne raczej do PAP grzybowych czy mykobakteryjnych (ryc. 3) [62]. Małe purpurowe fosfatazy roślin mają tylko jedną domenę i są strukturalnie zbliżone do PAP u ssaków. Spośród małych PAP najlepiej poznano do tej pory AtACP5 *A. thaliana* [45]. AtACP5 jest fosfatazą sekrecyjną i podobnie jak PAP u ssaków, wykazuje aktywność peroksydazową. Jej produkcja jest indukowana w warunkach deficytu fosforu i stresu oksydacyjnego [45]. W rodzinie dużych PAP można wyróżnić dwie podrodziny różniące się sposobem połączenia podjednostek: mostkiem disiarczkowym lub wiązaniem niekowalencyjnym (ryc. 3) [43]. W strukturze dużych purpurowych fosfataz



roślinnych możemy wyróżnić dwie domeny. Domena N-końcowa nie pełni funkcji katalitycznych i jest zbudowana z dwóch β -harmonijek (strukturalnie zbliżona do domeny typu III zwierzęcego białka fibronektyny). Z kolei domena C-końcowa stanowi centrum katalityczne enzymu, ponieważ ma centrum metalowe. Składa się z fragmentów zawierających dwa motywy $\beta\alpha\beta\alpha$ [28]. Spośród dużych purpurowych fosfataz roślinnych najlepiej poznano dotąd KBPAP (ang. *Kidney Bean PAP*) wyodrębnioną z *Phaseolus vulgaris* [50, 57].

Olczak i wsp. opisali nową grupę metalofosfataz PPD (PPD1–PPD5) (ang. *diphosphate nucleoside-specific phosphohydrolase*) w tkankach łubinu żółtego [43]. Purpurowe fosfatazy z tej grupy są najprawdopodobniej homopolimerami o masie molekularnej ok. 75 kDa – znacznie wyższej niż typowe dla rodziny dużych PAP. W porównaniu z małymi i dużymi PAP, PPD mają dodatkową sekwencję na N końcu (ok. 150 reszt aminokwasowych). Analizując sekwencję genomu *A. thaliana* wskazano istnienie kilku genów kodujących podobne białka [43].

Purpurowe fosfatazy u roślin wyższych najczęściej kodowane są przez kilka genów. Opisano cztery geny kodujące PAP w tkankach batatów [62]. W genomie *A. thaliana* zlokalizowano aż 29 genów kodujących purpurowe fosfatazy [28]. Scharakteryzowano 7 z nich (AtPAP7–AtPAP13) klonując ich sekwencję cDNA, oraz zbadano ich reakcje na deficyt fosforu. Wykazano, że AtPAP7 i AtPAP8 mają niewielką masę molekularną, z kolei AtPAP9–AtPAP13 podobne są do dużych PAP z fasoli. W warunkach deficytu fosforu obserwowano wzrost ekspresji transkryptów AtPAP11 i AtPAP12, przy czym deficyt fosforu nie wpłynął na ekspresję pozostałych pięciu PAP [28]. Z kolei badania z użyciem mikromacierzy cDNA wykazały wzrost ekspresji 11 spośród 27 badanych PAP u *A. thaliana* w warunkach deficytu fosforu [35]. Porównano poziom ekspresji 28 genów kodujących PAP w różnych organach *A. thaliana* [67]. Okazało się, że ekspresja poszczególnych genów jest różna w organach wegetatywnych, natomiast wszystkie z nich ulegają ekspresji w kwiatach [67].

Purpurowe fosfatazy roślin wyższych są przedmiotem zainteresowań badaczy ze względu na ich właściwości hydrolityczne, które mogą pomagać w uwalnianiu Pi z organicznych, trudno dostępnych roślinom źródeł. Wykazano, że dwie PAP (sekrecyjna i związana z błoną komórkową) z *L. albus* są silnie indukowane podczas deficytu fosforu. Indukcja i sekrecja PAP w tkankach łubinu była związana wyłącznie z rejonami proteidowymi głodzonych korzeni [60, 61]. Wewnątrzkomórkowe PAP zlokalizowane na terenie wakuoli (np. AtPAP26 u *A. thaliana*) mogą uczestniczyć w rozkładzie różnorodnych, wakuolarnych metabolitów w warunkach niedoboru fosforu [58]. Mogą one również brać udział w pozyskiwaniu fosforanów z PEP (fosfoenolopirogronian) w warunkach niedoboru fosforu [10], jednak wymagałoby to transportu PEP do wakuoli, a pirogronianu z wakuoli, którego istnienia do tej pory u roślin nie stwierdzono [28].

