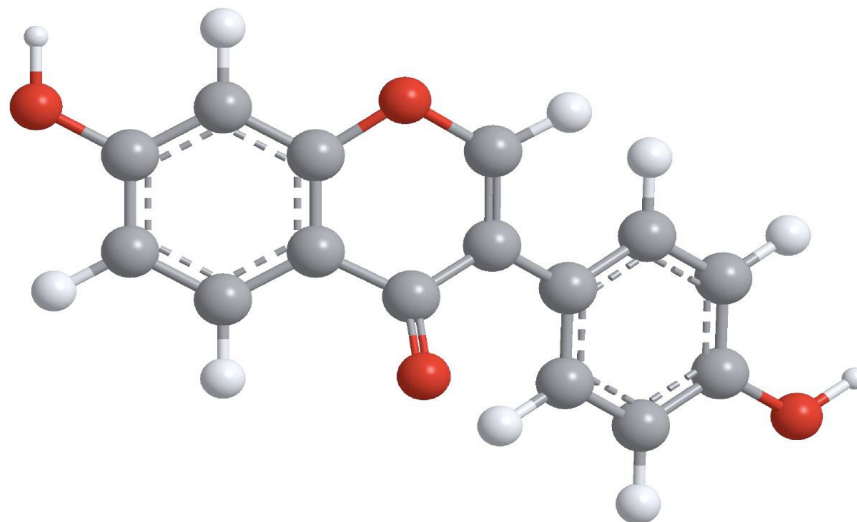


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra fyziologie rostlin



Isoflavonoidy v nebobovitých rostlinách: fytochemie, biologické funkce a molekulární biologie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Martina Pičmanová

Školitel: RNDr. David Honys, PhD.

Praha 2008

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Davidu Honysovi, PhD. za odbornou pomoc a přátelský přístup a konzultantům Doc. RNDr. Oldřichu Lapčíkovi, Dr. a Ing. Radce Koblenské za cenné rady a pomoc při vyhledávání studijních materiálů.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím všech uvedených literárních pramenů a souhlasím s jejím zveřejňováním.

V Praze dne 18.dubna 2008

.....
Martina Pičmanová

ABSTRAKT

V nepřeberném množství rozličných sekundárních metabolitů rostlin zaujímají isoflavonoidy zvláštní postavení díky širokému spektru svých biologických účinků. V literatuře je rozsáhle pojednán pozitivní efekt těchto známých fytoestrogenů na lidské zdraví, včetně prevence rakoviny a zmíření menopauzálních symptomů u žen, na druhou stranu jsou diskutována také potenciální rizika spojená s jejich konzumací. Značný význam mají isoflavonoidy pro rostliny samotné zvláště v obraně před patogeny a v navozování rhizobiální symbiosy. Isoflavonoidy jsou produkovány v jedné z větví fenylpropanoidové dráhy především rostlinami z čeledi bobovitých (Fabaceae, syn. Leguminosae), v současnosti je známo navíc 59 dalších rostlinných čeledí, v nichž byly isoflavonoidy rovněž nalezeny. Kompletní popis biosyntetické dráhy těchto přírodních látek i jejího genetického pozadí představuje výzvu pro metabolické inženýrství biosyntézy isoflavonoidů zvláště v hospodářsky významných plodinách, které přirozeně isoflavonoidy neprodukují.

Tato bakalářská práce je literární řešerší, jejímž cílem je nahlédnout problematiku isoflavonoidů v nebobovitých rostlinách z pohledu biochemie, molekulární biologie, rostlinné fyziologie a farmakognosie, shrnout dosavadní poznatky a nastínit možnosti praktické aplikace těchto znalostí v oblasti metabolického inženýrství biosyntézy isoflavonoidů.

Klíčová slova:

Isoflavonoidy, bobovité a nebobovité rostliny, fenylpropanoidová dráha, isoflavonsynthasa (IFS), cytochrom P450, fytoalexiny, fytoanticipiny, rhizobiální symbiosa, fytoestrogeny, metabolické inženýrství.

ABSTRACT

Amidst the vast number of diverse secondary metabolites of plants, isoflavonoids occupy a special place due to the wide range of their biological activities. The literature deals extensively with the positive effect of these well-known phytoestrogens on human health, including cancer prevention and the mitigation of menopause symptoms, as well as with the potential risks associated with their consumption. Isoflavonoids have considerable importance for plants themselves, particularly in the defence against pathogens and in the induction of rhizobial symbiosis. Isoflavonoids are produced in one of the branches of the phenylpropanoid pathway, chiefly by leguminous plants (Fabaceae family, syn. Leguminosae family). In addition, 59 other families are known in which isoflavonoids have also been discovered. A complete description of biosynthetic pathway of these natural products and of the genetic background of this biosynthesis, constitutes a challenge in the metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis, especially in the case of crop-plants that are not natural producers of isoflavonoids.

This Bachelor's thesis comprises a literature survey aiming to treat the topic of isoflavonoids in non-leguminous plants from the viewpoints of biochemistry, molecular biology, plant physiology and pharmacognosy; to summarise present knowledge; and to outline its potential applications in the metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis.

Keywords:

Isoflavonoids, leguminous and non-leguminous plants, phenylpropanoid pathway, isoflavone synthase (IFS), cytochrome P450, phytoalexins, phytoanticipins, rhizobial symbiosis, phytoestrogens, metabolic engineering.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	5
1. ÚVOD	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2.1. CHEMIE ISOFLAVONOIDŮ	7
2.1.1. Struktura a klasifikace isoflavonoidů	7
2.1.2. Izolace a identifikace isoflavonoidů	8
2.2. ISOFLAVONOIDY Z POHLEDU FYTOCHEMIE	10
2.2.1. Biosyntéza isoflavonoidů v rostlinách	10
2.2.2. Výskyt isoflavonoidů napříč rostlinnými taxony	13
2.3. ISOFLAVONSYNTHASA	15
2.3.1. Cytochrom P450	16
2.3.2. Reakční mechanismus	16
2.3.3. Modelace IFS	18
2.3.4. Geny kódující IFS	20
2.3.5. Evoluční původ IFS	21
2.4. VÝZNAM ISOFLAVONOIDŮ V ROSTLINNÉ FYZIOLOGII	22
2.4.1. Phytoalexiny a phytoanticipiny	22
2.4.2. Isoflavonoidy a rhizobiální symbiosa	25
2.5. DIETETICKÝ A FARMAKOLOGICKÝ VÝZNAM ISOFLAVONOIDŮ	29
2.5.1. Chemopreventivní vlastnosti isoflavonoidů	29
2.5.2. Phytoestrogeny	30
2.6. METABOLICKÉ INŽENÝRSTVÍ BIOSYNTÉZY ISOFLAVONOIDŮ V NEBOBOVITÝCH ROSTLINÁCH	34
3. ZÁVĚR	35
Seznam použité literatury	36

Seznam použitých zkratek

2HIS	2-hydroxyisoflavanonsynthasa
2HID	2-hydroxyisoflavanondehydratasa
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
CA4H	4-hydroxylasa kyseliny skořicové
CDS	kódující sekvence DNA
CE	kapilární elektroforéza
CL	kumaroyl-CoA ligasa
CYP93C	cytochrom P450 z rodiny 93C
D7OMT	daidzein 7-O-methyltransferasa
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi
ERα, ERβ	estrogenové receptory α a β
ESI	ionizace elektrosprejem
ESTs	nekompletní cDNA (<i>Expressed sequence tags</i>)
FIA	fluorescenční imunoanalýza
FPIA	fluorescenčně-polarizační imunoanalýza
GC	plynová chromatografie
HI4'OMT	hydroxyisoflavanon 4'-O-methyltransferasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHI	chalkonisomerasa
CHR	chalkonreduktasa
CHS	chalkonsynthasa
IFD	isoflavanondehydratasa
IFS	isoflavonsynthasa
IOMT	isoflavanon O-methyltransferasa
LPO	peroxidace lipidů
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAL	fenylalaninamoniaklyasa
RIA	radioimunoanalýza
SAR	získaná systemická rezistence
SIM	režim monitorování vybraného iontu (<i>Selected ion monitoring mode</i>)

1. ÚVOD

Isoflavonoidy představují skupinu nízkomolekulárních sekundárních metabolitů produkovaných především rostlinami z čeledi bobovitých (Fabaceae, syn. Leguminosae). Díky široké paletě svých biologických účinků vyvolaly isoflavonoidy v posledních dvaceti letech mimořádný zájem rostlinných fyziologů a farmakologů. Isoflavonoidy se uplatňují jako fytoalexiny, fytoanticipiny, insekticidy a chemoatraktanty při navozování rhizobiální symbiosy. Značnou pozornost zasluhují rovněž pro svou fytoestrogenní aktivitu a jako zdraví prospěšná součást lidské stravy s antivirálním, antioxidantním a kanceroprotektivním působením.

