POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 32 2005 NR 1 (37–57)

METABOLIZM NUKLEOTYDÓW U ROŚLIN WYŻSZYCH

NUCLEOTIDE METABOLISM IN HIGHER PLANTS

Adriana SZMIDT-JAWORSKA, Krzysztof JAWORSKI, Jan KOPCEWICZ

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin,
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Streszczenie: Nukleotydy są związkami o ogromnym znaczeniu dla wszystkich żywych organizmów. Biorą one udział w wielu przemianach biochemicznych, są monomerycznymi prekursorami kwasów nukleinowych, źródłem energii, a także prekursorami lub komponentami pierwotnych i wtórnych produktów metabolicznych. Tak więc metabolizm nukleotydów odgrywa niezwykle istotną rolę w procesach wzrostu i rozwoju każdego żywego organizmu. W niniejszej pracy przedstawiono przemiany, jakim podlegają nukleotydy purynowe i pirymidynowe oraz znaczenie tych przemian podczas różnych procesów morfogenetycznych u roślin, tj. dojrzewania zarodków, kiełkowania nasion, rozwoju pędu i organów magazynujących oraz wzrostu kultur komórkowych. Przedstawiono także badania dotyczące wpływu czynników środowiska na metabolizm nukleotydów.

Słowa kluczowe: metabolizm, nukleotydy, puryny, pirymidyny, rośliny wyższe, rozwój roślin.

Summary: Nucleotides are among the most important compounds in all living organisms. They participate in many biochemical processes in cells. They are precursors for nucleic acid synthesis, an energy source and precursors for components of primary and secondary metabolic products. Therefore, the metabolism of nucleotides are crucial for the growth and development of all organisms. In the present review we have concentrated on nucleotides' metabolism and physiological aspects of these processes during different morphogenetic processes, including embryo maturation and seed germination, storage organ development, sprouting and growth of cultured plant cells. The effects of environmental factors on nucleotide metabolism are also described.

Key words: higher plants, metabolism, nucleotides, plant development, purines, pyrimidines.

Wykaz skrótów: **AMP** – adenylan, **ATP** – adenozyno-5'-trifosforan, **CMP** – cytydylan, **dNDP** – deoksyrybonukleozydodifosforan, **GMP** – guanylan, **GTP** – guanozyno-5'-trifosforan, **IMP** – inozynian, **NAD** – nukleotyd nikotynoamidoadeninowy, **NADP** – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowy, **NDP** – rybonukleozydodifosforan, **PRA** – 5-fosforybozyloamina, **PRPP** – 5-fosforybozylo-1-pirofosforanu, **TMP** – tymidylan, **UMP** – urydylan.

WSTĘP

Nukleotydy są związkami o ogromnym znaczeniu dla wszystkich żywych organizmów. Najlepiej poznana jest rola nukleotydów purynowych i pirymidynowych jako monome-rycznych prekursorów DNA i RNA. Jednak nukleotydy purynowe to także wszech-obecne źródła energii (ATP, GTP), sygnały regulatorowe (cykliczny AMP i cykliczny GMP), a także komponenty koenzymów FAD, NAD^+, $NADP^+$, koenzym A, zaś S-adenozylometionina jest donorem grup metylowych. Nukleotydy pirymidynowe są składnikami związków, takich jak: CDP-acyloglicerol uczestniczący w syntezie tłuszczów oraz UDP- i GDP-monosacharydy, będące prekursorami biosyntezy polisacharydów ścian komórkowych.

W przeciwieństwie do mikroorganizmów [48] czy zwierząt [25], stosunkowo niewiele badań dotyczyło metabolizmu i roli nukleotydów purynowych i pirymidynowych u roślin. Od kilku lat coraz częściej pojawiają się doniesienia dotyczące metabolizmu tej grupy związków podczas wzrostu komórek w kulturach komórkowych czy procesach morfogenetycznych roślin nago- i okrytonasiennych [13, 68].

W niniejszej pracy omówiono badania dotyczące przemian metabolicznych, jakim podlegają nukleotydy w komórkach roślin wyższych oraz rolę, jaką odgrywają te przemiany w wybranych procesach morfogenetycznych, takich jak: dojrzewanie i kiełkowanie zarodków zygotycznych i somatycznych, organogeneza pędu, rozwój organów magazynujących. Przedstawiono także badania dotyczące wpływu czynników środowiskowych na metabolizm nukleotydów.

1. OBECNOŚĆ ZASAD, NUKLEOZYDÓW I NUKLEOTYDÓW

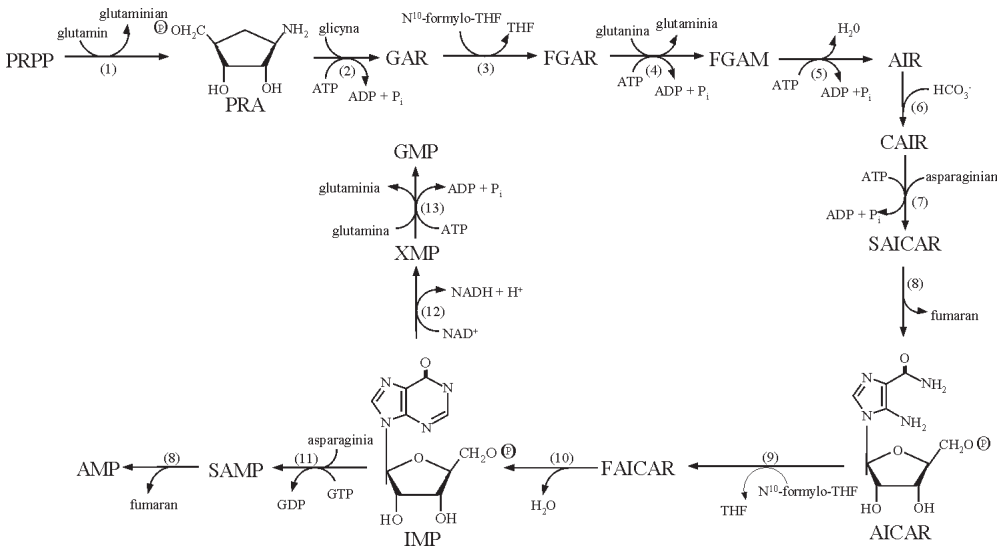
Obecność nukleotydów w materiale roślinnym wykazano wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową [5, 78]. Stwierdzono, że w komórkach najwięcej jest nukleotydów adeninowych, a suma ATP, ADP i AMP jest zwykle na poziomie 80–200 nmoli/g świeżej masy.

Stężenie nukleozydów i wolnych zasad jest zwykle na bardzo niskim poziomie. W komórkach barwinka różowego (*Catharanthus roseus)* ilość adenozyny waha się w granicach 2–9 nmoli/g świeżej masy, podczas gdy wolna adenina jest niewykrywalna [84]. Istnieją jednak wyjątki, np. w liściach zbóż zaobserwowano wysoki poziom zarówno adeniny, jak i adenozyny [62]. Poziom urydyny, adenozyny, guanozyny i adeniny w liściach jęczmienia wynosi odpowiednio 56, 69, 27 i 43 nmole/g świeżej masy i jest wyższy od poziomu ATP. Różnice w poziomie nukleozydów u różnych gatunków roślin mogą wynikać ze zmian w aktywności enzymów i/lub być związane z różnicami w procesach katabolicznych.

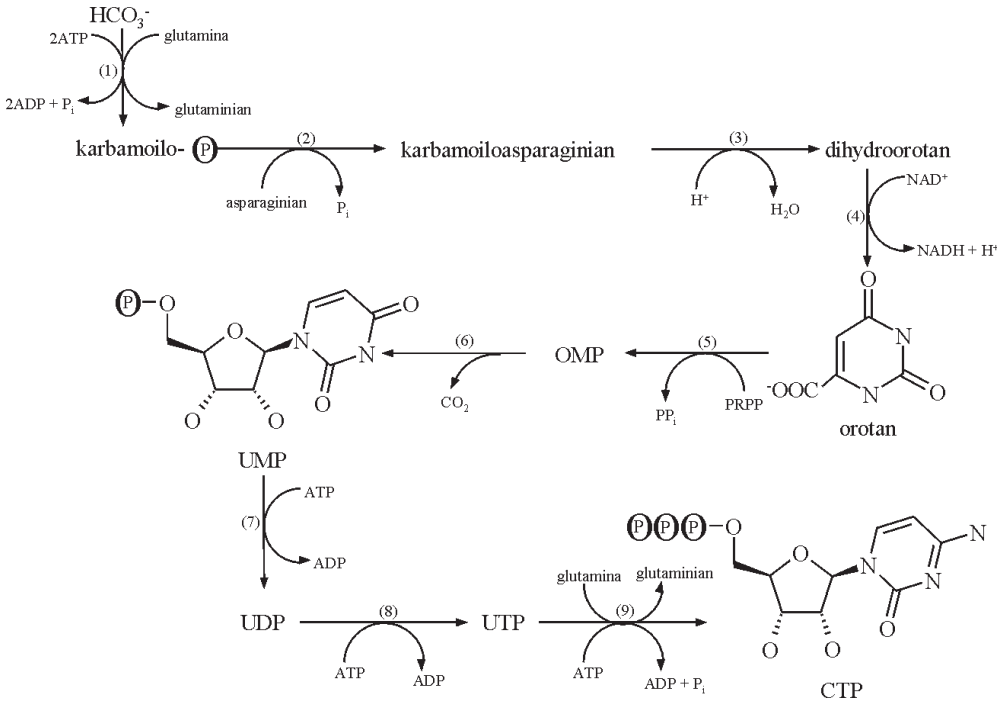
2. BIOSYNTEZA NUKLEOTYDÓW *DE NOVO*

Nukleotydy purynowe mogą być syntetyzowane z kilku prostych prekursorów na szlaku syntezy *de novo*. Szlak biosyntezy adenylanu (AMP) i guanylanu (GMP) z 5-fosforybozylo-1-pirofosforanu (PRPP) został przedstawiony na rycinie 1. Enzymy odpowiedzialne za te przemiany wyizolowane z materiału roślinnego zostały wyszczególnione w tabeli 1. Część z nich została dobrze scharakteryzowana, natomiast obecność innych została potwierdzona jedynie w homogenatach. Brak jest szczegółowych informacji odnośnie syntezy tej grupy nukleotydów u roślin. Istniejące dane pozwalają jedynie przypuszczać, że są to szlaki podobne do tych, jakie opisano u zwierząt i mikroorganizmów [47, 48].