Z kolei PPD1, obecna w tkankach łubinu żółtego, może uczestniczyć w regulacji zawartości difosfonukleotydów i pirofosforanu w tkankach roślin [43]. Dodanie Pi albo Phi ($H_2PO_3^-$) do głodzonej zawiesiny komórek pomidora powoduje zarówno spadek aktywności wewnątrzkomórkowych jak i sekrecyjnych izoform PAP, jak i całkowitą degradację białka PAP sekrecyjnych oraz istotne obniżenie poziomu białka

PAP wewnątrzkomórkowej. Skorelowane jest to z syntezą *de novo* dwóch serynowych proteaz zewnątrzkomórkowych, które uczestniczą w degradacji białek sekrecyjnych PAP [4].

Niektóre PAP dodatkowo pełnią rolę w pozyskiwaniu fosforanów z fityny, jednego z głównych roślinnych materiałów zapasowych bogatych w fosfor. Transgeniczne rośliny *A. thaliana* zawierające gen purpurowej fosfatazy (MtPAP1) z *M. truncatula* wykazywały nawet 10-krotny wzrost aktywności kwaśnych fosfataz w apoplaście korzeni w porównaniu z roślinami kontrolnymi (tab.1). Poza tym u tych roślin obserwowano ponad dwukrotny przyrost biomasy, a także zawartości fosforu całkowitego, kiedy jedynym źródłem fosforu w podłożu była fityna [65]. Stwierdzono, że podczas kiełkowania, PAP-fitaza wyizolowana z liścieni soi hydrolizuje fitynę z dużą wydajnością [19]. Homologiczne do fitaz sekwencje zostały również zlokalizowane w genomie *A. thaliana* [28]. Ponieważ większość enzymów wykazujących aktywność fitaz nie jest związana z rodziną purpurowych fosfataz, zostaną one opisane w kolejnym podrozdziale.

Purpurowe fosfatazy biorą udział nie tylko w regulacji gospodarki fosforanowej, ale także w metabolizmie ROS (*Reactive Oxygen Species*) w starzejących się bądź poddanych stresom tkankach roślinnych (np. AtACP5 *A. thaliana*). Rolę PAP w usuwaniu ROS potwierdzają badania przeprowadzone na *A. thaliana*, w których wykazano, że AtPAP15 może modulować poziom askorbinianu kontrolując ilość mioinozytolu (prekursora biosyntezy askorbinianu u roślin) [66]. AtPAP15 wykazuje również podobieństwo w sekwencji aminokwasów do fitazy z soi (GmPHY), a także wysoką aktywność wobec fityny [66]. Zidentyfikowano u soi gen *GmPAP3* kodujący najprawdopodobniej purpurową fosfatazę, zlokalizowaną na terenie mitochondrium [26]. Wzrost ekspresji tego genu zarówno w pędach, jak i korzeniach obserwowano w warunkach stresu solnego i oksydacyjnego, ale nie w warunkach deficytu fosforu (w przeciwieństwie do pozostałych PAP soi). Z kolei w kulturach komórkowych tytoniu obserwowano wzrost ekspresji dwóch PAP podczas regeneracji ściany komórkowej w protoplastach, co świadczy o tym, że mogą one uczestniczyć w tworzeniu mikrofibrilli celulozowych [66]. Obecność dwóch jonów metali w każdej z podjednostek purpurowych fosfataz, a także powszechność występowania tych enzymów w tkankach roślinnych sugeruje również ich udział w transporcie i magazynowaniu żelaza, cynku i manganu. Pomimo licznych badań rola PAP nie została do końca wyjaśniona.