Jejich objevení jakožto biologicky aktivních přírodních látek spadá do poloviny devatenáctého století, kdy se Reinschovi a Hlasiwetzovi podařilo izolovat z kořenů leguminózy jehlice trnité (*Ononis spinosa* L.) isoflavonoid **ononin**. První doklady o výskytu isoflavonoidů mimo čeleď bobovitých rostlin pochází z přelomu 19. a 20. století. De Laire a Tiemann publikovali roku 1893 izolaci **iridinu** z oddenků kosatce *Iris florentina* (Iridaceae) a v roce 1910 byl prací H. Finnemora prokázán výskyt dalšího isoflavonoidu, **prunetinu**, v kůře dřevin rodu *Prunus* (Rosaceae; citováno dle Veitch, 2007). K současnému datu je dle Veitch (2007) a Lapčíka *et al.* (2007) známo přibližně 1600 různých isoflavonoidů, z nichž bylo alespoň 225 popsáno v 59 různých neleguminózních čeledích.

Ve své bakalářské práci jsem shrnula dosavadní znalosti o fytochemii isoflavonoidů, molekulární podstatě jejich biosyntézy a o jejich výskytu napříč rostlinným spektrem, s důrazem kladeným na nebobovité rostliny, které bývají jakožto méně významní producenti isoflavonoidů často neprávem přehlíženy. Diskutovala jsem význam isoflavonoidů pro rostlinnou fyziologii a humánní medicínu a nastínila možnosti, jež skýtá metabolické inženýrství jejich biosyntézy.

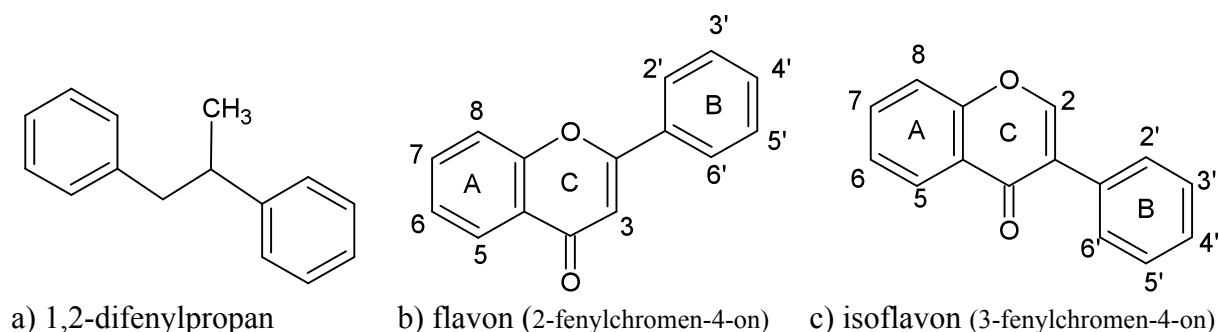
Do tajemství genetického pozadí biosyntézy isoflavonoidů jsem nahlédla také prakticky na Ústavu experimentální botaniky AV ČR, kde jsem se pokusila identifikovat gen kódující klíčový enzym v biosyntéze isoflavonoidů, isoflavonsynthasu, ve vybraných nebobovitých rostlinách (experimentální část není zahrnuta v bakalářské práci). V budoucnu bych ráda svými poznatky v problematice taxonomické distribuce isoflavonoidů obohatila dosavadní znalosti získané především metodami analytické chemie.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. CHEMIE ISOFLAVONOIDŮ

2.1.1. Struktura a klasifikace isoflavonoidů

Isoflavonoidy jsou rozsáhlou podskupinou polyfenolických biologicky aktivních přírodních produktů flavonoidů čítajících přibližně 5000 různých struktur. Patnáctiuhlíkový skelet isoflavonoidů ($C_6-C_3-C_6$) je formálně odvozen od 1,2-difenylpropanu (Reynaud *et al.*, 2005, viz Obr. 1)

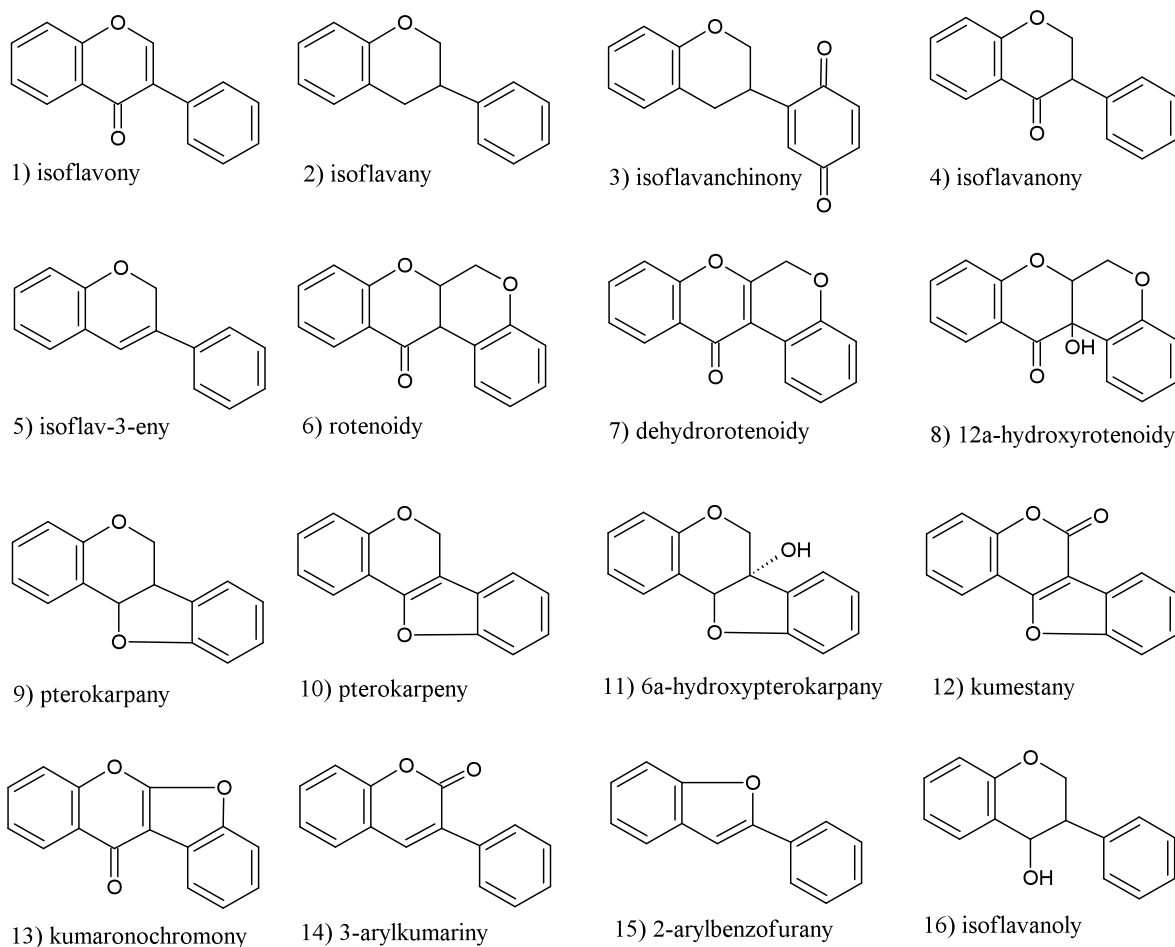


Obr. 1: Difenylpropanový skelet (a), základní skelet flavonu (b) a isoflavonu (c)

V rostlině se isoflavonoidy vyskytují ve formě volných aglykonů, méně často ve formě glykosidů jako konjugáty s glukosou, rhamnosou či apiosou. 7-*O*-glykosidy jsou nejběžnější zásobní formou isoflavonoidů (Reynaud *et al.*, 2005). V tělních tekutinách konzumentů jsou pak přítomny isoflavonoidy jako volné aglykony nebo jejich mono- a disulfáty, mono- a diglukosiduronáty nebo sulfoglukosiduronáty (Dakora a Phillips, 1996).

Základní skelet molekul isoflavonoidů (3-fenylchromen-4-on) podléhá rozličným substitucím (methylace, prenylace, hydroxylace, chlorace, připojení aromatických či alifatických kyselin, aminoskupin apod.) a cyklizacím. Isoflavonoidy se vyskytují v různých oxidačních stupních, také ve formě dimerů a heterodimerů (Reynaud *et al.*, 2005).

Na základě strukturní rozmanitosti jsou isoflavonoidy klasifikovány do následujících podskupin (Veitch, 2007): isoflavony, isoflavany, isoflavanchinony, isoflavanony, isoflav-3-eny, rotenoidy, dehydrorotenoidy, 12a-hydroxyrotenoidy, pterokarpany, pterokarpeny, 6a-hydroxypterokarpany, kumestany, kumaronochromony, 3-arylkumariny, 2-arylbenzofurany a isoflavanoly (viz Obr. 2). Nejpočetnějšími skupinami isoflavonoidů jsou isoflavony a pterokarpany.



Obr. 2: Přehled jednotlivých skupin isoflavonoidů a jejich základní chemická struktura. (Nakresleno v programu ACD/ChemSketch podle Veitch, 2007)

2.1.2. Izolace a identifikace isoflavonoidů

Při izolaci isoflavonoidů se používá rostlinný materiál jak čerstvý, tak sušený či lyofilizovaný, přičemž oddenky, kořeny, dřevo a kůra jsou bohatším zdrojem jejich aglykonů než listy a květy (Reynaud *et al.*, 2005)*. Extrakce se provádí až čtrnáctidenní macerací při laboratorní teplotě rozpouštěním ve vodných roztocích ethanolu, methanolu, acetonu, diethyletheru nebo ethylacetátu. Získaný extrakt se dále zbavuje hydrofobních látek rozpouštěním v hexanu či jiném nepolárním rozpouštědle a následně zpracovává moderními technikami (Lanková, Diplomová práce 2007).