W przeciwieństwie do nukleotydów purynowych, których synteza *de novo* rozpoczyna się od części cukrowo-fosforanowej, w syntezie nukleotydów pirymidynowych



RYCINA 1. Schemat ilustrujący przebieg kolejnych etapów biosyntezy *de novo* nukleotydów purynowych. Metabolity: PRA – 5'-fosforybozylo-1-amina; GAR – rybonukleotyd glicynoamidu; FGAR – rybonukleotyd formyloglicynoamidu; FGAM – rybonukleotyd formyloglicynoamidyny; AIR – rybonukleotyd 5'-aminoimidazolu; CAIR – rybonukleotyd 5'-aminoimidazolo-4-karboksylowy; SAICAR – rybonukleotyd 5'-aminoimidazolo-4-N-bursztynylo-karboksyamidu; AICAR – rybonukleotyd 5-aminoimidazolo-4-karboksyamidu; FAICAR – rybonukleotyd 5-formamidoimidazolo-4-karboksyamidu; IMP – inozynian; SAMP – adenylobursztynian; AMP – adenylan; XMP – ksantylan; GMP – guanylan. Enzymy: (1) aminofosforybozylotransferaza; (2) syntetaza GAR; (3) formylotransferaza GAR; (4) syntetaza FGAM; (5) syntetaza AIR; (6) karboksylaza AIR; (7) syntetaza SAICAR; (8) liaza adenylobursztynianowa; (9) formylotransferaza AICAR; (10) hydrolaza IMP; (11) syntetaza SAMP; (12) dehydrogenaza IMP; (13) syntetaza GMP (na podstawie [69], zmodyfikowane)



RYCINA 2. Szlak biosyntezy *de novo* nukleotydów pirymidynowych. Enzymy: (1) syntetaza karbamoilofosforanowa; (2) karbamoilotransferaza asparaginianowa; (3) dihydroorotaza; (4) dehydrogenaza dihydroorotanowa; (5) fosforybozylotransferaza orotanowa; (6) dekarboksylaza orotydyno-5-fosforanowa; (7) kinaza UMP; (8) kinaza nukleotydodifosforanowa; (9) syntetaza CTP (na podstawie [69], zmodyfikowane)

jako pierwszy powstaje pierścień pirymidynowy. Podobnie jak w syntezie nukleotydów purynowych, donorem grupy rybozofosforanowej dla nukleotydów pirymidynowych jest PRPP, natomiast prekursorami pierścienia pirymidynowego są karbamoilofosforan i asparaginian.

Synteza *de novo* związana jest z tworzenie UMP z karbamoilofosforanu. Szlak ten obejmuje sześć reakcji, które zostały przedstawione na rycinie 2. Enzymy odpowiedzialne za te przemiany wyizolowane z materiału roślinnego zostały wyszczególnione w tabeli 1.

U ssaków i wielu innych organizmów eukariotycznych pierwsze trzy enzymy, tj. syntetaza karbamoilofosforanowa (ang. *Carbamoylpohsphate synthetase*), karbamoilotransferaza asparaginianowa (ang. *Aspartate transcarbamoylase*) i dihydro-orotaza (ang. *Dihydroorotase*) działają jako wielofunkcyjne białka tzw. białka CAD [17]. Jednakże do tej pory nie stwierdzono występowania takiego kompleksu u roślin [43].

U większości organizmów eukariotycznych opisano dwie różne syntetazy karbamoilofosforanowe, które dostarczają substratów dla syntezy pirymidyn i argininy. U roślin stwierdzono obecność jednego z tych enzymów, który prawdopodobnie dostarcza karbamoilofosforanu dla obu szlaków [78].

TABELA 1. Enzymy związane z biosyntezą *de novo* nukleotydów purynowych i pirymidynowych opisane u roślin wyższych.

Enzym	Numer EC	Źródło	Literatura
Synteza *de novo* nukleotydów purynowych			
Amidofosforybozylotransferaza	2.4.2.14	*Glycine max* (brodawki)	[59]
Liaza SAICAR	4.3.2.2	*Triticum aestivum* (zarodki)	[24]
Formylotransferaza AICAR	2.1.2.3	*Pisum sativum* (siewki)	[27]
Syntetaza SAMP	6.3.4.4	*Arabidopsis thaliana* (siewki) *Triticum aestivum* (siewki)	[55] [55]
Dehydrogenaza IMP	1.1.1.205	*Vigna inguiculata* (brodawki) *Camellia sinensis* (liście) *Catharanthus roseus* (komórki)	[13] [50] [50]
Synteza *de novo* nukleotydów pirymidynowych			
Syntetaza karbamoilofosforanowa	6.3.5.5	*Phaseolus aureus* *Pisum sativum* (pędy)	[53] [52]
Karbamoilotransferaza asparaginianowa	2.1.3.2	*Phaseolus aureus* (siewki)	[58]
Dihydroorotaza	1.3.99.11	*Lycopersicon esculentum* (komórki)	[42]
Fosforybozylotransferaza orotanowa	2.4.2.10	*Phaseolus mungo* (siewki)	[85]
Dekarboksylaza orotydynofosforanowa	4.1.1.23	*Lycopersicon esculentum* (kultury komórkowe)	[80]
Kinaza UMP/CMP	2.7.4.14	*Arabidopsis thaliana*	[85]

Czwarty z enzymów – dehydrogenaza dihydroorotanowa nie został dobrze poznany. Badania prowadzone na komórkach pomidora wskazały jedynie na obecność tego enzymu w mitochondriach [42].

Piąty i szósty enzym, tzn. fosforybozylotransferaza orotanowa oraz dekarboksylaza orotydyno-5-fosforanowa występują w komórkach zwierzęcych i roślinnych jako pojedyncze białko, tzw. syntaza UMP [61].

Substratami w syntezie deoksyrybonukleotydów są rybonukleozydodifosforany (NDP), w których grupę 2'-hydroksylową reszty cukrowej zastępuje atom wodoru, a ostatecznym reduktorem jest NADPH. Redukcja rybozy w NDP jest katalizowana przez pojedynczy enzym reduktazę rybonukleotydową, w wyniku czego powstają dNDP (deoksyrybonukleozydodifosforany) [78]. Z wyjątkiem dUDP pozostałe dNDP są fosforylowane, co prowadzi do powstania odpowiednio dCTP, dATP i dGTP, prekursorów w syntezie DNA. U roślin dUDP ulega przemianie do dUTP, a następnie podlega defosforylacji do dUMP [54].

TABELA 2. Enzymy związane ze szlakiem rezerwowym nukleotydów purynowych i pirymidynowych opisane u roślin wyższych

Enzym	Numer EC	Źródło	Literatura
Szlak rezerwowy puryn			
Fosforybozylotransferaza adeniny	2.4.2.7	*Helianthus tuberosus* (pędy) *Catharanthus roseus* (komórki) *Lycopersicon esculentum* (korzenie, liście) *Arabidopsis thaliana* (liście)	[34] [26] [15] [32]
Fosforybozylotransferaza hypoksantyny/guaniny	2.4.2.8	*Helianthus tuberosus* (pędy)	[36]
Kinaza adenozyny	2.7.1.20	*Arabidopsis thaliana*	[45]
Kinaza inozyny/guanozyny	2.7.1.73	*Helianthus tuberosus* (bulwy)	[18]
Fosfotransferaza nukleotydów	2.7.1.77	*Hordeum vulgare* (siewki)	[56]
Szlak rezerwowy pirymidyn			
Fosforybozylotransferaza uracylu	2.4.2.9	*Pisum sativum* (epikotyle)	[14]
Kinaza urydyny/cytydyny	2.7.1.48	*Zea mays* (nasiona)	[20]
Deaminaza deoksycytydyny	3.5.4.14	*Zea mays* (liście)	[33]

Nukleotyd tymidynowy (dTMP) jest syntetyzowany z dUMP przez syntetazę tymidylanową. W reakcji tej N^5, N^{10}-metylenotetrahydrofolian powstający pod wpływem reduktazy dihydrofolianu działa zarówno jako donor grup metylowych, jak i czynnik redukujący. U roślin wykryto bifunkcyjne białko, którego działanie odpowiada syntetazie tymidynowej oraz reduktazie dihydrofolianu [31]. Konwersja dTMP do dTTP następuje w wyniku serii reakcji katalizowanych przez kinazę nukleozydomonofosforanu i kinazę nukleozydodifosforanu.