FITAZY

Fitazy są fosfatazami o wysokiej specyficzności substratowej, które hydrolizują kwas fitynowy – IP6 (heksafosforan inozytolu) uwalniając Pi [3, 24, 36]. W ciągu ostatniej dekady liczba enzymów opisywanych jako fitazy, albo enzymy rozkładające fitynę znacznie wzrosła. Enzymy te różnią się optimum pH, strukturą i mechanizmem uwalniania reszt fosforanowych. Wyróżnić można kwaśne enzymy degradujące fitynę

(o optimum pH ok. 5) oraz zasadowe (maksymalna aktywność przy pH 8). Większość do tej pory scharakteryzowanych enzymów ma optimum pH w zakresie pH 4,5–6 i należy do grupy kwaśnych enzymów degradujących fitynę [23, 24, 36]. Ze względu na różnice w mechanizmie uwalniania Pi, fitazy można podzielić na trzy grupy: histydynowe kwaśne fosfatazy (HAP), β -propeller fitazy (BPP) do tej pory wyizolowane u kilku gatunków bakterii oraz purpurowe fosfatazy (PAP) [3, 36]. Ze względu na mechanizm działania można wyróżnić: 3-fitazy (EC.3.1.3.8), 6-fitazy (EC.3.1.3.26) i ostatnio także 5-fitazy (EC.3.1.3.72) [23], przy czym 3-fitazy i 6-fitazy należą do HAP fitaz. Większość bakteryjnych, grzybowych i roślinnych fitaz należy do grupy HAP. Przedstawiciele tej klasy mają konserwatywny motyw RHGXRRP w centrum aktywnym, unikalny dla tej klasy enzymów [36]. Większość fitaz to monomery o masie molekularnej od 38 do 100 kDa [3, 24]. Niektóre roślinne enzymy degradujące fitynę, m.in. wyizolowane z korzeni pomidora i kukurydzy czy z nasion kukurydzy i soi są homodimerami. Białka bakteryjnych fitaz, a także niektórych roślinnych enzymów degradujących fitynę są glikozylowane [24].

Enzymy degradujące fitynę występują zarówno u roślin i mikroorganizmów, ale także w niektórych tkankach zwierzęcych. Większość mikroorganizmów produkuje tylko fitazy wewnątrzkomórkowe, jedynie nieliczne wydzielają fitazy do środowiska (*Aspergillus niger* czy bakterie z rodzaju: *Enterobacter* i *Bacillus*) [24, 39]. Jednak dzięki mikroorganizmom wydzielającym fitazy do podłoża fosforan zawarty w fitynie może być dostępny dla roślin [39].

Enzymy degradujące fitynę występują głównie w nasionach i pyłku roślin wyższych, takich jak: zboża, rośliny strączkowe i oleiste. Najwyższą aktywność fitaz obserwowano u zbóż (ryżu, pszenżyta, pszenicy i jęczmienia), gryki, czy szarłat, natomiast aktywność tych enzymów u roślin strączkowych czy oleistych jest około 10-krotnie niższa [24]. Enzymy te pełnią istotną funkcję w kiełkowaniu nasion uwalniając z fityny fosfor, wapń, magnez i mioinozytol niezbędne do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin [46]. Fityna jest silnym chelatorem kationów metali (głównie Mg^{2+} , Ca^{2+} czy Zn^{2+} oraz K^{+}) i uczestniczy w ich magazynowaniu [3, 41]. Enzymy degradujące fitynę wykazują maksymalną aktywność przy pH około 5, natomiast u roślin strączkowych występuje dodatkowe optimum pH około 8 [24]. W ziarniakach zbóż aktywność fitaz jest związana głównie z warstwą aleuronową, z kolei u roślin strączkowych najwyższą aktywność tych enzymów obserwowano w liścieniach. Badania wykazały istnienie u danego gatunku rośliny kilku izoform fitaz, których aktywność może być regulowana przez wiele czynników. Aktywność fitaz podczas kiełkowania może być regulowana przez gibereliny i fosforan (obecność Pi hamuje aktywność fitazy również na poziomie transkrypcji) [24]. W nasionach i pyłku występują zarówno konstytutywne fitazy, jak także fitazy aktywowane podczas kiełkowania. Pomimo iż wzrost aktywności tych enzymów podczas kiełkowania był obserwowany w wielu roślinach, to jednak mechanizm prowadzący do wzrostu ich aktywności nie został w pełni wyjaśniony. Niektóre badania wskazują, że fitazy są syntetyzowane na bazie zapasowego mRNA (ang. *long-lived mRNA*), inne, że poprzez syntezę *de novo* bądź aktywację już istniejących enzymów [24].