* Obsah isoflavonoidů v rostlině je však závislý na řadě faktorů: půdních a klimatických podmínkách, druhu a stáří rostliny, přítomnosti patogenů a symbiontů apod. (Dakora a Phillips, 2006).

V současnosti je nejběžnější metodou identifikace isoflavonoidů vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a hmotnostní spektrometrie (MS), často spojená s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI). Pro identifikaci komplexních molekul je vhodná dvourozměrná nukleární magnetická rezonance (2D-NMR). Účinným nástrojem pro analytiku isoflavonoidů je rovněž kapilární elektroforéza (CE) kombinovaná s ionizací elektrosprejem a hmotnostní spektrometrií (ESI-MS; Boland a Donnelly, 1996).

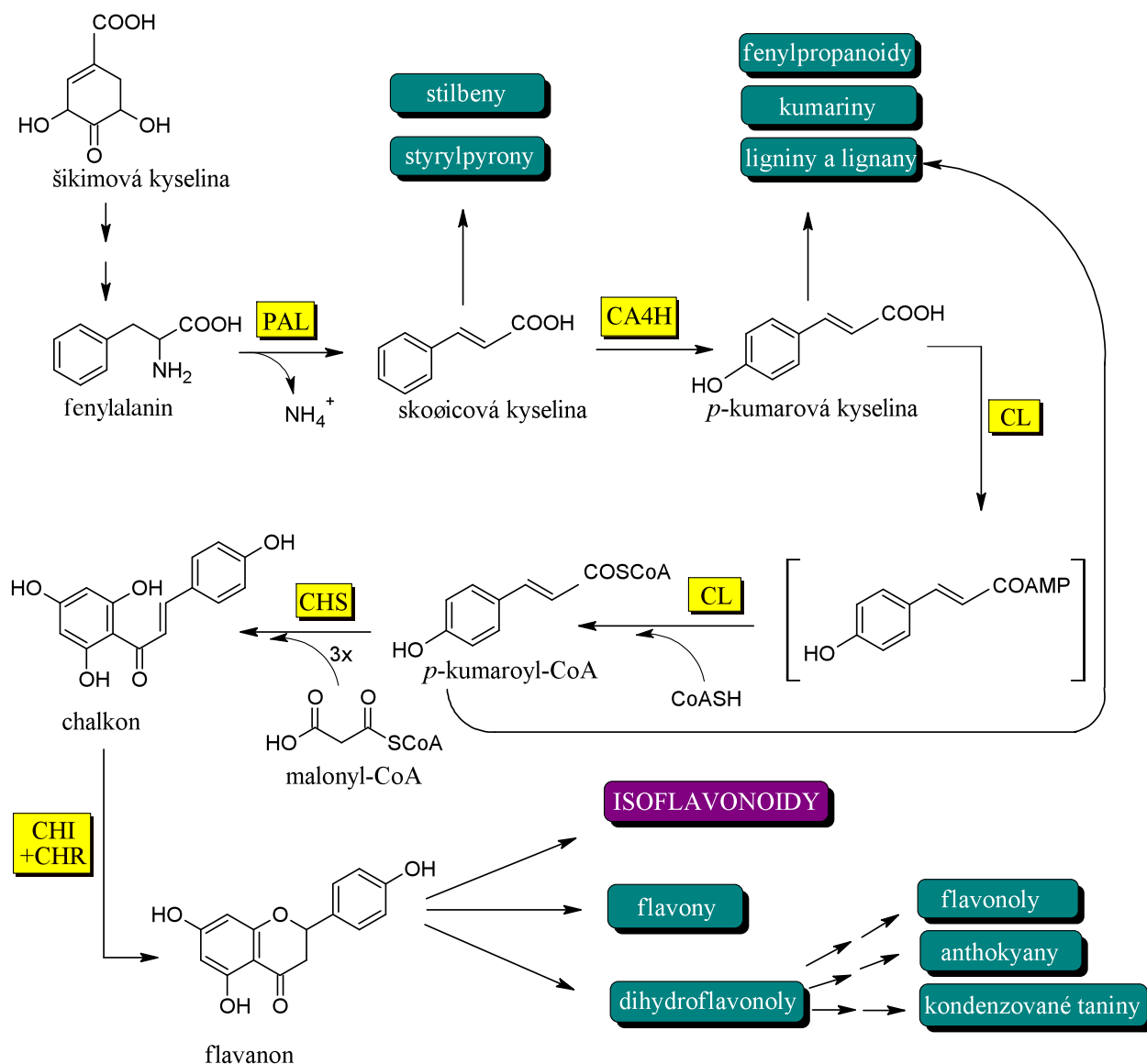
Vedle těchto často velmi nákladných metod se jako velmi efektivní ukázaly metody imunoanalytické – např. fluorescenční (FIA), fluorescenčně-polarizační (FPIA), enzymové (ELISA), radioimunoanalýza (RIA) a další (Lapčík *et al.*, 1999; Macková, Diplomová práce 2004).

Stále rostoucí citlivost analytických metod umožňuje izolovat a identifikovat isoflavonoidy také z rostlin, v nichž se vyskytují pouze ve stopových množstvích nebo v nichž ani nebyl jejich výskyt očekáván (Reynaud *et al.*, 2005).

2.2. ISOFLAVONOIDY Z POHLEDU FYTOCHEMIE

2.2.1. Biosyntéza isoflavonoidů v rostlinách

Isoflavonoidy jsou v rostlině syntetizovány a dále modifikovány v jedné z větví fenylypropanoidové dráhy, která je klíčovou metabolickou drahou vedoucí k mnoha dalším, pro rostlinu důležitým sekundárním metabolitům jako jsou ligniny, kumariny, stilbeny, aurony, kondenzované taniny a všechny skupiny látek zahrnuté pod společný název flavonoidy (chalkony, flavony, flavanony, flavonoly, flavan-3-oly, anthokyany apod.; viz Obr. 3).



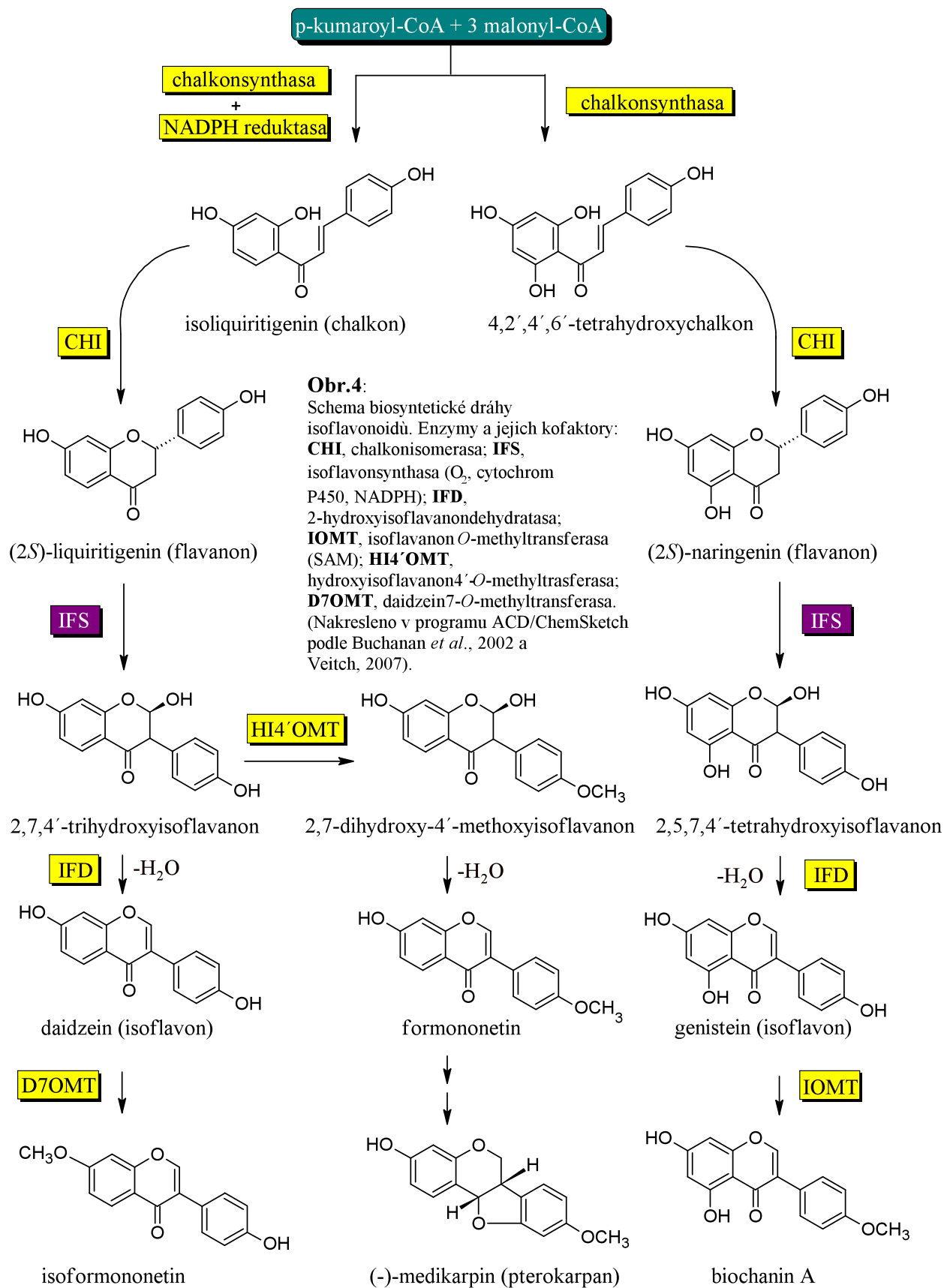
Obr. 3: Schematické znázornění hlavních větví fenylypropanoidové dráhy. Enzymy a jejich kofaktory: PAL, fenylalaninamoniaklyasa; CA4H, 4-hydroxylasa kyseliny skořicové (O_2 , cytochrom P 450, NADPH); CL, kumaroyl-CoA ligasa (CoASH, ATP); CHS, chalkonsynthasa; CHI, chalkonisomerasa; CHR, chalkonreduktasa. (Nakresleno v programu ACD/ChemSketch podle Buchanan *et al.*, 2002, Winkel-Shirley, 2001)