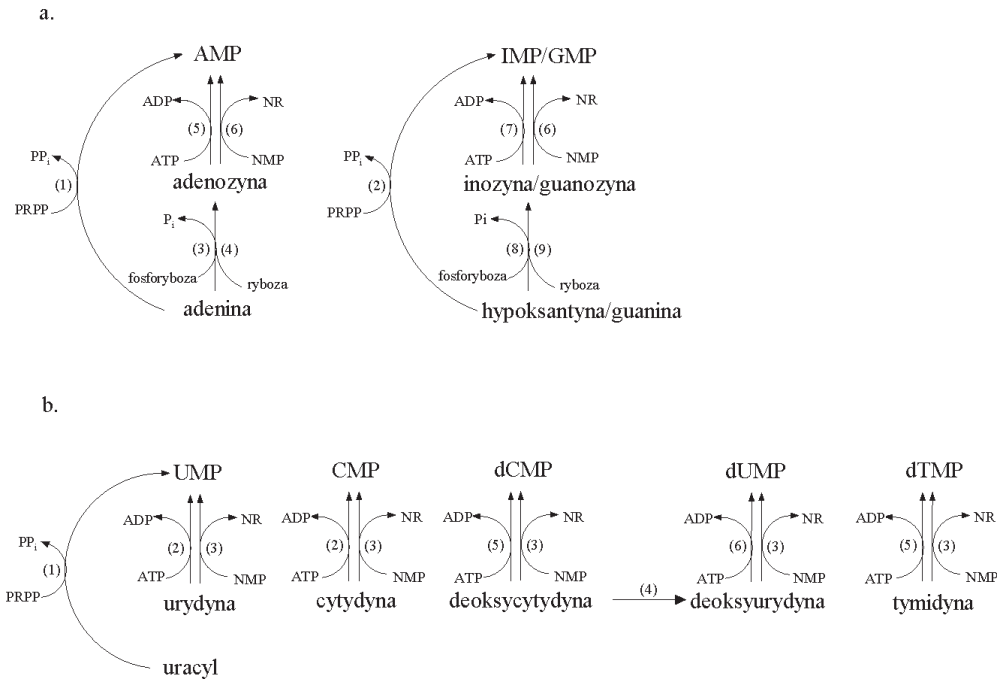
3. SZLAKI REZERWOWE

Wykorzystanie wcześniej wytworzonych zasad oraz nukleozydów do syntezy nukleotydów odbywa się w wyniku reakcji rezerwowej, która jest prostsza i znacznie mniej kosztowna niż reakcje syntezy *de novo*.

Zasady oraz nukleozydy purynowe pojawiają się w wyniku wewnątrzkomórkowego rozkładu niestabilnego RNA i nukleotydów oraz w pewnych przypadkach z egzogennych źródeł jako produkt katabolizmu kwasów nukleinowych i nukleotydów niszczonych komórek. Trzy zasady purynowe: adenina, guanina i hypoksantyna są odpowiednio

źródłem dla powstania AMP, GMP i IMP, a w regulacji tych szlaków biorą udział fosforybozylotransferaza adeninowa i fosforybozylotransferaza hypoksantynowo/guaninowa (ryc. 3a). Katalizują one łączenie PRPP z odpowiednią zasadą purynową. Pośrednio fosforylaza adenozyny i fosforylaza inozyny/guanozyny przemieniają adeninę, hypoksantynę i guaninę do odpowiadających im rybonukleozydów z wykorzystaniem rybozo-1-fosforanu. Jednakże, aktywność tych enzymów u roślin wyższych jest bardzo niska [5, 43, 78]. Wydaje się więc, że powstawanie rybonukleotydów w wyniku takich przemian nie odgrywa większej roli.

Nukleotydy purynowe są jednocześnie odzyskiwane dzięki bezpośredniej fosforylacji rybonukleozydów purynowych przez kinazy nukleotydów. Kinaza adenozynowa występuje powszechnie, a jej aktywność jest przeważnie bardzo wysoka, podczas gdy kinazę inozyny/guanozyny stwierdzono tylko u niewielu roślin (tab. 2). U pewnych roślin, inozyna i guanozyna są wykorzystywane głównie do syntezy IMP/GMP w wyniku działania niespecyficznej fosfotransferazy nukleotydów [5, 78].



RYCINA 3. Szlaki rezerwowe nukleotydów purynowych (a) i pirymidynowych (b). Enzymy: (a) – (1) fosforybozylotransferaza adeniny; (2) fosforybozylotransferaza hypoksantyny/guaniny; (3) fosforylaza adenozyny; (4) nukleotydaza adenozyny; (5) kinaza adenozyny; (6) niespecyficzna fosfotransferaza nukleotydów; (7) kinaza inozyny/guanozyny; (8) fosforylaza inozyny/guanozyny; (9) nukleotydaza inozyny/guanozyny; (b) – (1) fosforybozylotransferaza uracylu; (2) kinaza urydyny/cytydyny; (3) niespecyficzna fosfotransferaza nukleotydów; (4) deaminaza deoksycytydyny; (5) kinaza deoksycytydyny; (6) kinaza tymidyny; (na podstawie [69], zmodyfikowane)

Także zasady pirymidynowe i nukleozydy powstające jako produkty degradacji nukleotydów i kwasów nukleinowych są ponownie wykorzystywane do tworzenia nukleotydów pirymidynowych [78]. W tabeli 2 zostały przedstawione enzymy biorące udział w odzyskiwaniu pirymidyn opisane do tej pory u roślin.

Nukleozydy pirymidynowe: urydyna, cytydyna, deoksycytydyna i tymidyna są odzyskiwane z odpowiadających im nukleotydów UMP, CMP, dCMP i dTMP (ryc. 3b). Kinaza urydyny/cytydyny, która jest obecna u wszystkich przebadanych roślin, fosforyluje urydynę i cytydynę. U roślin nie wykryto dotychczas szlaku rezerwowego cytozyny.

4. KATABOLIZM NUKLEOTYDÓW

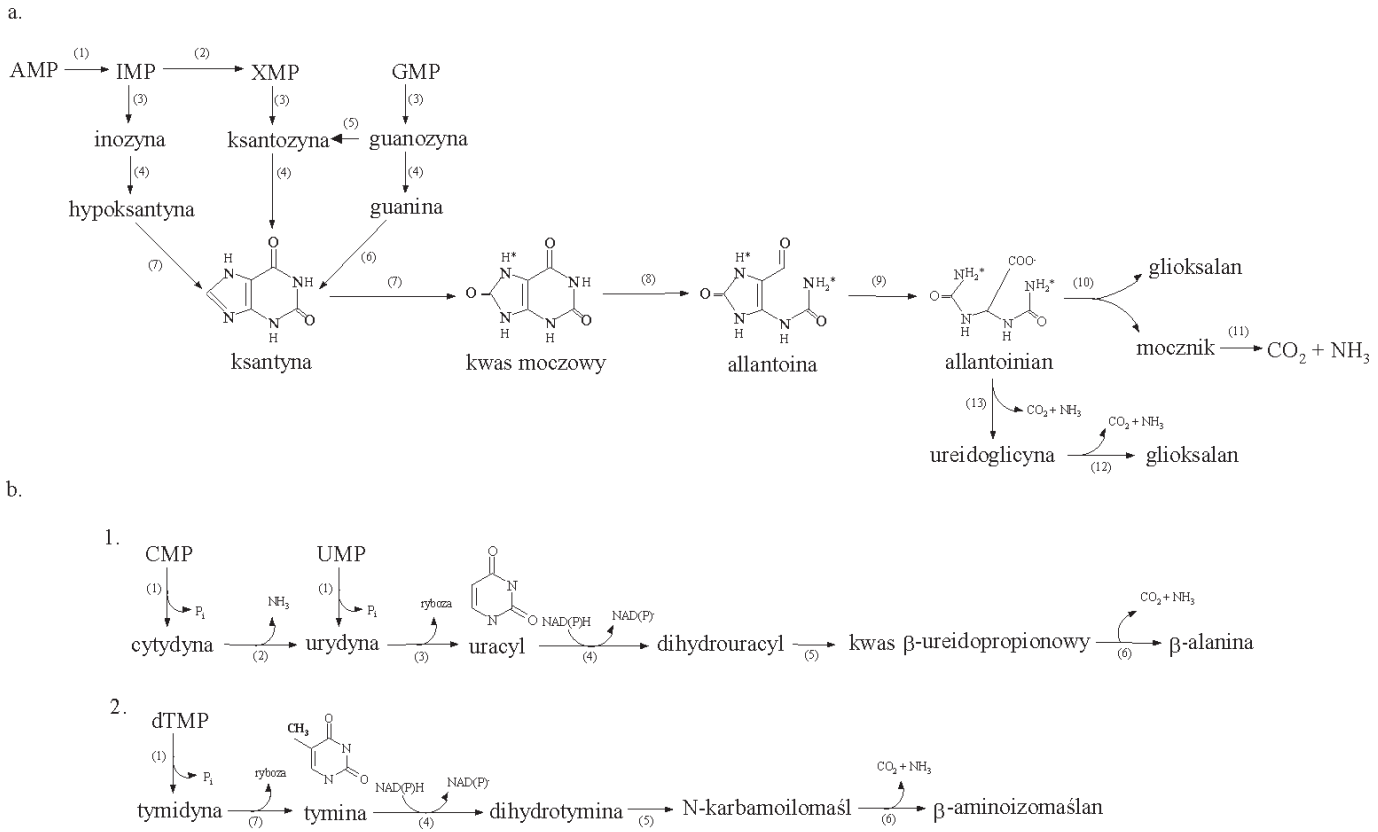
Jak już wspomniano, nukleotydy ulegają w komórkach stałym przemianom. Nukleotydazy rozkładają nukleotydy do nukleozydów. Fosforylazy nukleozydowe katalizują rozszczepienie nukleozydów na wolne zasady i rybozo-1-fosforan. Niektóre z zasad zostają ponownie wykorzystane do tworzenia nukleotydów przez rezerwowe szlaki metaboliczne.

Rośliny, podobnie jak zwierzęta, są zaopatrzone w kompleksy oksydacyjne biorące udział w procesach katabolicznych puryn, powodując ich degradację do kwasu moczowego i alantoiny oraz CO_2 i NH_3 (ryc. 4a, tab. 3) [5]. Kluczowym związkiem w tych procesach jest ksantyna, tak więc wszystkie nukleotydy purynowe przed rozpoczęciem procesów rozszczepienia pierścienia muszą ulec przemianie do tego związku.