Fitazy mogą uczestniczyć w udostępnianiu Pi z podłoża roślinom, gdyż ich niewielką aktywność zaobserwowano w korzeniach. Badania prowadzone na tytoniu wykazały, że przyswajalność Pi związanego w fitynie w dużej mierze zależy od formy fityny. Rośliny nie były zdolne do korzystania z fityny zaabsorbowanej na piasku, chyba że była ona podawana w postaci soli fitynianu wapnia i magnezu [33]. Liczne badania wskazują, że fityna jest słabo degradowana przez rośliny [3, 46]. Podjęto próby uzyskania roślin transgenicznych z nadekspresją genów kodujących fitazy, które byłyby zdolne do lepszego wykorzystania fityny w podłożu (tab. 2). Stosuje się głównie nadekspresję genów fitaz z *A. niger* [6, 13–15, 46]. Wprowadzenie konstruktów genu fitazy i genu kodującego białkową sekwencję sygnałną ekstensyny z marchwi *ex::phyA* do rzodkiewnika spowodowało ok. 20-krotny wzrost aktywności fitaz w korzeniach. U roślin transgenicznych obserwowano również sekrecję fitaz do podłoża, podczas gdy rośliny kontrolne nie wydzielaly fitaz [47]. Transgeniczne rośliny soi zawierające gen fitazy (*appA*) z *E. coli* wykazywały wysoką aktywność cytoplazmatycznych fitaz, spadek zawartości fityny w nasionach o 90% w porównaniu z kontrolą, a także zwiększenie ilości Pi [2]. Jednym z nielicznych przykładów roślin transgenicznych z genem fitazy pochodzenia roślinnego jest *A. thaliana* z genem *MtPHY1* (z *M. truncatula*) (tab. 2). Transgeniczne rośliny *A. thaliana* wydzielaly fitazy do podłoża, przy czym aktywność tych enzymów była kilkunastokrotnie wyższa niż u roślin kontrolnych. Zwiększenie aktywności fitaz poprawiało wzrost roślin transgenicznych i gospodarkę fosforanową, gdy jedynym źródłem fosforu w podłożu była fityna [64]. Podobny efekt uzyskano poprzez inokulację korzeni tytoniu transgeniczną linią *Bacillus mucilaginosus* o wysokiej sekrecji i aktywności fitaz [27].

Duże zainteresowanie fitazami w ostatnich latach wynika głównie z możliwości ich wykorzystania do redukcji zawartości fityny w paszach dla zwierząt, a także w żywieniu dla ludzi. Fitazy stosowane jako dodatek do pasz wpływają na wzrost ich jakości poprzez uwalnianie Pi, który jest wykorzystywany przez zwierzęta, co również prowadzi do ograniczania poziomu zanieczyszczenia środowiska fosforanami [24].

TABELA 2. Rośliny transgeniczne z nadekspresją genów kodujących fitazy
TABLE 2. Transgenic plants with overexpression of phytase genes

Organizm	Gen	Pochodzenie genu	Wzrost ekspresji	Literatura
<i>Oryza sativa</i>	<i>pModF</i>	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	100	[16]
<i>Glycine max</i>	<i>phyA</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	2,5	[13]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ex::phyA</i>	<i>Aspergillus niger</i>	20	[47]
<i>Trifolium subterraneum</i>	<i>phyA</i>	<i>A. niger</i>	1,3–3,6	[14]
<i>Zea mays</i>	<i>phyA2</i>	<i>A. niger</i>	50	[6]
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>ex::phyA</i>	<i>A. niger</i>	–	[15]*
<i>O. sativa</i>	<i>appA</i>	<i>Escherichia coli</i>	46–60	[20]
<i>O. sativa</i>	<i>SrPf6</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>	–	
<i>G. max</i>	<i>appA</i>	<i>E. coli</i>	–	[2]*
<i>A. thaliana</i>	<i>MtPHY1</i>	<i>Medicago truncatula</i>	12,3–16,2	[66]
<i>Trifolium repens</i>	<i>MtPHY1</i>	<i>M. truncatula</i>	1,8–3,7	[34]