Fenylpropanoidová dráha je odvozena od kyseliny šikimové, resp. z ní vznikající aminokyseliny fenylalaninu, který je ve čtyřech prvních krocích konvertován na chalkon. Od něho vede metabolická dráha k flavanonům a následně isoflavonoidům, v jejichž vzniku hraje klíčovou roli enzym 2-hydroxyisoflavanonsynthasa (2HIS), v literatuře častěji označován jako **isoflavonsynthasa (IFS)**; o IFS blíže kap 2.3.). Tento enzym, patřící mezi cytochrom P450 monooxygenasy, má schopnost katalyzovat unikátní migraci arylové skupiny (B-kruh) z polohy C-2 do polohy C-3 na chromenovém skeletu flavanonů liquiritigeninu (7,4'-dihydroxyflavanon) a naringenin (5,7,4'-trihydroxyflavanon) a tím tvořit první isoflavonoidy ve zmíněné dráze – isoflavony daidzein a genistein (v tomto pořadí; Veitch, 2007). Zdá se, že potenciálním prekursorem isoflavonoidů by mohl být rovněž 7-hydroxyflavanon (Kim *et al.*, 2003; podrobný popis vzniku isoflavonoidů viz Obr. 4).

Yu a McGonigle označují za jeden z kritických metabolitů v popsané dráze vedoucí k isoflavonoidům flavanon naringenin, neboť slouží jako substrát pro řadu dalších enzymů, které IFS konkurují. Kupříkladu u kukuřice je známo pět takových enzymů, ovšem mechanismus větvení dráhy a regulace příslušných reakcí zatím zůstávají nejasné (Yu a McGonigle, 2005).

Následné reakce vedoucí k diverzifikaci isoflavonoidů nejsou, narozdíl od prvního kroku, tj. syntézy isoflavonoidového skeletu, katalyzovány enzymy, jež by byly úzce specifické pro metabolismus isoflavonoidů. Díky široké substrátové specifitě mohou některé z těchto enzymů modifikovat více různých sloučenin a podstatně tak zvyšovat množství sekundárních metabolitů v rostlině „navzdory“ omezenému počtu známých genů, které je kódují (Lapčík, 2007; Schwab, 2003).

Mezi enzymy zapojené v modifikaci isoflavonoidů a vzniku struktur s biologicky rozličnými funkcemi patří mimo jiné glykosyltransferasy, prenyltransferasy, oxidoreduktasy, methyltransferasy a další. Typickou modifikační reakcí je např. hydroxylace na C-2' či C-3' B-kruhu isoflavanů, kterou katalyzují isoflavan2'-hydroxylasa (I2'H) a isoflavan3'-hydroxylasa (I3'H) náležející mezi cytochromy P450 z podrodiny CYP81E (Veitch, 2007). Za produkci isoflavonu formononetinu, klíčového prekursoru isoflavanů a fytoalexinů pterokarpanů (např. medikapinu), je zodpovědná *S*-adenosyl-L-methionin-dependentní 2,7,4'-trihydroxyisoflavanon 4'-*O*-methyltransferasa (HI4'OMT). Na rozdíl od vzniku isoformononetinu není při produkci formononetinu akceptorem methylu daidzein, jak se dříve předpokládalo, ale prekursor daidzeinu 2,7,4'-trihydroxyisoflavanon (Akashi *et al.*, 2000; viz Obr. 4). Mnohé ze zmíněných enzymů a některé z genů, které tyto enzymy kódují, byly popsány v řadě bobovitých i nebobovitých rostlin (Lapčík, 2007).



2.2.2. Výskyt isoflavonoidů napříč rostlinnými taxony

Isoflavonoidy jsou typickými sekundárními metabolity rostlin z čeledi bobovitých (Fabaceae). 95% aglykonů isoflavonoidních struktur známých do roku 1988 bylo popsáno právě v čeledi bobovitých a v důsledku toho isoflavonoidy dlouho sloužily jako chemotaxonomické markery pro tuto čeleď (Reynaud *et al.*, 2005). V podstatně menší míře jsou zastoupeny isoflavonoidy také v dalších taxonech: v jedné čeledi mechů (Bryopsida), třech čeledích jehličnanů (Pinopsida), v 10 čeledích jednoděložných rostlin (Liliopsida) a 46 čeledích dvouděložných rostlin (Magnoliopsida; Macková *et al.*, 2006, Lapčík, 2007; viz Tab. 1).

V posledních dvaceti letech byla díky značnému pokroku analytických metod identifikována řada nových isoflavonoidních struktur. Zatímco v r. 1962 bylo popsáno pouhých 26 různých aglykonů isoflavonoidů, v r. 1988 se jejich počet zvýšil na 630 a v r. 1993 na 870 různých isoflavonoidů (Reynaud *et al.*, 2005); počet nově objevovaných isoflavonoidů i čeledí, v nichž se vyskytují, stále roste. V současnosti je známo celkem asi 1600 různých isoflavonoidů (včetně glykosidů), z nichž alespoň 225, především isoflavonů, bylo popsáno v 59 neleguminózních čeledích (Veitch, 2007; Lapčík, 2007). Vztah mezi taxony produkujícími isoflavonoidy však zůstává zcela nejasný.

Přítomnost isoflavonoidů daidzeinu, genisteinu, biochaninu A a jejich derivátů v C-4' nebo C-7 pozici byla pomocí HPLC-MS-SIM a ELISA metodami prokázána také v listech a květních stopkách modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), a to i navzdory skutečnosti, že v jejím genomu nebyl objeven ortholog dosud známých genů pro IFS z bobovitých rostlin (Lapčík *et al.*, 2006). Obsah zmíněných isoflavonoidů se pohyboval v rozmezí několik málo µg až 2,2 mg na kg suché hmotnosti (Lapčík *et al.*, 2006).

Zdrojem isoflavonoidů jsou rovněž některé potraviny rostlinného původu. Malá množství isoflavonů byla detekována především v třešňovém, rajčatovém, pomerančovém a grapefruitovém džusu (Vítková, Diplomová práce, 2005), v čaji a kávě (Mazur *et al.*, 1998), v pivě (Rosenblum *et al.*, 1992) a bourbonu (Gavaler *et al.*, 1987); o zdrojích isoflavonoidů v těchto nápojích se však stále vede diskuse. Mazur *et al.* dále provedli analýzu různých bobovitých i nebobovitých plodin včetně nejběžnějšího ovoce, zeleniny, obilnin, olejných semen a ořechů. V některých neleguminózních rostlinách prokázali pomocí GC-MS-SIM přítomnost isoflavonů genisteinu a daidzeinu, ovšem ve srovnání s obsahem isoflavonů v leguminózách se jednalo pouze o nepatrná množství (Mazur *et al.*, 1998).