Procesy deaminacji, defosforylacji i rozpadu wiązań glikozydowych są podstawowymi reakcjami prowadzącymi do rozkładu nukleotydów. Proces deaminacji jest prowadzony przez deaminazę adenylanową i guanylanową. W przeciwieństwie do zwierząt, u których enzymy te występują w dużych ilościach, w komórkach roślinnych stężenie ich jest niskie [5].

Istnieje wiele enzymów biorących udział w reakcjach defosforylacji, np. fosfatazy, 3'-nukleotydazy i 5'-nukleotydazy. W procesach katabolicznych puryn powstanie hypoksantyny zachodzi przez hydrolityczne usunięcie 5'-fosforanu z IMP i następnie rozszczepienie wiązania glikozydowego. Oksydaza ksantynowa (dehydrogenaza ksantyny) utlenia hypoksantynę do ksantyny, a następnie do kwasu moczowego. Oksydaza moczanowa (urykaza) katalizuje tworzenie alantoniny, która w wyniku działania alantoinazy przekształca się do alantoinianu. Okazało się, że niektóre organy roślinne, np. korzenie tropikalnych roślin strączkowych akumulują alantoinę i/lub alantoinian, ponieważ związki te odgrywają ważną rolę w magazynowaniu i transporcie azotu [63]. W znanych układach zwierzęcych związek ten podlega degradacji do kwasu glioksalowego i mocznika, a ten następnie do CO_2 i NH_3. Dla roślin zaproponowano jednak alternatywny szlak, w którym alantoinian jest początkowo przekształcany do ureidoglicyny, CO_2 i NH_3. NH_3 jest bezpośrednio uwalniany, a zamiast mocznika powstaje glioksalan (ryc. 4a).

U roślin poznano katabolizm urydylanu i deoksytymidylanu, nie opisano jednak szlaku degradacji cytydylanu [81]. Tak więc jest wielce prawdopodobne, że katabolizm CMP musi odbywać się po jego przekształceniu do urydyny (ryc. 4b).



RYCINA 4. Schematy ilustrujące przebieg kolejnych etapów katabolizmu nukleotydów purynowych (a) i pirymidynowych (b). Enzymy: (a) – (1) deaminaza AMP; (2) dehydrogenaza IMP; (3) 5'-nukleotydaza; (4) nukleotydaza inozyny/guanozyny; (5) deaminaza guanozyny; (6) deaminaza guaniny; (7) dehydrogenaza ksantyny (oksydaza ksantynowa); (8) urikaza; (9) alantoinaza; (10) alantoikaza; (11) ureaza; (12) deaminaza alantoinianu; (13) liaza ureidoglicyny; (b) – (1) 5'-nukleotydaza (fosfataza); (2) deaminaza cytydyny; (3) nukleotydaza urydyny; (4) dehydrogenaza dihydrouracylu; (5) dihydropropionaza; (6) β-urydynopropionaza; (7) fosforylaza tymidyny (nukleotydaza tymidyny) (na podstawie [69], zmodyfikowane

TABELA 3. Enzymy związane z procesami katabolicznymi nukleotydów purynowych i pirymidynowych opisane u roślin wyższych

Enzym	Numer EC	Źródło	Literatura
Szlaki kataboliczne puryn			
Deaminaza AMP	3.5.4.6	*Catharanthus roseus* (komórki) *Pisum sativum* (siewki)	[84] [19]
5'-nukleotydaza	3.1.3.5	*Zea mays* (pędy siewek) *Lycopersicon esculentum* (korzenie, liście)	[16] [15]
Nukleotydaza inozyny/guanozyny	3.2.2.2	*Helianthus tuberosus* (pędy) *Lupinus luteus* (nasiona)	[35] [23]
Nukleotydaza adeonzyny	3.2.2.7	*Lupinus luteus* (nasiona)	[1]
Deaminaza guanozyny	3.5.4.15	*Camellia sinensis* (liście)	[46]
Deaminaza guaniny	3.5.4.3	*Camellia sinensis* (liście)	[46]
Dehydrogenaza ksantyny	1.1.1.204	*Glycine ma*x (brodawki)	[76]
Urykaza	1.7.3.3	*Phaseolus vulgaris* (brodawki)	[60]
Szlaki kataboliczne pirymidyn			
Nukleotydaza cytydyny	3.2.2.3	*Phaseolus radiatu*s (siewki)	[2]
Deaminaza cytydyny	3.5.4.5	*Arabidopsis thaliana* (siewki)	[77]
β-ureidopropionaza	3.5.1.6	*Zea mays* (siewki)	[79]

UMP i dTMP ulegają przemianom w wyniku zachodzenia trzech takich samych, kolejno następujących po sobie reakcji. Produktami końcowymi tego procesu są β-alanina lub β-aminoizomaślan. W obu przypadkach produktami ubocznymi są CO_2 i NH_3. Jednak do tej pory u roślin wyższych opisano jedynie trzy enzymy związane z tymi przemianami (tab. 3).

5. SELEKCJA GENÓW ZWIĄZANYCH Z METABOLIZMEM NUKLEOTYDÓW

Niewiele wiadomo o molekularnych mechanizmach biosyntezy nukleotydów purynowych i pirymidynowych. W ostatnich latach wykorzystując techniki molekularne i genetyczne wyselekcjonowano geny kodujące enzymy związane z biosyntezą nukleotydów [30, 43, 44, 83].

PRPP jest podstawowym prekursorem syntezy *de novo*, jak również syntezy rezerwowej nukleotydów purynowych, jak i pirymidynowych. Obecność genu kodującego syntetazę PRPP stwierdzono we wszystkie przebadanych roślinach. Krath i Hove-Jensen [30] wyizolowali 4 odcinki cDNA kodujące tę syntetazę z tkanek szpinaku, jak również stwierdzili, że dwa spośród czterech odcinków reprezentują nową klasę syntetaz PRPP.

U zwierząt aminofosforybozylotransferaza (ATPaza) jest ważnym enzymem biorącym udział w początkowych etapach biosyntezy *de novo* nukleotydów purynowych. Dwie sekwencje ATPazy, oznaczone jako *AtATaza1* i *2* uzyskano z genomu rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*). Ekspresja *AtATazy1* zachodzi przede wszystkim w młodych pąkach kwiatowych, podczas gdy zawartość *AtATazy2* jest największa w kwiatach i korzeniach [30].

Istnieją także dane dotyczące innych genów kodujących enzymy związane z syntezą nukleotydów purynowych. Senecoff i Meagher [65] opisali gen kodujący syntetazę rybonukleotydu 5-aminoimidazolu (AIR). Gen ten charakteryzuje się wysoką homologią do wielu innych znanych genów syntetazy AIR z bakterii. Ci sami autorzy [64] opisali kilka genów z rzodkiewnika kodujących syntetazę rybonukleotydu 5-aminoimidazolo-4-N-bursztynylo-karboksyamidu (SAICAR). Jeden z tych genów, oznaczony jako *PUR7*, ulega ekspresji w liściach i łodygach.

W genomie rzodkiewnika istnieje 5 sekwencji kodujących enzymy podobne do fosforybozylotransferazy adeniny, oznaczone jako *APT1-5* [43]. U roślin transgenicznych, zawierających konstrukt GUS pod promotorem *apt1*, zaobserwowano szczególnie wysoką aktywność *APT1* podczas przyrostu wtórnego pędu i korzenia [43]. Podobne wyniki uzyskano u topoli [74].

Spośród enzymów biorących udział w syntezie *de novo* pirymidyn scharakteryzowano gen kodujący syntetazę karbamoilofosforanową, która u rzodkiewnika składa się z dwu podjednostek kodowanych przez odrębne geny [82]. Analiza aminokwasowa tych podjednostek wykazała obecność tzw. sekwencji skierowującej do chloroplastów, co jest zgodne z dowodami biochemicznymi o występowaniu tego enzymu w chloroplastach [48].

U grochu znaleziono odcinki kodujące dwie różne izoformy karbamoilotransferazy asparaginianowej [83]. Odcinki te także kodują peptyd posiadający sekwencje kierujące do chloroplastów. Konwersja orotanu do UMP jest prowadzona przez pojedynczy polipeptyd nazwany syntazą UMP, która ma aktywność fosforybozylotransferazy orotanowej i dekarboksylazy orotydyno-5-fosforanowej. Kilka sekwencji cDNA kodujących ten enzym zostało wyizolowanych z tytoniu (*Nicotiana tabacum*) i ryżu (*Oryza sativa*) [43].

W przeciwieństwie do procesu syntezy jak do tej pory nie ma bliższych informacji dotyczących degradacji puryn i pirymidyn.

6. METABOLIZM NUKLEOTYDÓW A PROCESY FIZJOLOGICZNE

6.1. Dojrzewanie zarodków

Badania dotyczące metabolizmu nukleotydów podczas embriogenezy prowadzone były głównie na zarodkach somatycznych, ponieważ ich zygotyczne odpowiedniki osadzone

w tkance macierzystej są trudne do wyizolowania. W badaniach jako rośliny modelowe wykorzystywano świerk biały (*Picea glauca*) oraz marchew siewną (*Daucus carota*).

Zaobserwowano, że enzymy zarówno szlaku rezerwowego, jak i te związane z procesami degradacji są aktywne podczas rozwoju zarodków somatycznych świerka [10,11]. Wydaje się jednocześnie, że zmiany aktywności enzymów szlaku rezerwowego mogą być metabolicznym włącznikiem niezbędnym do zakończenia podziału komórek i zapoczątkowania rozwoju zarodka.