* W pracy nie podano wartości liczbowych

PODSUMOWANIE

Kwaśne fosfatazy są różnorodną grupą enzymów katalizujących reakcję uwolnienia reszty fosforanowej ze związków organicznych. Pełnią istotną rolę w gospodarce fosforanowej roślin, nie można także wykluczyć ich udziału w odpowiedzi na czynniki stresowe, takie jak: zasolenie czy deficyt wody. Ogromna różnorodność biochemiczna i strukturalna kwaśnych fosfataz wskazuje na to, iż mogą one pełnić różnorodne, dotąd nieznane funkcje, których poznanie może w istotny sposób wpłynąć na nasze rozumienie ważnych procesów biologicznych roślin.

LITERATURA

- [1] BIELIŃSKA EJ. Oznaczanie aktywności fosfataz. *Acta Agrophys* 2005; **3**: 63–74.
- [2] BILYEYU KD, ZENG P, COELLO P, ZHANG ZJ, KRISHNAN HB, BEUSELINCK PR, POLACCO JC. Conversion of seed phytate to utilizable phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. *Plant Physiol* 2008; **146**: 468–477.
- [3] BOHN L, MEYER AS, RASMUSSEN SK. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008; **9**: 165–191.
- [4] BOZZO GG, DUNN EL, PLAXTON WC. Differential synthesis of phosphate-starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. *Plant Cell Environ* 2006; **29**: 303–313.
- [5] CALDERON-VAZQUEZ C, IBARRA-LACLETTE E, CABALLERO-PEREZ J, HERRERA-ESTRELLA L. Transcript profiling of *Zea mays* roots reveals gene responses to phosphate deficiency at the plant- and species-specific levels. *J Exp Bot* 2008; **59**: 2479–2497.
- [6] CHEN R, XUE G, CHEN P, YAO B, YANG W, MA Q, FAN Y, ZHAO Z, TARCZYNSKI MC, SHI J. Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene. *Transgenic Res* 2008; **17**: 633–643.
- [7] CIERESZKO I. Czy można usprawnić pobieranie fosforanów przez rośliny? *Kosmos* 2005; **54**: 391–400.
- [8] CIERESZKO I, BALWICKA H. Phosphate-starvation response of cereal plants: acid phosphatases and growth changes. W: Li et al. [red] *Plant Nutrition for Food Security, Human Health and Environmental Protection*. Tsinghua University Press, Beijing 2005: 486–487.
- [9] CIERESZKO I, JOHANSSON H, KLECZKOWSKI LA. Interactive effects of phosphate deficiency, sucrose and light/dark conditions on gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol* 2005; **162**: 343–353.
- [10] DUFF SM, SARATH G, PLAXTON WC. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Plant Physiol* 1994; **90**: 791–800.
- [11] EZAWA T, HAYATSU M, SAITO M. A new hypothesis on the strategy for acquisition of phosphorus in arbuscular mycorrhiza: up-regulation of secreted acid phosphatase gene in the host plant. *Mol Plant-Microbe Interact* 2005; **18**: 1046–1053.
- [12] FANG Z, SHAO C, MENG Y, WU P, CHEN M. Phosphate signaling in *Arabidopsis* and *Oryza sativa*. *Plant Sci* 2009; **176**: 170–180.
- [13] GAO XR, WANG GK, SU Q, WANG Y, AN LJ. Phytase expression in transgenic soybeans: stable transformation with a vector-less construct. *Biotechnol Lett* 2007; **29**: 1781–1787.
- [14] GEORGE TS, RICHARDSON AE, HADOBAS PA, SIMPSON RJ. Characterization of transgenic *Trifolium subterraneum* L. which expresses phyA and releases extracellular phytase: growth and P nutrition in laboratory media and soil. *Plant Cell Environ* 2004; **27**: 1351–1361.
- [15] GEORGE TS, SIMPSON RJ, HADOBAS PA, RICHARDSON AE. Expression of a fungal phytase gene in *Nicotiana tabacum* improves phosphorus nutrition of plants grown in amended soils. *Plant Biotechnol J* 2005; **3**: 129–140.
- [16] HAMADAA, YAMAGUCHI K, HARADA M, HORIGUCHI K, TAKAHASHI T, HONDA H. Recombinant, rice-produced yeast phytase shows the ability to hydrolyze phytate derived from seed-based feed, and extreme stability during ensilage treatment. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; **70**: 1524–1527.