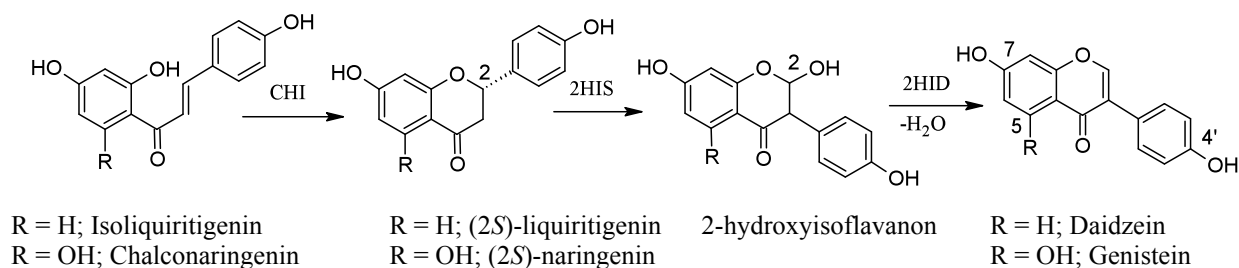
Třída	Čeleď	Počet struktur
<i>Bryopsida:</i>	<i>Bryaceae</i>	3
<i>Pinopsida:</i>	<i>Araucariaceae</i>	2
	<i>Cupressaceae</i>	8
	<i>Podocarpaceae</i> ³	5
<i>Liliopsida:</i>	<i>Asphodelaceae</i>	1
	<i>Cyperaceae</i>	6

Třída	Čeleď	Počet struktur	Čeleď	Počet struktur
Magnoliopsida:	<i>Amaranthaceae</i>	3	<i>Myricaceae</i>	2
	<i>Apiaceae</i>	4	<i>Myristicaceae</i>	13
	<i>Apocynaceae</i>	1	<i>Myrtaceae</i>	6
	<i>Aclepiadaceae</i>	12	<i>Nymphaeaceae</i>	1
	<i>Asteraceae</i>	21	<i>Nyctagiacaeae</i>	19
	<i>Bombacaceae</i>	1	<i>Ochnaceae</i>	17
	<i>Brassicaceae</i>	6	<i>Papaveraceae</i>	2
	<i>Cannabaceae</i>	6	<i>Polygalaceae</i>	3
	<i>Caryophyllaceae</i>	1	<i>Polygonaceae</i>	1
	<i>Celastraceae</i>	1	<i>Rhamnaceae</i>	6
	<i>Chenopodiaceae</i>	19	<i>Rosaceae</i>	5
	<i>Clusiaceae</i>	3	<i>Rutaceae</i>	7
	<i>Connaraceae</i>	1	<i>Rubiaceae</i>	3
	<i>Convolvulaceae</i>	20	<i>Sapotaceae</i>	2
	<i>Crassulaceae</i>	1	<i>Scrophulariaceae</i>	6
	<i>Cucurbitaceae</i>	1	<i>Solanaceae</i>	1
	<i>Erythroxylaceae</i>	8	<i>Sterculiaceae</i>	3
	<i>Euphorbiaceae</i>	3	<i>Urticaceae</i>	1
	<i>Magnoliaceae</i>	1	<i>Verbenaceae</i>	1
	<i>Malvaceae</i>	2	<i>Vitaceae</i>	1
	<i>Melastomataceae</i>	1	<i>Violaceae</i>	2
	<i>Menispermaceae</i>	1	<i>Zygophyllaceae</i>	4
	<i>Moraceae</i>	18		

Tab. 1: Aktuální přehled taxonů nebobovitých rostlin produkujících isoflavonoidy; počty různých struktur uvedené v tabulce se vztahují pouze na aglykony. (Podle primárních zdrojů: Scogin, 1979; Meragelman *et al.*, 2005; Moon, 2005; Koblavská, 2006; Ahmad, 2006; Kuanar, 2006; Chin, 2006; Guo *et al.*, 2007 a sekundárních zdrojů: Reynaud *et al.*, 2005; Macková *et al.*, 2006; Lapčík, 2007).

2.3. ISOFLAVONSYNTHASA

Skelet isoflavonoidů je syntetizován z flavanonů, které představují první 2-arylchromanovou strukturu ve fenylypropanoidové dráze. Hydroxylace flavanonového prekurzoru a kritická oxidativní migrace arylu z polohy C-2 do polohy C-3 na chromenovém skeletu se obecně popisuje jako dvoustupňový proces s vysoce nestabilním 2-hydroxyisoflavanonem jakožto intermediátem. Reakce tedy vyžaduje katalýzu membránově vázanou 2-hydroxyisoflavanonsynthasou (2HIS) a v principu rovněž rozpustnou 2-hydroxyisoflavanondehydratasou (2HID). Navzdory tomu se při popisu celé reakce vžilo označení zúčastněného enzymu **isoflavonsynthasa** (IFS; Veitch, 2007; viz Obr. 5)



Obr. 5: Enzymaticky katalyzované reakce vedoucí k produkci isoflavonoidů. Zkratky enzymů: CHI, chalkonisomerasa; 2HIS, 2-hydroxyisoflavanonsynthasa; 2HID, 2-hydroxyflavanondehydratasa (Nakresleno v programu ACD/ChemSketch podle Veitch, 2007).

IFS byla objevena Grisebachovou skupinou na Univerzitě ve Freiburgu v roce 1984 při studiu enzymové aktivity v suspenzních kulturách buněk sóji (*Glycine max*) s přidáním elicitorem (Kochs a Grisebach, 1986). Skupina demonstrovala, že intramolekulární migrace arylu v radioaktivně značeném (2*S*)-naringeninů je katalyzována NADPH- a O₂- dependentním enzymem, který je lokalizován v membráně endoplasmatického retikula a je inhibován např. oxidem uhelnatým či ancyimidolem, tedy inhibitory specifickými pro cytochrom P450 monooxygenasy (Kochs a Grisebach, 1986). Pro lipofilitu a poměrně řídký výskyt se však IFS dlouho nedařilo izolovat a identifikovat. Teprve v letech 1999 a 2000 se na základě genomického studia podařilo třem na sobě nezávislým skupinám (Steele *et al.*, 1999, Akashi *et al.*, 1999 a Jung *et al.*, 2000) potvrdit, že IFS patří mezi cytochromy P450, a následně také klonovat odpovídající gen (Yu a McGonigle, 2005; blíže viz dále kap. 2.3.4.).

2.3.1. Cytochrom P450

Všechny isoformy isoflavonsynthasy popsané k dnešnímu datu náleží mezi cytochrom P450 monooxygenasy z podrodiny CYP93C a jsou specificky označovány CYP93C1 pro sóju (*Glycine max*), CYP93C2 pro lékořici (*Glycyrrhiza echinata* L.), další příklady lze nalézt pro jiné bobovité rostliny a jedinou nebobovitou rostlinu – řepu (*Beta vulgaris*, Chenopodiaceae). Shoda aminokyselinových sekvencí kódovaných cytochromů P450 je vyšší než 95%, ať se jedná o rostliny bobovité či nebobovité (řepa; Veitch, 2007).

Cytochromy P450, v organismech široce rozšířené hem dependentní enzymy, katalyzují za využití NADPH a/nebo NADH obrovské množství rozličných oxidativních reakcí (Sawada *et*

al., 2002; Frank *et al.*, 1996). Hemová prostetická skupina je u všech P450 kovalentně vázána na cystein ve vysoce konzervované doméně poblíž C konce (Nelson *et al.*, 1993). V současnosti jsou dostupné rentgenově-krystalografické studie cytochromů P450 pocházejících z bakterií a obratlovců. Domény cytochromu P450 mají značně konzervovanou strukturu skládající se z α -helixů a β -listů, ačkoliv jednotlivé isoformy obvykle prokazují úzkou substrátovou specifitu a striktní regiospecifitu pro oxidační místo substrátu (Sawada *et al.*, 2002).

Sekvence všech známých CYP93C nesou typické znaky cytochrom P450 monooxygenas včetně „I“ helixu vázajícího O₂, hem vázajících motivů a konzervované PERF domény (model aktivního místa CYP93C viz Obr. 7; Yu a McGonigle, 2005).

2.3.2. Reakční mechanismus IFS

Yu a McGonigle označili IFS za záhadný enzym vyznačující se neobvyklou schopností katalyzovat alespoň dvě různé reakce: hydroxylaci a migraci arylu. Přesný mechanismus této reakce však nadále zůstává nejasný, neboť i přes značnou snahu dosud nebyla objasněna struktura IFS (krystalizace membránově vázaných proteinů je mimořádně obtížná; Yu a McGonigle, 2005).