Podczas intensywnych podziałów komórkowych zaobserwowano wysoką aktywność fosforybozylotransferazy adeniny (APRT) i kinazy adenylanowej (AK), co świadczyć może o wykorzystywaniu adeniny i adenozyny do syntezy nukleotydów i kwasów nukleinowych. W przeciwieństwie do fazy początkowej, w fazie popodziałowej następuje spadek ilości odzyskiwanych nukleozydów [11]. Wydaje się również, że zmiany w metabolizmie puryn są istotne podczas procesu odwadniania, któremu podlega większość nasion. Zaobserwowano, że wzrasta wtedy aktywność APRT, spada natomiast ilość adeniny i adenozyny włączanych do szlaku [71].

Badania prowadzone na dojrzewających somatycznych zarodkach świerka, a dotyczące metabolizmu pirymidyn wykazały, że synteza *de novo* zachodzi bardzo intensywnie w procesach embriogenezy, kiedy to ponad 80% dostarczonego kwasu orotanowego jest wykorzystywane do syntezy nukleotydów i kwasów nukleinowych na różnych etapach rozwoju zarodka [7].

W zarodkach zygotycznych świerka izolowanych z suchych nasion zaobserwowano spadek ilości uracylu spowodowany głównie niską aktywnością fosforybozylotransferazy uracylu (UPRT) oraz bardzo wysoką aktywnością β-ureidopropionazy [7]. Ponieważ aktywności tych enzymów nie towarzyszy ubytek odpowiednich prekursorów, istnieje sugestia, że inne dokładnie kontrolowane mechanizmy, np. zmiany w poziomie substratów i/lub efektorów, mogą brać udział w kontroli mechanizmu przemian pirymidyn podczas rozwoju zarodka.

Szlak syntezy pirymidyn *de novo*, określony na podstawie wykorzystywania orotanu do syntezy nukleotydów i kwasów nukleinowych, jest aktywny zarówno w zarodkach somatycznych [71], jak i zygotycznych [70] świerka, jednak nie funkcjonuje w nasionach fasoli mungo (*Phaseolus mungo*) [6]. Początkowo zakładano, że u fasoli sytuacja ta jest związana z niską zawartością PRPP, jednakże późniejsze badania wykazały, że ilość PRPP nie jest czynnikiem ograniczającym, ponieważ aktywność syntetazy PRPP podwaja się podczas wzrostu gęstości protoplazmy i spadku ilości wody w somatycznych zarodkach świerka [71].

6.2. Kiełkowanie nasion

Do tej pory ukazało się niewiele prac dotyczących metabolizmu puryn i pirymidyn oraz syntezy kwasów nukleinowych podczas kiełkowania nasion. Dane wskazują, że dostępność nukleotydów podczas początkowych faz pęcznienia odgrywa istotną rolę w procesie kiełkowania.

Procesy metaboliczne dotyczące puryn w powyższym procesie można podzielić na 3 oddzielne fazy: fazę niemetaboliczna, fazę rezerwowa, fazę tworzenia ureidów [4].

W początkowych etapach kiełkowania pobieranie prekursorów puryn, jak również ich włączanie do różnych frakcji komórkowych są na niskim poziomie [72]. W liścieniach fasoli mungo ponad 5% adeniny i adenozyny oraz 30% guanozyny i hypoksantyny dostarczanej do tkanek nie ulega przemianom [4]. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku kiełkujących zarodków świerka [72]. Takie zjawisko może wynikać z niepełnej hydratacji tkanki w pierwszych godzinach pęcznienia.

W miarę zaawansowania procesu kiełkowania uruchomione zostają szlaki rezerwowe. W przypadku odzyskiwania adenozyny opisano jednoetapową reakcję kierowaną przez kinazę adenozyny (AK) oraz reakcję dwuetapową katalizowaną przez nukleotydazę adenozyny (ARN) i aminofosforybozylotransferazę (APRT). Oba szlaki są uruchamiane podczas kiełkowania, lecz ich aktywacja zachodzi w różnych etapach. Istnieją sugestie, że w początkowych fazach kiełkowania odzyskiwanie adenozyny jest prowadzone głównie przez AK. Aktywność tego enzymu oznaczono w ekstraktach z liścieni łubinu (*Lupinus albus*) i fasoli [21, 51], jak również w kiełkujących zarodkach somatycznych świerka [72]. W przypadku kiełkujących zarodków pszenicy aktywność AK pozostaje na stałym poziomie [57]. Reakcja kierowana przez ARN i APRT jest uruchamiana dopiero w końcowych etapach kiełkowania, gdyż nie wykryto aktywności tych enzymów ani w suchych, ani pęczniejących nasionach łubinu [21]. U świerka aktywność ARN i APRT była wykrywalna dopiero w czwartym dniu pęcznienia [72], podczas gdy w liścieniach kiełkujących nasion łubinu aktywność ARN pojawiła się drugiego dnia, osiągając najwyższy poziom około czwartego dnia [22].

Podczas kiełkowania zaobserwowano także intensywne odzyskiwanie guaniny i guanozyny, które zachodzi dzięki aktywności fosforybozylotransferazy guaninowej (GPRT) występującej zarówno w liścieniach, jak i stożkach wzrostu fasoli [4].

Trzeci etap w metabolizmie puryn, następujący po fazie odzyskiwania związany jest z tworzeniem ureidów, które stanowią ważne źródło azotu we wczesnych etapach kiełkowania, szczególnie u roślin strączkowych. W siewkach fasoli 60% radioaktywnej hypoksantyny jest włączane do frakcji ureidów po kilku dniach [8]. Silna degradacja tego związku jest prawdopodobnie spowodowana niską aktywnością fosforybozylotransferazy hypoksantyny (HPRT) w porównaniu z innymi enzymami szlaku rezerwowego [51], co stwierdzono podczas kiełkowania ziarniaków pszenicy (*Triticum vulgare*) [57] i nasion łubinu [21].

Ustalono także, że zmiany w metabolizmie pirymidyn są ściśle związane z etapem kiełkowania zarodka. Wyróżniono dwa odrębne etapy w metabolizmie pirymidyn: syntezę na szlaku rezerwowym zachodzącą w początkowych etapach kiełkowania oraz syntezę *de novo* w późniejszych etapach kiełkowania. W liścieniach fasoli mungo wykorzystanie uracylu i urydyny do syntezy RNA i nukleotydów zwiększa się znacząco podczas pierwszych 24 godzin kiełkowania, a obniża w późniejszych etapach [6]. Podobna sytuacja ma miejsce w kiełkujących somatycznych i zygotycznych zarodkach świerka [73]. W procesach tych odzyskiwanie urydyny jest katalizowane głównie przez kinazę urydyny (UK) jak również, w mniejszym stopniu, przez niespecyficzną fosfotransferazę, której aktywność stwierdzono także w ziarniakach kukurydzy (*Zea mays*) i pszenicy [73].

W miarę postępującego procesu kiełkowania udział szlaku rezerwowego w tworzeniu ogólnej puli nukleotydów obniża się. Mechanizm tego zjawiska nie został w pełni wyjaśniony, chociaż wiadomo, że jako końcowy etap zachodzi konwersja UMP do UDP. Zmiana tempa konwersji zasad pirymidynowych i nukleozydów do nukleotydów może wynikać ze zmiany aktywność enzymów związanych ze szlakiem rezerwowym. W kiełkujących somatycznych i zygotycznych zarodkach świerka obniżenie ilości urydyny wynika z postępującego zmniejszania się aktywności UK [70].

Spadkowi aktywności enzymów na szlaku rezerwowym w miarę zaawansowania procesu kiełkowania towarzyszy wzrost aktywności enzymów na szlaku syntezy *de novo*. Wykorzystanie orotanu do syntezy nukleotydów i kwasów nukleinowych stwierdzono w nasionach grochu (*Pisum sativum*) i kiełkujących nasionach fasoli, w kiełkujących zarodkach somatycznych świerka, jak również w kiełkujących łagiewkach pyłkowych u sosny (*Pinus silvestris*) [69]. Pojawienie się szlaku syntezy *de novo* wydaje się mieć na celu zabezpieczenie ilości nukleotydów wystarczającej do syntezy kwasów nukleinowych.

Uruchomienie mechanizmu syntezy *de novo* jest spowodowane zwiększeniem aktywności wielu enzymów włączanych w ten szlak. Zaobserwowano, iż aktywność fosforybozylotransferazy orotanowej (OPRT) niska na początku kiełkowania, wzrasta w miarę pęcznienia nasion [73]. Poza OPRT opisano także wzrost aktywności innych enzymów biorących udział w tworzeniu pierścieni pirymidynowych, takich jak: syntetaza karbamoilofosforanowa i karbamoilotransferaza asparaginianowa [39].

6.3. Rozwój pędu i organów magazynujących

Badania dotyczące metabolizmu nukleotydów oraz aktywności enzymów w organach magazynujących były prowadzone na bulwach słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus*) oraz ziemniaka (*Solanum tuberosum*). Wyizolowano i scharakteryzowano kluczowe enzymy metabolizmu nukleotydów purynowych: deaminazę AMP [38] i kinazę guanylanową [37]. W aktywnie rosnących bulwach ziemniaka synteza nukleotydów purynowych i pirymidynowych jest utrzymywana na wysokim poziomie. Podobna sytuacja ma miejsce w szlaku rezerwowym. Wydaje się, że tak wysoka aktywność enzymów szlaku rezerwowego w tworzących się bulwach jest spowodowana gwałtownymi przemianami nukleotydów i przyczynia się do dostarczania energii, jak również elementów budulcowych niezbędnych do podziałów komórkowych, czy syntezy skrobi. Chociaż nie istnieją na to bezpośrednie dowody jednak prawdopodobne jest, że niektóre nukleotydy wytwarzane w liściach mogą być transportowane do rosnących bulw. Jeżeli faktycznie taki proces ma miejsce, to występowanie i aktywność szlaku rezerwowego jest wydajnym mechanizmem tworzenia potrzebnych nukleotydów bez zbędnych nakładów energetycznych.