- [17] HAMADA A, YAMAGUCHI K, HARADA M, NIKUMARU S, WASAKI J, SHINANO T, MATSUI H, OSAKI M, HONDA H. Production of lupin acid phosphatase in transgenic rice for use as a phytate-hydrolyzing enzyme in animal feed. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; **68**: 1611–1616.
- [18] HARAN S, LOGENDRA S, SESKAR M, BRATANOVA M, RASKIN I. Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiol* 2000; **124**: 615–626.
- [19] HEGEMAN CE, GRABAU EA. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiol* 2001; **126**: 1598–1608.
- [20] HONG CY, CHENG KJ, TSENG TH, WANG CS, LIU LF, YU SM. Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds. *Transgenic Res* 2004; **13**: 29–39.
- [21] HUR YJ, LEE HG, JEON EJ, LEE YY, NAM MH, YI G, EUN MY, NAM J, LEE JH, KIM DH. A phosphate starvation-induced acid phosphatase from *Oryza sativa*: phosphate regulation and transgenic expression. *Biotechnol Lett* 2007; **29**: 829–835.
- [22] JAKOBEK JL, LINDGREN PB. Expression of a bean acid phosphatase cDNA is correlated with disease resistance. *J Exp Bot* 2002; **53**: 387–389.
- [23] JOG SP, GARCHOW BG, MEHTA BD, MURTHY PPN. Alkaline phytase from lily pollen: Investigation of biochemical properties. *Arch Biochem Biophys* 2005; **440**: 133–140.
- [24] KONIETZNY U, GREINER R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int J Food Sci Tech* 2002; **37**: 791–812.
- [25] LAMBERS H, SHANE MW, CRAMER MD, PEARSE SJ, VENEKLAAS EJ. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann Bot* 2006; **98**: 693–713.
- [26] LI WY, SHAO G, LAM HM. Ectopic expression of GmPAP3 alleviates oxidative damage caused by salinity and osmotic stresses. *New Phytol* 2008; **178**: 80–91.
- [27] LI X, WU ZQ, LI WD, YAN RX, LI L, LI J, LI YH, LI MG. Growth promoting effect of a transgenic *Bacillus mucilaginosus* on tobacco planting. *Appl Microb Biotechnol* 2007; **74**: 1120–1125.
- [28] LI D, ZHU H, LIU K, LIU X, LEGGEWIE G, UDVARDI M, WANG D. Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 27772–27781.
- [29] LIN WY, LIN SI, CHIOU TJ. Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants. *J Exp Bot* 2009; **60**: 1427–1438.
- [30] LIU Y, AHN JE, DATTA S, SALZMAN RA, MOON J, HUYGHUES-DESPOINTES B, PITTENDRIGH B, MURDOCK LL, KOIWA H, ZHU-SALZMAN K. *Arabidopsis* vegetative storage protein is an anti-insect acid phosphatase. *Plant Physiol* 2005; **139**: 1545–1556.
- [31] LIU Y, MI G, CHEN F, ZHANG J, ZHANG F. Rhizosphere effect and root growth of two maize (*Zea mays* L.) genotypes with contrasting P efficiency at low P availability. *Plant Sci* 2004; **167**: 217–223.
- [32] LUAN S. Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2003; **54**: 63–92.
- [33] LUNG S, LIM BL. Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate. *Plant Soil* 2006; **279**: 187–199.
- [34] MA XF, WRIGHT E, GE Y, BELL J, XI Y, BOUTON JH, WANG ZY. Improving phosphorus acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.) by transgenic expression of plant-derived phytase and acid phosphatase genes. *Plant Sci* 2009; **176**: 479–488.
- [35] MISSION J, RAGHOTHAMA KG, JAIN A, JOUHET J, BLOCK MA, BLIGNY R, ORTET P, CREFF A, SOMERVILLE S, ROLLAND N, DOUMAS P, NACRY P, HERRERRA-ESTRELLA L, NUSSAUME L, THIBAUD MC. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 11934–11939.
- [36] MULLANEY EJ, ULLAH AHJ. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; **312**: 179–184.
- [37] MÜLLER R, MORANT M, JARMER H, NILSSON L, NIELSEN TH. Genome-wide analysis of the *Arabidopsis* leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiol J* 2007; **143**: 156–171.
- [38] MUSTROPHA, ALBRECHT G, HAJIREZAEI M, GRIMM B, BIEMELT S. Low levels of pyrophosphate in transgenic potato plants expressing *E. coli* pyrophosphatase lead to decreased vitality under oxygen deficiency. *Ann Bot* 2005; **96**: 717–726.