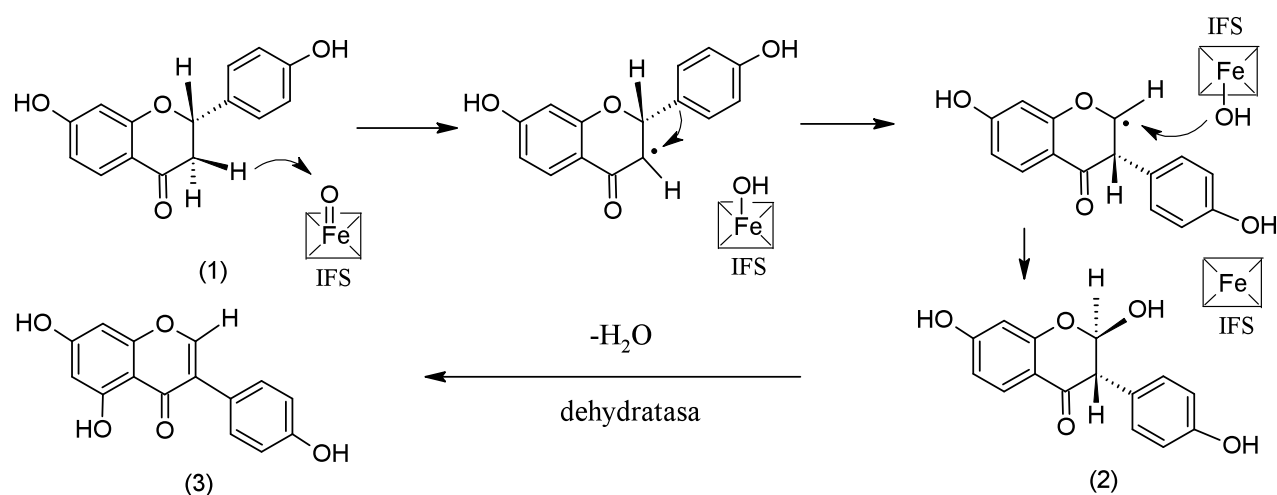
Reakční mechanismus oxidativní konverze flavanonu liquiriteginu na 2,7,4'-trihydroxyflavanon byl zkoumán v suspenzních buněčných kulturách *Pueraria lobata* (Fabaceae) s kvasinkovým extraktem jakožto elicitotem (Hakamatsuka *et al.*, 1990). Experimenty s [¹⁴C]-chalkonem a [³H]-flavanonem potvrdily, že reakce sestává z dvou hlavních kroků (viz výše), jejichž intermediát 2,7,4'-trihydroxyisoflavanon byl identifikován hmotnostní a ¹H NMR spektroskopii. Účast cytochromu P450 na hydroxylaci spojené s migrací arylu byla opět dokázána studiem účinků inhibitorů P450 a tím byly rovněž definitivně vyvráceny dřívější představy, v nichž předpokládaný mechanismus zahrnoval enol-epoxidaci flavanonu (Kochs a Grisebach, 1986) či epoxidaci postranní arylové skupiny (Crombie *et al.*, 1984).

Reakce CYP93C vyžaduje interakce s NADPH:cytochrom P450 (cytochrom c) reduktasou, která mu poskytuje elektrony získané redukcí kofaktoru NADP. Předpokládá se, že mechanismus hydroxylace spojené s rekonstitucí je založen na přitahování vodíku v poloze C-3, následovaném vznikem radikálu, přesmykem arylu z polohy C-2 do polohy C-3 za současné hydroxylace na C-2 a okamžitou enzymatickou dehydratací v poloze C-2 (Hakamatsuka *et al.*, 1990; viz Obr. 6).

Dehydratace 2-hydroxyisoflavanonů na isoflavony probíhá spontánně, následkem čehož jsou tyto intermediáty těžce detekovatelné. V určitých podmínkách jsou však akumulovány

v rostlině a díky tomu se je podařilo izolovat z jetele *Trifolium subterraneum* (Wang *et al.*, 1998). Hakamatsuka *et al.* dokonce purifikoval 2-hydroxyisoflavanondehydratasu ze suspenzní buněčné kultury *Pueraria lobata* s kvasinkovým extraktem jakožto elicitorem. Enzym je jednoduchým polypeptidem o velikosti 38kDa a pH optimem 6,8 (Hakamatsuka *et al.*, 1998).

U nebobovitých rostlin zůstává nadále otázkou, zda je spontánní konverze 2-hydroxyisoflavanonu dosti rychlá na to, aby nedošlo k jeho akumulaci v rostlině, nebo zda rostlina disponuje jakousi univerzální „flavonoiddehydratasou“, která je schopna dehydratovat rozličné struktury flavonoidů a isoflavonoidů. Navíc žádný z experimentů doposud nevyločil možnost, že se IFS podílí také na konverzi 2-hydroxyisoflavanonu na isoflavon (Yu a McGonigle, 2005).

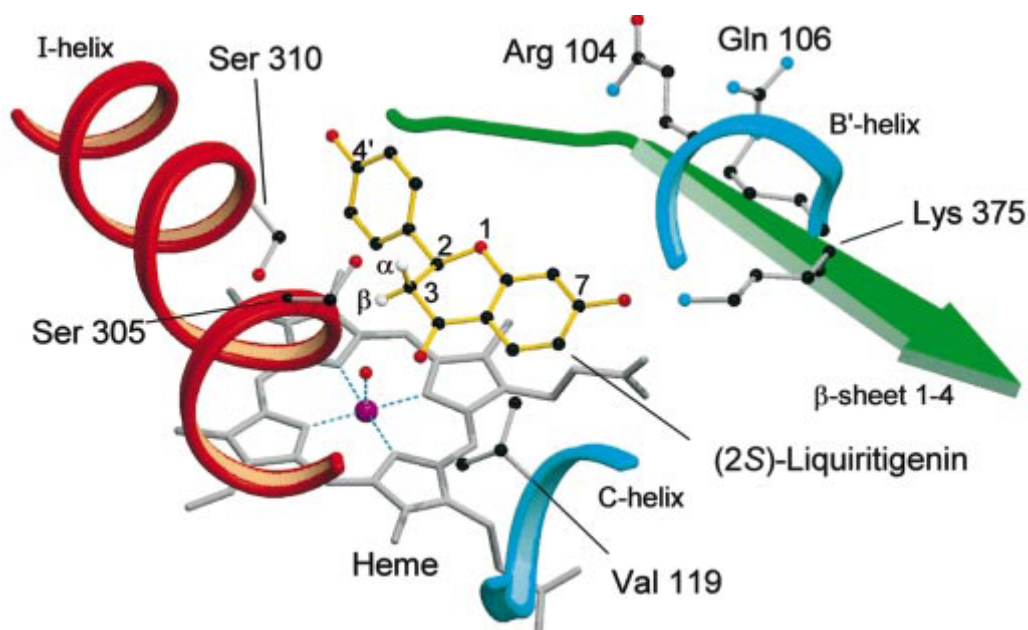


Obr. 6: Předpokládaný reakční mechanismus oxidativní migrace arylu v biosyntéze isoflavonů katalyzované cytochromem P450; (1) liquiritigenin, (2) 2,7,4'-trihydroxyisoflavanon (zkráceně 2-hydroxyisoflavanon), (3) isoflavon genistein; IFS, isoflavonsynthasa. (Nakresleno v programu ACD/ChemSketch podle Hakamatsuka *et al.*, 1990).

2.3.3. Modelace IFS

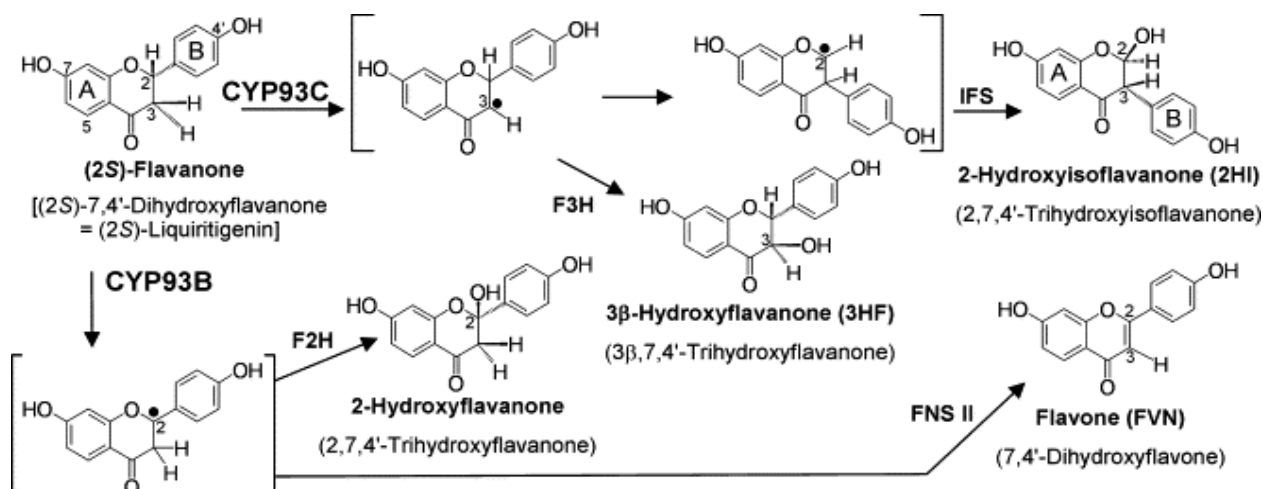
Sawada *et al.* se zaměřili na identifikaci aminokyselinových zbytků zodpovědných za výše popsanou migraci arylu, která představuje novou kategorii reakcí katalyzovaných cytochromem P450, resp. proteiny z podrodiny CYP93C.

Na základě již známé 3D struktury cytochromu P450BM3 z *Bacillus megaterium* (Ravichandran *et al.*, 1993), jež byla odhalena rentgenovou krystalografií, a pomocí alignmentu s několika dalšími proteiny z rodiny CYP93 zkonstruovali *in silico* homologní 3D model CYP93C2. Několik klíčových aminokyselinových zbytků IFS pak bylo identifikováno zakotvením (2S)- liquiritigeninu do modelované struktury CYP93C2 (viz Obr. 7).