Po rozpoczęciu kiełkowania materiały zapasowe bulw zostają wykorzystane do wzrostu pędu i korzenia. Dotychczas nie opisano szczegółowych zmian w poziomie nukleozydów podczas kiełkowania bulw u ziemniaka, stwierdzono jedynie, że [2-^{14}C] urydyna, [2-^{14}C] cytydyna i [2-^{14}C] uracyl wstrzyknięte do bulw są transportowane do pędu i w ciągu trzech dni wykorzystywane do tworzenia kwasów nukleinowych.

6.4. Hodowle komórkowe

Kultury komórkowe zawiesinowe stanowią wartościowy materiał do badania wzrostu i różnicowania się komórek roślinnych. Są one także z powodzeniem wykorzystywane do badania zmian w poziomie nukleotydów podczas wzrostu kultury komórkowej [67, 78]. Namnażanie komórek w zawiesinie zachodzi szybko w porównaniu ze wzrostem kalusa i można w nim wyróżnić kilka faz:

(a) faza początkowa (faza lag), która trwa od przeniesienia komórek do świeżej pożywki do rozpoczęcia podziałów komórkowych,
(b) faza wzrostu wykładniczego (eksponencjalna), w której wzrost liczby komórek jest bardzo szybki,
(c) faza wzrostu liniowego, w której tempo wzrostu jest stałe, a przyrost liczby komórek liniowy,
(d) faza stacjonarna (głodowa), w której komórki przestają się dzielić i rozpoczyna się okres starzenia kultury.

W każdej z tych faz zachodzą ściśle sprecyzowane procesy metaboliczne i morfologiczne [78].

Badania biochemiczne prowadzone na kulturach komórkowych różnych gatunków roślin wykazały, że zmiany stężenia nukleotydów w poszczególnych fazach mogą być sygnałem do przejścia komórek do kolejnej fazy [78]. Następujący po przeniesieniu „głodujących" komórek do świeżej pożywki, wyraźny wzrost poziomu nukleotydów był zaobserwowany u wielu badanych roślin, m.in. u barwinka różowego (*Catharanthus roseus*) [66] czy bielunia surmikwiatu (*Datura innoxia*) [40]. Wzrost ilości nukleotydów w fazie początkowej wydaje się być warunkiem rozpoczęcia fazy wykładniczej, kiedy zachodzi bardzo intensywny wzrost ilości DNA i RNA, a zapotrzebowanie na nukleotydy jest znacznie większe.

Ustalono, że ładunek energetyczny ([ATP]+1/2[ADP])/([ATP]+[ADP]+[AMP]), podobnie jak aktywność oddechowa zwykle zwiększają się w pierwszych godzinach fazy początkowej; później następuje spadek aż do ustalenia się równowagi podczas fazy wzrostu liniowego i fazy stacjonarnej [40, 67]. Podczas samych podziałów komórkowych, poziom nukleotydów obniża się, podobnie jak ładunek energetyczny, co może być spowodowane wykorzystaniem ATP. W kulturach komórkowych tytoniu i soi (*Glycine max*) nie zaobserwowano jednak znaczącego spadku ilości ATP. W końcowej fazie wzrostu liniowego i fazie stacjonarnej zawartość nukleotydów osiąga niski, lecz stały poziom. Wydaje się więc, że w tych etapach nie zachodzi synteza, a jedynie degradacja nukleotydów do nukleozydów.

Podczas wzrostu kultury komórkowej pojawiają się różnice jakościowe w ogólnej puli nukleotydów. Porównanie nukleotydów w komórkach uzyskanych z różnych gatunków, np. bielunia [40] czy tytoniu [41], pozwala zaobserwować pewną prawidłowość. Najmniej liczną frakcję stanowi pula cytozyny (mniej niż 3%), a największą uracylu (więcej niż 50%) z kompleksem UDP-glukoza jako główną frakcją [78]. Wysoka ilość UDP-glukozy, a także dodatkowe zwiększanie się jego ilości w fazie wykładniczej, może mieć istotne znaczenie podczas tworzenia ściany komórkowej. Kolejne badania wykazały stały stosunek ilości uracylu względem adeniny. Taka zależność wskazuje na

istnienie mechanizmu regulacyjnego, który kontroluje endogenny poziom nukleotydów purynowych i pirymidynowych.

Jak wspomniano, najwyższe nasilenie syntezy nukleotydów występuje w fazie początkowej. Pomiar poziomu nukleotydów w komórkach bielunia, co 6 godzin po inokulacji do nowej pożywki, pozwolił stwierdzić, że synteza nukleotydów zachodzi w dwóch etapach. Pierwszy z nich związany jest z odzyskiwaniem nukleotydów podczas fazy początkowej, natomiast w fazie wykładniczej zachodzi właściwa synteza polegająca na aktywacji enzymów szlaków biosyntezy *de novo* [40].

Opóźnienie w pojawieniu się syntezy *de novo* może być związane z początkowym brakiem aktywności enzymów biorących udział w syntezie puryn i pirymidyn. Aktywność syntetazy PRPP, syntetazy karbamoilofosforanowej i fosforybozylotransferazy orotanowej (OPRT) jest największa podczas fazy podziałów komórkowych barwinka [28]. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku aktywności enzymów syntezy puryn, np. syntetazy rybonukleotydu glicynoamidu w komórkach marchwi [9].

7. METABOLIZM NUKLEOTYDÓW A CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE

U wielu gatunków roślin, np. kukurydzy, papryki (*Capsicum annuum*), krokosza (*Carthamus tinctorius*) czy mangrowców, np. *Sonneratia alba* [3, 49], następują zmiany w syntezie i wykorzystaniu nukleotydów, szczególnie ATP, w odpowiedzi na wysokie stężenie soli w środowisku. Wydaje się, że warunki stresowe powodują obniżenie ogólnej puli nukleotydów oraz wzrost ładunku energetycznego. U *Sonneratia* ładunek ten wynosił 0,82 przy stężeniu NaCl 100 mmol/L, podczas gdy u roślin kontrolnych 0,72 [3]. Wyniki te wskazują na obecność aktywnej kinazy adeninowej, która jest odpowiedzialna za zwiększanie wewnątrzkomórkowego stężenia ATP. Wysoki poziom ATP może być potrzebny do usuwania NaCl z cytozolu na zewnątrz komórki i/lub do wakuoli.

Jednocześnie wykazano, że w kulturach komórkowych *Sonneratia* traktowanych NaCl niski poziom degradacji puryn pozwala na akumulację zasad i nukleozydów oraz wykorzystanie ich do syntezy nukleotydów. Taka strategia może być wydajnym mechanizmem adaptacji do stresu solnego [3].

Utrzymanie równowagi jonowej i osmotycznej w całej komórce wymaga sprawnej wymiany substancji między wakuolą a cytoplazmą. Uczestniczą w niej osmoprotektanty. Są to różne łatwo rozpuszczalne związki, tj. cukry i ich pochodne czy substancje zawierające azot (prolina oraz betaina). W przeciwieństwie do roślin mangrowych, u których poziom sorbitolu czy mannitolu jest wysoki, *Avicennia maina* gromadząca betainę glicyny wykazuje inny sposób metabolizmu adenozyny. Szlak biosyntezy betainy glicyny z fosfoetanoloaminy obejmuje trzy etapy metylacji, a SAM (S-adenozylo-L-metionina) jest wykorzystywana jako donor grup metylowych. W procesie tym SAM ulega przemianom do SAH (S-adenozylo-L-homocysteiny), która następnie jest hydrolizowana do L-homocysteiny i adenozyny. Hydrolaza SAH katalizuje zarówno

syntezę, jak i hydrolizę SAH. Ponieważ SAH jest potencjalnym inhibitorem reakcji, usunięcie go jest istotnym etapem w biosyntezie betainy glicyny. Prawdopodobnie z tego powodu, bardzo aktywna nukleotydaza adenozyny jest obecna w komórkach *Avicennia marina*, a 16–50% egzogennie dostarczonej [8-^{14}C] adenozyny jest odzyskiwane jako adenina. Odzyskiwanie adenozyny jest bardzo efektywne u drzew mangrowych, co może być wydajnym sposobem pozyskiwania ATP. Ponadto wysoka aktywność nukleotydaz adenozyny może być związana u roślin mangrowych, produkujących betainę glicyny, z ciągłym dostarczaniem grup metylowych niezbędnych do biosyntezy osmotyków cytoplazmatycznych [12].

Istnieją także dane wskazujące, że aktywacja kinazy adenozyny i nukleotydazy adenozyny następuje w odpowiedzi na stres solny [75]. Zaobserwowano, że u szpinaku (*Spinacia oleracea*) i buraka cukrowego (*Beta vulgaris*), poddanych stresowi solnemu, akumulacja transkryptu, podobnie jak aktywność kinazy adenozyny, znacznie wzrastają. Ten wzrost był połączony z syntezą betainy glicyny w odpowiedzi na wysokie stężenie soli. Wydaje się zatem, że usunięcie adenozyny jest niezbędne do podtrzymania zależnej od SAM aktywności metylotransferazy, a kinaza adenozyny i/lub nukleotydaza adenozyny odgrywają w tym istotną rolę [43, 75].

Poprzez analogię do reakcji wywoływanych przez stres solny jest wielce prawdopodobne, że w warunkach deficytu wodnego także następują zmiany w zawartości nukleotydów i aktywności enzymów.

Różnice w regulacji biosyntezy pirymidyn wywołane stresem wodnym stwierdzono jedynie w siewkach manneczki łękowatej (*Eleusine coracana*). Zahamowanie aktywności enzymu karbamoilotransferazy asparaginianowej przez UMP u roślin kontrolnych ustępowało w siewkach poddanych stresowi wodnemu [29]. Jednakże fizjologiczne znaczenie tej zmiany nie jest znane.