- [39] NANNIPIERI P, ASCHER J, CECCHERINI MT, LANDI L, PIETRAMELLARA G, RENELLA G, VALORI F. Microbial diversity and microbial activity in the rhizosphere. *Ci Suelo* 2007; **25**: 89–97.
- [40] NAVARRO-DE LA SANCHA E, COELLO-COUTIÑO MP, VALENCIA-TURCOTTE LG, HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ EE, TREJO-YEPES G, RODRÍGUEZ-SOTRES R. Characterization of two soluble inorganic pyrophosphatases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 2007; **172**: 796–780.
- [41] OH BC, KIM MH, YUN BS, CHOI WC, PARK SC, BAE SC, OH TK. Ca²⁺-inositol phosphate chelation mediates the substrate specificity of beta-propeller phytase. *Biochemistry* 2006; **45**: 9531–9539.
- [42] OLCZAK M. Kwaśne fosfatazy roślin wyższych. *Wiad Bot* 1996; **40**: 39–51.
- [43] OLCZAK M, MORAWIECKA B, WĄTOREK W. Plant purple acid phosphatases – genes, structures and biological function. *Acta Biochim Polon* 2003; **50**: 1245–1256.
- [44] OLCZAK M, OLCZAK T. N-Glycosylation sites of plant purple acid phosphatases important for protein expression and secretion in insect cells. *Arch Biochem Biophys* 2007; **461**: 247–254.
- [45] DEL POZO JC, ALLONA I, RUBIO V, LEYVA A, DE LA PEÑA A, ARAGONCILLO C, PAZ-ARES J. A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J* 1999; **19**: 579–589.
- [46] RICHARDSON AE, GEORGE TS, HENS M, SIMPSON RJ. Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. W: *Organic Phosphorus in the Environment*. TURNER BL, FROSSARD E, BALDWIN DS [red] CABI Publishing Wallingford 2005: 165–184.
- [47] RICHARDSON AE, HADOBAS PA, HAYES JE. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant J* 2001; **25**: 641–649.
- [48] SAKURAI M, WASAKI J, TOMIZAWA Y, SHINANO T, OSAKI M. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. *Soil Sci Plant Nutr* 2008; **54**: 62–71.
- [49] SARDANS J, PEÑUELAS J, ESTIARTE M. Warming and drought alter soil phosphatase activity and soil P availability in a Mediterranean shrubland. *Plant Soil* 2006; **289**: 227–238.
- [50] SCHENK G, ELLIOTT TW, LEUNG E, CARRINGTON LE, MITIĆ N, GAHAN LR, GUDDAT LW. Crystal structures of a purple acid phosphatase, representing different steps of this enzyme's catalytic cycle. *BMC Struct Biol* 2008; **8**: 6.
- [51] SCHENK G, GAHAN LR, CARRINGTON LE, MITIĆ N, VALIZADEH M, HAMILTON SE, DE JERSEY J, GUDDAT LW. Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe-Mn center of sweet potato purple acid phosphatase *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 273–278.
- [52] SHINANO T, YONETANI R, USHIHARA N, ADACHI H, WASAKI J, MATSUI H, OSAKI M. Characteristics of phosphoenolpyruvate phosphatase purified from *Allium cepa*. *Plant Sci* 2001; **161**: 861–869.
- [53] TABALDI LA, RUPPENTHAL R, CARGNELUTTI D, MORSCH VM, PEREIRA LB, SCHETINGER MRC. Effects of metal elements on acid phosphatase activity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Environ Exp Bot* 2007; **59**: 43–48.
- [54] TARAFDAR JC, CLAASSEN. Preferential utilization of organic and inorganic sources by wheat plant. *Plant Soil* 2005; **275**: 285–293.
- [55] TOMSCHA J. Phosphatase secretion mutants in *Arabidopsis thaliana*. A thesis in plant physiology. The Pennsylvania State University. 2001: 1–110.
- [56] TOMSCHA JL, TRULL MC, DEIKMAN J, LYNCH JP, GUILTINAN MJ. Phosphatase under-producer mutants have altered phosphorus relations. *Plant Physiol* 2004; **135**: 334–345.
- [57] TRUONG NT, NASERI JI, VOGEL A, ROMPELA, KREBS B. Structure-function relationships of purple acid phosphatase from red kidney beans based on heterologously expressed mutants. *Arch Biochem Biophys* 2005; **440**: 38–45.
- [58] VELJANOVSKI V, VANDERBELD B, KNOWLES VL, SNEDDEN WS, PLAXTON WC. Biochemical and molecular characterization of AtPAP26, a vacuolar purple acid phosphatase up-regulated in phosphate-deprived *Arabidopsis* suspension cells and seedlings. *Plant Physiol* 2006; **142**: 1282–1293.
- [59] WANG H, CHEVALIER D, LARUE C, KI CHO S, WALKER JC. The protein phosphatases and protein kinases of *Arabidopsis thaliana*. W: *The Arabidopsis Book* [red] CR Somerville, EM Meyerowitz, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD 2007: 1–38.
- [60] WANG X, TANG C, GUPPY CN SALE PWG. Phosphorus acquisition characteristics of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.) and white lupin (*Lupinus albus* L.) under P deficient conditions. *Plant Soil* 2008; **312**: 117–128.