Obr. 7: *In silico* generovaná 3D-struktura aktivního místa CYP93C2 s navázaným liquiritigeninem (žlutě). (Převzato od Sawada *et al.*, 2002)

Vlastní výzkum klíčových aminokyselin byl založen na tvorbě proteinových mutantů exprimovaných v heterologním kvasinkovém systému. S (2S)-liquiritigeninem jako substrátem produkoval divoký typ enzymu 2,7,4'-trihydroxyisoflavanon a vedlejší produkt 3,7,4'-trihydroxyflavanon v poměru 92:8. V případě mutantu, u něhož byla provedena bodová mutace výměny Ser 310 v centru I-helixu za Thr, byly produkovány 2,7,4'-trihydroxyisoflavanon, 3,7,4'-trihydroxyflavanon a 7,4'-dihydroxyflavon v poměru 57:36:7 v daném pořadí, podíl vedlejších produktů byl tedy signifikantně zvýšen. Při mutační výměně Lys 375 z konce β -listu 1-4 za Thr byl však produkován pouze 3,7,4'-trihydroxyflavanon, nikoliv isoflavan (Sawada *et al.*, 2002; viz Obr. 8).



Obr. 8: Reakce katalyzované CYP93C a CYP93B vedoucí k výše zmíněným produktům. Zkratky enzymů: IFS, isoflavanonsynthasa; FNS II, flavonsynthasa II; F2H, (2S)-flavanon2-hydroxylasa; F3H, flavanon3β-hydroxylasa (Převzato od Sawada *et al.*, 2005).

Z popsaného experimentu jasně vyplynulo, že Lys 375 proteinu CYP93C2 je esenciální pro migraci arylu na molekule flavanonu: ε-amino skupina Lys 375 je v těsné blízkosti (2S)-liquiritigeninu a může interagovat s jeho hydroxylovou skupinou na C-7, pravděpodobně tedy funguje jako kotva pro substrát. Role Ser 310 je však diskutabilní. Jeho přítomnost namísto Thr (ostatní proteiny z rodiny CYP93 mají na pozici 310 v centru I-helixu Thr a katalyzují četné reakce syntézy flavonoidů, nikoliv však isoflavonoidů) patrně spočívá v usnadnění přenosu arylu z C-2 na C-3 na molekule flavanonu, neboť poskytuje pro migraci větší prostor (Sawada *et al.*, 2002). Ve své rozšiřující práci z roku 2005 Sawada a Ayabe navíc uvádí, že Ser 310 umožňuje substrátu zaujmout správnou pozici v aktivním místě enzymu, aby mohlo dojít k přitahování vodíku na C-3 a stejný efekt na správné umístění substrátu předpokládají také u Leu 371 (Sawada a Ayabe, 2005).

Přesto Ser 310 ani Lys 375 (event. Leu 371) pravděpodobně nejsou jedinými aminokyselinovými zbytky zodpovědnými za inkriminovanou reakci v biosyntéze isoflavonoidů. Dokladem je bodový mutant CYP93B1 [(2S)-flavanon 2-hydroxylasa; Akashi *et al.*, 1998], u něhož byl Thr v centru I-helixu i β-listu 1-4 zaměněn za odpovídající Ser 310 a Lys 375 z CYP93C2. Tento mutantní protein neprokázal katalytickou aktivitu v migraci arylu ani v hydroxylaci C-3 flavanonového substrátu (Sawada *et al.*, 2002).

Kromě dalších aminokyselinových zbytků může být rovněž významným faktorem determinujícím činnost enzymu jeho celková konformace (Sawada *et al.*, 2002).

2.3.4. Geny kódující IFS

Schopnost některých rostlinných taxonů produkovat isoflavonoidy je dána přítomností isoflavanonsynthasy. Geny pro IFS pocházející ze 14 bobovitých rostlin a jednoho zástupce čeledi Chenopodiaceae – řepy (*Beta vulgaris*) byly identifikovány, klonovány, sekvenovány a zařazeny do databáze GenBank na NCBI. V současnosti databáze GenBank a P450 Database Dr. Davida Nelsona obsahují 33 sekvencí genů pro IFS (CYP93C) z leguminóz a řepy, z toho 19 kompletních CDS a 14 částečných CDS, navíc byly do GenBank zařazeny také sekvence promotorů genů *IFS1* a *IFS2* (viz dále) ze sóji (*Glycine max*). Většina těchto sekvencí vykazuje identitu 96-99%. U ostatních taxonů produkujících isoflavonoidy (viz kap. 2.2.2.) se však dosud

o genetickém pozadí syntézy neví takřka nic. Další výzkum je navíc nezbytný také v otázce transkripčních a posttranskripčních regulací biosyntézy isoflavonoidů.

Jung *et al.* provedli rozsáhlý screening sojových ESTs kódujících cytochrom P450 a za využití kvasinkového expresního systému identifikovali dva geny pro IFS – *IFS1* a *IFS2* (Jung *et al.*, 2000).

Na základě alignmentu bylo zjištěno, že nukleotidová sekvence kódující oblasti *IFS1* má 92,5% podobnost se sekvencí sojového cytochromu P450 *CYP93C1* (GenBank), kódované proteiny pak vykazují 96,7% podobnost ve svých aminokyselinových sekvencích. Oba geny *IFS1* i *IFS2* obsahují v místě kodonu pro aminokyselinu 300 jednoduchý intron dlouhý 218bp v případě *IFS1* a 135bp v případě *IFS2*. Sekvence tohoto intronu mají 46% podobnost. Oba produkty genů *IFS1* a *IFS2* konvertují naringenin na genistein a liquiritigenin na daidzein v NADPH dependentním systému, přičemž obě isoformy enzymu vykazují přibližně o 50% vyšší substrátovou preferenci pro liquiritigenin. (Jung *et al.*, 2000).

S využitím získaných znalostí o *IFS* Jung *et al.* následně izolovali homologní geny z jetele lučního a plazivého (*Trifolium pratense* a *T. repens*), vikve (*Vicia villosa*), *Vigna radiata*, vojtěšky (*Medicago sativa*), čočky (*Lens culinaris*), hrachu (*Pisum sativum ssp. sativum convar. Axiphium*), bobu (*Lupinus sp.*) a řepy (*Beta vulgaris*). Úspěchu bylo dosaženo také při expresi sojové isoflavonsynthasy v neproducentských rostlinách huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*), tabáku (*Nicotiana tabacum*), kukuřici (*Zea mays*) a rýži (*Oryza sativa*), v nichž byl po transgenozí detekován pomocí HPLC a GC-MS isoflavon genistein a také jeho glykosylované formy (Jung *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000; Sreevidya *et al.*, 2006).

Od nalezení genu pro IFS v genomu v řepy (Jung *et al.*, 2000) se jediná zmínka o *IFS* mimo čeleď Fabaceae objevila jako abstrakt na Konferenci experimentální biologie rostlin v Olomouci v roce 2007. V rámci výzkumu prováděném na Ústavu experimentální botaniky AV ČR se Koblovské *et al.* podařilo pomocí PCR s degenerovanými primery objevit částečnou sekvenci genů pro IFS v genomu konopí (*Cannabis sativa*, Cannabaceae) a chmele (*Humulus lupulus*, Cannabaceae). Získané PCR fragmenty měly průměrnou délku 700 bp a vykazovaly relativně vysoký stupeň homologie s dosud známými sekvencemi pro IFS pocházejícími z bobovitých rostlin (Koblovská *et al.*, 2007).

2.3.5. Evoluční původ IFS

Z evolučního hlediska musela katalytická aktivita IFS vzniknout vzácnou přínosnou mutací pradávného genu pro CYP93 a přetrvávala a stala se dominantní v současných

producentů rostlin díky významným ekofyziologickým výhodám, které těmto rostlinám přinesla (Stafford, 2000, citováno dle Sawada *et al.*, 2002). Sawada *et al.* vyslovili hypotézu, v níž za evolučního předka IFS považují flavanon3 β -hydroxylasu typu P450, jejíž činností vzniká vedlejší produkt 3-hydroxyflavanon (druhý typ tohoto enzymu je 2-oxoglutarát dependentní dioxygenasa účastnící se biosyntézy anthokyanů a flavonolů; Sawada *et al.*, 2002). Rovněž nelze vyloučit, že se schopnost produkovat isoflavonoidy vyvinula ve fylogenezi vyšších rostlin několikrát nezávisle na sobě (Lapčík *et al.*, 2005).

2.4. VÝZNAM ISOFLAVONOIDŮ V ROSTLINNÉ FYZIOLOGII

2.4.1. Fytoalexiny a fytoanticipiny

Pro svou antimikrobiální aktivitu byly isoflavonoidy zařazeny fytopatologové do skupiny více než 300 různých nízkomolekulárních látek známých jako fytoalexiny, které jsou syntetizovány bobovitými i některými nebobovitými rostlinami (viz kapitola 2.2.2.) *de novo* v přímé odpovědi na napadení patogenem či v podmínkách abiotického stresu (těžké kovy, UV, herbicidy). Řada isoflavonoidů zároveň náleží do další skupiny obranných nízkomolekulárních

látek – tzv. fytoanticipinů, jež jsou přítomny *in vivo* v rostlině i v nepřítomnosti patogena (Reynaud *et al.*, 2005; Vanetten *et al.*, 1994). Některé isoflavonoidy jsou rovněž známy pro svou insekticidní aktivitu (především rotenonoidy) a jako insekticidy využívány v praxi (nejvýznamnější rotenon). Vedle isoflavonoidů byla charakterizována řada neflavonoidních fytoalexinů, např. diterpeny, seskviterpeny, benzofurany či furanoacetyleny; z hlediska biosyntézy, enzymologie a molekulární biologie však zůstávají isoflavonoidy nejlépe prostudovanou skupinou fytoalexinů (Dixon *et al.*, 1995; Dakora a Phillips, 1996). Biosyntetické dráhy vedoucí k isoflavonoidním fytoalexinům jsou důležitým potenciálním nástrojem genového a metabolického inženýrství pro zefektivnění antimikrobiální obrany rostlin.