PODSUMOWANIE

Nie ulega wątpliwości, że nukleotydy odgrywają doniosłą rolę w metabolizmie wszystkich komórek. Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w badaniach nad metabolizmem nukleotydów w komórkach roślinnych. Wydaje się, że układy generujące przemiany nukleotydów u roślin są podobne do tych, jakie scharakteryzowano w układach zwierzęcych i u mikroorganizmów. Pojawiające się różnice są związane jedynie z syntezą nukleotydów na szlakach rezerwowych.

Pomimo nasilenia tych badań, wciąż wiele elementów szlaków metabolicznych pozostaje nieznanych – szczególnie dotyczy to enzymów biorących udział w głównych przemianach. Posiadana przez nas wiedza pozwala jednak zauważyć, iż prawidłowe funkcjonowanie komórki roślinnej wymaga ciągłej przemiany nukleotydów, a układy generujące przemiany nukleotydów są aktywowane na poszczególnych etapach wzrostu i rozwoju.

LITERATURA

[1] ABUSAMHADNEH E, McDONALD NE, KLINE PC. Isolation and characterization of adenosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Plant Sci* 2000; **153**: 25–32.

[2] ACHAR BS, VAIDYANATHAN CS. Purification and properties of uridinehydrolase from mung-bean (*Phaseolus radiatus*) seedlings. *Arch Biochem Biophys* 1967; **119:** 356–362.

[3] AKATSU M, HOSOI Y, SASAMOTO H, ASHIHARA H. Purine metabolism in cells of a mangrove plant, *Sonneratia alba*, in tissue culture. *J Plant Physiol* 1996; **149:** 133–137.

[4] ASHIHARA H. Changes in activities of purine salvage and ureide synthesis during germination of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. *Z Pflanzenphysiol* 1983; **113:** 47–60.

[5] ASHIHARA H, CROZIER A. Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants. *Adv Bot Res* 1999; **30:** 118–205.

[6] ASHIHARA H, KAMEYAMA Y. Biosynthesis of pyrimidines during germination of black gram seeds: Changes in the level of participant enzymes. *Curr Sci* 1989; **58:** 889–891.

[7] ASHIHARA H, LOUKANINA N, STASOLLA C, THORPE TA. Pyrimidine metabolism during somatic embryo development in white spruce (*Picea glauca*). *J Plant Physiol* 2001b; **158:** 613–621.

[8] ASHIHARA H, NOBUSAWA E. Metabolic fate of [8-^{14}C]adenine and [8-^{14}C] hypoxanthine in higher plants. *Z Pflanzenphysiol* 1981; **104:** 443–458.

[9] ASHIHARA H, NYGAARD P. Purine nucleotide synthesis and RNA synthesis in suspension cultured cells of carrots. *Physiol Plant* 1989; **75:** 31–36.

[10] ASHIHARA H, STASOLLA C, LOUKANINA N, THORPE TA. Purine and pyrimidine metabolism in cultured white spruce (*Picea glauca*) cells: Metabolic fate of ^{14}C-labeled precursors and activity of key enzymes. *Physiol Plant* 2000; **108:** 25–33.

[11] ASHIHARA H, STASOLLA C, LOUKANINA N, THORPE TA. Purine metabolism during white spruce somatic embryo development: salvage of adenine, adenosine, and inosine. *Plant Sci* 2001a; **160:** 647–657.

[12] ASHIHARA H, WAKAHARA S, SUZUKI M, KATO A, SASAMOTO H, BABA S. Comparison of adenosine metabolism in leaves of several mangrove plants and a poplar species. *Plant Physiol Biochem* 2003; **41:** 133–139.

[13] ATKINS CA, SHELP BJ, STORER PJ. Purification and properties of inosine monophosphate oxidoreductase from nitrogen-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Arch Biochem Biophys* 1985; **236:** 807–814.

[14] BRESSAN RA, MURRY MG, GALE JM, ROSS CW. Properties of pea seedling uracil phosphoribosyltransferase and its distribution in other plants. *Plant Physiol* 1978; **61:** 442–446.

[15] BURCH LR, STUCHBURY T. Metabolism of purine nucleotides in the tomato plant. *Phytochemistry* 1968; **25:** 2445–2449.

[16] CARTER SG, TIPTON CL. Purification and characterization of a 5'-nucleotidase from *Zea mays* microsomes. *Phytochemistry* 1985; **25:** 33–37.

[17] CHRISTOPHERSON RI, SZABADOS E. Nucleotide biosynthesis in mammals. [w] Agius L, Sherratt HSA [red.] Channelling in Intermediary Metabolism. London, Portland Press, 1997: 315–335.

[18] COMBES A, LAFLRURIEL J, LeFLOC'H F. The inosine-guanosine kinase activity of mitochondria in tubers of Jerusalem artichoke. *Plant Physiol Biochem* 1989; **27:** 729–736.

[19] DANCER JE, HUGHES RG, LINDELL SD. Adenosine-5'-phosphate deaminase. A novel herbicide target. *Plant Physi*ol 1997; **114:** 119–129.

[20] DENG QI, IVES DH. Non-allosteric regulation of the uridine kinase from seeds of *Zea mays*. *Biochim Biophys Acta* 1975; **377:** 84–94.

[21] GURANOWSKI A, BARANKIEWICZ J. Purine salvage in cotyledons of germinating lupin seeds. *FEBS Lett* 1979; **104:** 95–98.

[22] GURANOWSKI A, PAWELKIEWICZ J. Adenosylhomocysteinase and adenosine nucleosidase activities in *Lupinus luteus* cotyledons during seed formation and germination. *Planta* 1978; **139:** 245–247.

[23] GURANOWSKI A. Purine catabolism in plants. Purification and some properties of inosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. *Plant Physiol* 1982; **70:** 344–349.

[24] HATCH MD. Adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from plant tissues. *Biochem J* 1966; **98:** 198–203.

[25] HENDERSON JF, PATERSON ARP. Nucleotide Metabolism – An Introduction, Academic Press, New York, 1973.

[26] HIROSE F, ASHIHARA H. Adenine phosphoribosyltransferase of *Catharanthus roseus* cells: purification, properties and regulation. *Z Pflanzenphysiol* 1983; **110:** 135–145.
[27] IWAI K, FUJISAWA Y, SUZUKI N. The accumulation of 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole-carboxamide in folate-deficient pea seedlings and enzymatic reaction in which the compound is involved. *Agric Biol Chem* 1972; **36:** 398–408.
[28] KANAMORI I, ASHIHARA H, KOMAMINE A. Changes in the activites of the pentose phosphate nucleotide biosynthesis during growth of *Vinca rosea* in suspension culture. *Z Pflanzenphysiol* 1979; **93:** 437–448.
[29] KANDPAL RP, RAO A. Water stress-induced desensitization of aspartate transcarbamylase from ragi (*Eleusine coracana*) seedlings. *Biochem Int* 1984; **9:** 307–314.
[30] KRATH BN, HOVE-JENSEN B. Organellar and cytosolic localization of four phosphoribosyl diphosphate isoenzymes in spinach. *Plant Physiol* 1999; **119:** 497–505.
[31] LAZAR G, ZHANG H, GOODMAN HM. The origin of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase isogenes of *Arabidopsis thaliana. Plant J* 1993; **3:** 657–668.
[32] LEE D, MOFFATT BA. Purification and characterization of adenine phosphoribosyl transferase from *Arabidopsis thaliana. Physiol Plant* 1993; **87:** 483–492.
[33] LeFLOC'H F, GUILLOT A. La desoxycytidine amimohydrolase des feuilles de *Zea mays. Phytochemistry* 1974; **13:** 2503–2509.
[34] LeFLOC'H F, LAFLEURIEL J. L'adeninephosphoribosyltransferase des pousses de topinambour *Helianthus tuberosus. Phytochemistry* 1978; **17:** 643–646.
[35] LeFLOC'H F, LAFLEURIEL J. The purine nucleosidases of Jerusalem artichoke shoots. *Phytochemistry* 1981; **20:** 2127–2129.
[36] LeFLOC'H F, LAFLEURIEL J. L' hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase des pousses de Topinambour *Helianthus tuberosus* L. *Z Pflanzenphysiol* 1983; **104:** 331–340.
[37] LeFLOC'H F, LAFLEURIEL J. Purification and properties of guanylate kinase of mitochondria from tubers of Jerusalem artichoke. *Plant Physiol Biochem* 1990; **28:** 191–201.
[38] LeFLOC' H F, LAFLEURIEL J. The particulate AMP aminohydrolase of Jerusalem artichoke tubers: partial purification and properties. *Physiol Veg* 1983; **21:** 15–27.
[39] MAZUS B, BUCHOWICZ J. Activity of the enzymes involved in pyrimidine metabolism in germinating wheat grains. *Phytochemistry* 1972; **11:** 77–82.
[40] MEYER R, WAGNER KG. Nucleotide pools in suspension-cultured cells of *Datura innoxia* I. Changes during growth of the batch culture. *Planta* 1985a; **166:** 439–445.
[41] MEYER R, WAGNER KG. Analysis of the nucleotide pool during growth of suspension cultured cells of *Nicotiana tabacum* by high performance liquid chromatography. *Physiol Plant* 1985b; **65:** 439–445.
[42] MIERSCH J, KRAUSS GJ, METZGER U. Properties and subcellular localization of dihydroorotate dehydrogenase in cells of tomato suspension culture. *J Plant Physiol* 1986; **122:** 55–66.
[43] MOFFATT BA, ASHIHARA H. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and matabolism. *Arabidopsis* Book. 2nd Edition, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD 2002.
[44] MOFFATT BA, SOMERVILLE CR. Positive selection for male-sterile mutants of *Arabidopsis* lacking adenine phosphoribosyltransferase activity. *Plant Physiol* 1988; **86:** 1150–1154.
[45] MOFFATT BA, WANG L, ALLEN MS, STEVENS YY, QIN W, SNIDER J, VON SCGWARTZENVERG K. Adenosine kinase of *Arabidopsis*. Kinetic properties and gene expression. *Plant Physiol* 2000; **124:** 1775–1785.
[46] NAGISHI O, OZAWA T, IMAGAWA H. Guanosine deaminase and guanine deaminase from tea leaves. *Biosci Biotech Biochem* 1994; **58:** 1277–1281.
[47] NEUHARD J, KELLN RA. Biosynthesis and convertion of pyrimidines. [w] Neidhardt J [red.] *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1996: 580–599.
[48] NEWMAN T, deBRUIJN FJ, GREEN P, KEEGSTRA K, KENDE H, McINTOSH L, OHLROGGE J, RAIKHEL N, SOMERVILLE S, THOMASHOW M, RETZEL E, SOMERVILLE C. Genes galore: a summary methods for accessing results from large-scale partial sequencing *Arabidopsis* cDNAs clones. *Plant Physiol* 1994; **106:** 1241–1255.
[49] NIEMAN RH, CLARK RA, PAP D, OGATA G, MASS EV. Effects of salt stress on adenine and uridine nucleotide pools, sugar and acid-soluble phosphate in shoot of pepper and safflower. *J Exp Bot* 1988; **39:** 301–309.
[50] NISHIMURA K, ASHIHARA H. IMP dehydrogenase from tea leaves and suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *Phytochemistry* 1993; **34:** 613–615.