- [61] WASAKI J, ROTHE A, KANIA A, NEUMANN G, RÖMHELD V, SHINANO T, OSAKI M, KANDELER E. Root exudation, phosphorus acquisition, and microbial diversity in the rhizosphere of white lupine as affected by phosphorus supply and atmospheric carbon dioxide concentration. *J Environ Qual* 2005; **34**: 2157–2166.
- [62] WARATRUJIWONG T, KREBS B, SPENER F, VISOOTTIVISETH P. Recombinant purple acid phosphatase isoform 3 from sweet potato is an enzyme with a diiron metal center. *FEBS J* 2006; **273**: 1649–1659.
- [63] WYSZOLMIRSKA E, SUTUŁA E, CIERESZKO I. Zmiany aktywności kwaśnych fosfataz i wzrostu dwóch odmian owsa w odpowiedzi na niedobór fosforu. *Zesz Probl Post Nauk Rol* 2006; **509**: 161–166.
- [64] XIAO K, HARRISON M, WANG ZY. Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis*. *Planta* 2005; **222**: 27–36.
- [65] XIAO K, KATAGI H, HARRISON M, WANG ZY. Improved phosphorus acquisition and biomass production in *Arabidopsis* by transgenic expression of a purple acid phosphatase gene from *M. truncatula*. *Plant Sci* 2006; **170**: 191–202.
- [66] ZHANG W, GRUSZEWSKI HA, CHEVONE BI, NESSLER CL. An *Arabidopsis* purple acid phosphatase with phytase activity increases foliar ascorbate. *Plant Physiol* 2008; **146**: 431–440.
- [67] ZHU H, QIAN W, LU X, LI D, LIU X, LIU K, WANG D. Expression patterns of purple acid phosphatase genes in *Arabidopsis* organs and functional analysis of AtPAP23 predominantly transcribed in flower. *Plant Mol Biol* 2005; **59**: 581–594.
- [68] ŻEBROWSKA E, ANTONIAK A, CIERESZKO I. Aktywność kwaśnych fosfataz i wzrost dwóch odmian pszenżyta w warunkach niedoboru fosforu. *Zesz Probl Post Nauk Rol* 2008; **524**: 273–279.
- [69] ŻEBROWSKA E, CIERESZKO I. Pobieranie i transport fosforanów w komórkach roślin. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 283–298.

Redaktor prowadzący – M. Olszewska

Otrzymano: 01.07. 2009 r.

Przyjęto: 03.08. 2009 r.

Mgr Ewa Żebrowska

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

Świerkowa 20b, 15-950 Białystok

e-mail: ewaw@uwb.edu.pl