[51] NOBUSAWA E, ASHIHARA H. Purine metabolism in cotyledons and embryonic axes of black gram (*Phaseolus mungo* L.) seedlings. *Int J Biochem* 1983; **15:** 1059–1065.
[52] O'NEAL T, NAYLOR AW. Some regulatory properties of pea carbamoyl phosphate synthetase. *Plant Physiol* 1976; **57:** 23–28.
[53] ONG BL, JACKSON JF. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in *Phaseolus aureus*. Enzymic aspects of the control of carbamoyl phosphate synthesis and utilization. *Biochem J* 1972; **129:** 583–593.
[54] PARDO EG, GUTIERREZ C. Cell cycle- and differentiation stage-dependent variation of dUTPase activity in higher plant cells. *Exp Cell Res* 1990; **186:** 90–98.
[55] PRADE L, COWAN-JACOB SW, CHEMLA P, POTTER S, WARD E, FONNE-PFISTER R. Structures of adenylosuccinate synthetase from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol* 2000; **296:** 569–577.
[56] PRASHER DC, CARR MC, IVES DH, TSAI TC, FREY PA. Nucleoside phosphotransferase from barley. Characterization and evidence for ping pong kinetics involving phosphoryl enzyme. *J Biol Chem* 1982; **257:** 4931–4939.
[57] PRICE CE, MURRAY AW. Purine metabolism in germinating wheat embryos. *Biochem J* 1969; **115:** 129–133.
[58] RAO GSJ, SAVITHRI HS, SEETHALAKSHMI S, RAO NA. Plant aspartate transcarbamylase: An affinity chromatographic method for the purification of the enzyme from germinated seedlings. *Anal Biochem* 1979; **95:** 401–405.
[59] REYNOLDS PH, BLEVINS DG, RANDAL DD. 5-phosphoribosylpyro-phosphate amidotranferase from soybean root nodules: kinetic and regulatory properties. *Arch Biochem Biophys* 1984; **229:** 623–631.
[60] SANCHEZ F, CAMPOS F, BONNEVILLE J-M, ENRIQUEZ C, CAPUT D. Purification, cDNA cloning, and development expression of the nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 1987; **84:** 1143–1147.
[61] SANTOSO D, THORNBURG R. Uridine 5'-monophosphate synthase is transcriptionally regulated by pyrimidine levels in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol* 1998; **116:** 815–821.
[62] SAWERT A, BACKER AI, WAGNER KG. Age-dependent decrease of nucleoside pools in cereal leaves. *Plant Cell Physiol* 1988; **29:** 61–65.
[63] SCHUBERT KR, BOLAND MJ. The ureides. [w] Stump PK, Conn EE [red.] The Biochemistry of Plants. Vol 6, Academic Press, San Diego 1990: 197–282.
[64] SENECOFF FJ, McKINNEY EC, MEAGHER RB. *De novo* purine synthesis in *Arabidopsis thaliana* II. The *PUR7* gene encoding 5'-phosphoribosyl-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole synthetase is expressed in rapidly dividing tissues. *Plant Physiol* 1996; **112:** 905–917.
[65] SENECOFF FJ, MEAGHER RB. Isolating the *Arabidopsis thaliana* gene for the *de novo* purine synthesis by suppression of *Escherichia coli* mutants. I. 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole synthetase. *Plant Physiol* 1993; **102:** 387–399.
[66] SHIMAZAKI A, ASHIHARA H. Adenine and guanine salvage in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Ann Bot* 1982; **50:** 531–534.
[67] SHIMAZAKI A, HIROSE F, ASHIHARA H. Changes in adenine nucleotide levels and adenine salvage during growth of *Vinca rosea* cells in suspension culture. *Z Pflanzenphysiol* 1982; **106:** 191–198.
[68] STASOLLA C, KATAHIRA R, THORP TA, ASHIHARA H. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J Physiol Plant* 2003; **160:** 1271–1295.
[69] STASOLLA C, LOUKANINA N, ASHIHARA H, YEUNG EC, THORP TA. Pyrimidine deoxyribo-nucleotide metabolism during maturation and germination of white spruce (*Picea glauca)* somatic embryos: metabolic fate of ^{14}C-labeled cytidine, deoxycytidine and thymidine. *Physiol Plant* 2003; **118:** 499–506.
[70] STASOLLA C, LOUKANINA N, ASHIHARA H, YEUNG EC, THORP TA. Pyrimidine nucleotide biosynthesis and nucleic acid metabolism in embryos and megagametophytos of white spruce (*Picea glauca*) during germination. *Physiol Plant* 2002; **115:** 155–165.
[71] STASOLLA C, LOUKANINA N, ASHIHARA H, YEUNG EC, THORPE TA. Purine and Pyrimidine metabolism during the partial drying treatment of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Physiol Plant* 2001a; **111:** 93–101.
[72] STASOLLA C, LOUKANINA N, ASHIHARA H, YEUNG EC, THORP TA. Ascorbic acid changes the pattern of purine metabolism during germination of white spruce somatic embryos. *Tree Physiol* 2001b; **21:** 359–367.
[73] STASOLLA C, LOUKANINA N, ASHIHARA H, YEUNG EC, THORP TA. Changes in pyrimidine nucleotide biosynthesis during germinating of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 2001c; **37:** 285–292.

[74] STERLY F, REGAN S, KARLSSON J, HERTZBERG M, ROHDE A, HOLMBERG A, AMINI B, BHALERADO R, LARSSON M, VILLARROEL R, VAN MONTAGU M, SANDBERG G, OLSSON O, TERRI TT, BOERJAN W, GUSTAFSSON P, UHLEN M, SUNDBERG B, LUNDEBERG J. Gene discovering in the wood-forming tissue of poplar: analysis of 5,692 expressed sequenced tags. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **95:** 13330–13335.
[75] SUZUKI T, YASUMOTO E, BABA S, ASHIHARA H. Effect of salt stress on the metabolism of ethanolamine and choline in leaves of the betaine-producing mangrove species *Avicennia marina*. *Phytochemistry* 2003; **64**: 941–948.
[76] TRIPLETT EW, BLEWINS DG, RANDALL DD. Purification and properties of soybean nodule xanthine dehydrogenase. *Arch Biochem Biphys* 1982; **219:** 39–46.
[77] VINCENZETTI S, CAMBI A, NEUHARD J, SCHNORR K, GRELLONI M, VITA A. Cloning, expression, and purification of cytidine deaminase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Express Puri* 1999; **15:** 8–15.
[78] WAGNER KG, BACKER AI. Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular basis. [w]: Jeon KW, Friedlander M [red.] International Review of Cytology. Vol 134, Academic Press, San Diego 1992: 1–84.
[79] WALSH TA, GREEN SB, LARRINUA IM, SCHMITZER PR. Characterization of plant β-ureidopropionase and functional over expression in *Escherichia coli*. *Plant Physiol* 2001; **125:** 1001–1011.
[80] WALTHER R, WALD K, GLUND K, TEWES A. Evidence that a single polypeptide catalyzes the two step conversion of orotate to UMP in cells from tomato suspension culture. *J Plant Physiol* 1984; **116:** 301–311.
[81] WASTERNACK C. Metabolism of pyrimidines and purines. [w] Pirson A, Zimmermann MH [red.] Encyclopedia of Plant Physiology, New Ser, Vol 14B, Springer, Berlin 1982: 263–301.
[82] WILLIAMSON CL, LAKE MR SLOCUM RD. A. cDNA encoding carbamoyl phosphate syhthetase large subunit (carB) from *Arabidopsis* (Accession No. U40341) (PGR96-055). *Plant Physiol* 1996; **111:** 1354.
[83] WILLIAMSON CL, SLOCUM RD. Molecular cloning and characterization of the pyrB1 and pyrB2 genes encoding aspartate transcarbamoylase in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol* 1994; **105:** 377–384.
[84] YABUKI N ASHIHARA H. AMP deaminase and the control of adenylate catabolism in suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *Phytochemistry* 1992; **31:** 5–1909.
[85] ZHOU L, LACROUTE F, THORNBURG R. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of *Arabidopsis thaliana* UMP/CMP kinase. *Plant Physiol* 1998; **117:** 245–254.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 16.06.2004 r.
Przyjęto: 10.11.2004 r.
Adres autora: ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń.
e-mail: asjawors@biol.uni.torun.pl