Isoflavonoidy jsou produkovány a využívány k obraně proti virům, bakteriím, houbám a hlísticím především bobovitými rostlinami (viz Tab. 2). Mezi nebobovitými rostlinami bylo zaznamenáno několik případů výskytu isoflavonoidních fytoalexinů (např. v kostci *Iris pseudacorus*; Hanawa *et al.* 1991).

K největší akumulaci isoflavonoidů dochází ve zdravých semenech, kořenech a prýtech a v jakémkoliv orgánu napadeném patogenem (Dakora a Phillips, 1996). U sóji byla zjištěna značná množství genisteinu, daidzeinu a jejich glykosidických konjugátů v embryích, dělohách, hypokotylu a prvních koříncích (Graham, 1991), přičemž k syntéze isoflavonoidů zde dochází *de novo* (Dhaubhadel *et al.*, 2004). Isoflavonoidy jsou rovněž produkovány buňkami kořenové čepičky a uvolňovány v kořenových exudátech do půdy (Dakora a Phillips, 1996).

Patogen	Rostlina (<i>Fabaceae</i>)	Fytoalexin
Houby (<i>Fungi</i>)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	fazeollin kieviton kumestrol
	<i>Pisum sativum</i>	pisatin
	<i>Vigna unguiculata</i>	medikarpin kumestrol daidzein
	<i>Vicia faba</i>	medikarpin
	<i>Medicago sativa</i>	kumestrol formononetin daidzein
Bakterie	<i>Phaseolus vulgaris</i>	kumestrol kieviton

	<i>Glycine max</i>	kumestrol daidzein glyceollin
Viry	<i>Vigna unguiculata</i>	kievito
	<i>Pisum sativum</i>	pisatin
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	fazeollin kievito
Hlístice (<i>Nematoda</i>)	<i>Phaseolus lunatus</i>	kumestrol
	<i>Glycine max</i>	glyceollin

Tab. 2: Významní zástupci isoflavonoidních fytoalexinů ve vybraných bobovitých rostlinách (Podle Dakora a Phillips, 1996).

O buněčné lokalizaci isoflavonoidů se dosud ví relativně málo. Na základě znalostí o buněčné kompartmentaci jiných flavonoidů, především anthokyanů, lze usuzovat, že enzymy vázané na endoplasmatické retikulum uvolňují nově syntetizované isoflavonoidy a jejich konjugáty do veziklů. Tyto vezikly následně fúzíjí buď s tonoplastem vakuoly*, obsahují-li fytoanticipiny, nebo s plasmatickou membránou, obsahují-li fytoalexiny. V daném modelu tedy neznámý membránový přenašeč determinuje osud strukturně identických molekul. V souladu s konceptem fytoalexinů a fytoanticipinů se jako hlavním faktorem v celém procesu jeví fakt, že identické molekuly mohou sloužit různým účelům díky uvolňování s různým načasováním a/nebo v různých koncentracích (Dakora a Phillips, 1996).

* Na modelovém systému s tonoplastovými vezikly bylo demonstrováno, že jsou isoflavonoidy transportovány do vakuoly také jako konjugáty s glutathionem pomocí MgATP-dependentní pumpy, a to 4-krát větší rychlostí než v nekonjugované formě bez přenašeče (Li *et al.*, 1997).

Je dosti pravděpodobné, že ve větších množstvích mají kontinuálně uvolňované isoflavonoidy účinky fytoanticipinů, zatímco nízké koncentrace těchto sloučenin působí dlouho známým a zdánlivě opačným efektem: jako atraktanty symbiotických bakterií (viz dále kap. 2.4.2.; Dakora a Phillips, 1996). Kromě toho hrají isoflavonoidy patrně také roli v zajištění integrity rostlinných tkání a orgánů jakožto mezibuněčné signální molekuly (Dakora a Phillips, 1996).

Vznik fytoalexinů je obecně aktivován na úrovni transkripce genů kódujících enzymy nezbytné k jejich syntéze, a to v buňkách sousedících s buňkami napadenými patogenem (Pavlová, scriptum PřF UK, 2005). Je-li v našem případě rostlina vystavena patogenu, dochází k výraznému posílení transkripce genů fenylypropanoidové dráhy (především pro

phenylalaninamoniaklyasu, PAL) a její flavonoidní větve (hlavně pro chalkonsynthasu, CHS), tedy genů kódujících enzymy, které předcházejí v dané anaboličské dráze vznik isoflavonoidů. Vzhledem k tomu, že jsou tyto klíčové enzymy kódovány geny z multigenních rodin, zůstává v problematice řada nejasností především v regulaci syntézy. Např. u vojtěšky (*Medicago sativa*) jsou geny pro PAL a CHS za normálních okolností transkribovány v menší míře (patrně pro udržování základní hladiny fytoanticipinů), ale různé kopie těchto genů jsou indukovány patogenem *Phoma medicaginis* a symbiotickou bakterií *Rhizobium meliloti* (Junghans *et al.*, 1993; Savouré *et al.*, 1994; Dakora a Phillips, 1996).

V nejranějších fázích interakcí mezi rostlinou a mikrobem (nejčastěji) jsou zapojeny mikrobiální produkty – elicitory, které slouží jako signál pro následnou produkci isoflavonoidů. Stejný efekt má také abiotický stres, zvláště pak příliš nízké či vysoké hladiny esenciálních minerálních látek (dusík, fosfor, síra, vápník), přítomnost FeSO_4 , CuCl_2 , HgCl_2 , AgNO_3 , jodoacetátu, detergentu TX-100, ethylenu, přílišné osvětlení či UV záření. Mechanismus působení těchto stresorů však zůstává nejasný (Dakora a Phillips, 1996).

Biotické elicitory jsou nejčastěji sacharidy a v menší míře i proteiny a lipidy pocházející z buněčných stěn patogenních mikrobů. Rovněž napadená rostlina produkuje sacharidové elicitory stěnového původu, aby vyvolala produkci isoflavonoidů. Například sója v reakci na napadení produkuje polysacharid oligo- α -1,4-galakturonid, což indukuje vznik fytoalexinu glyceollinu (Dakora a Phillips, 1996). Toxicita glyceollinu spočívá v jeho schopnosti inhibovat bakteriální H^+ ATPasy na plasmatické membráně a/nebo NADH-ubichinonoxidoreduktasu (Boydston *et al.*, 1983; Giannini *et al.*, 1988).

Do problematiky vnáší řadu nejasností zjištění, že některé identické či paralelní metabolické dráhy jsou aktivovány jak patogenem, tak symbiotickými bakteriemi rodu *Rhizobium* a *Bradyrhizobium* (viz dále kap. 2.4.2.). Zda se jejich elicitorové molekuly váží na stejný rostlinný receptor jako elicitory patogenů však dosud není známo (Dakora a Phillips, 1996). Typickým příkladem složitosti celého procesu je symbiotický vztah sóji s *Bradyrhizobium japonicum*. Daná bakterie, vyvolávající u sóji tvorbu kořenových nodulů, produkuje dvě formy elicitorů: cyklický β -1,3-1,6-glukan, který stimuluje sóju k biosyntéze fytoalexinu glyceollinu, a glukosamin Nod faktor (viz kap. 2.4.2.), který spouští u sóji produkci daidzeinu, genisteinu a kumestrolu, avšak nikoliv glyceollinu. Hostitelská sója tedy musí rozpoznat dva odlišné typy elicitorů pocházející od jejího mikrosymbionta a adekvátně reagovat produkcí různých isoflavonoidních fytoalexinů (Dakora a Phillips, 1996).

Konjugáty isoflavonoidů jsou transportovány z kořene, v němž tvoří hlavní zásobní pool, do prýtu xylémem. Tato skutečnost by mohla vypovídat o spojitosti mezi isoflavonoidy a

získanou systemickou rezistencí (SAR). U bobovitých rostlin nastupuje SAR po infekci patogenem a vývoji této rezistence předchází zvýšená produkce isoflavonoidních fytoalexinů. Jisté je, že rostliny vyvinuly rozličné obranné mechanismy, které jsou vzájemně propojeny složitými signálními drahami (Dakora a Phillips, 1996). Úkolem budoucích studií je prokázat, že se isoflavonoidy uplatňují také jako integrující signální molekuly, a tím podtrhnout jejich význam v životě rostlin.

2.4.2. Isoflavonoidy a rhizobiální symbiosa

Poněkud v rozporu s fytoalexinovým konceptem bylo odhalení, že isoflavonoidy zastávají významnou úlohu v navozování symbiotického vztahu mezi rostlinami z čeledi bobovité (Fabaceae) a diazotrofními aerobními bakteriemi ze skupiny označované jako rhizobia (rody *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* aj.). Tyto bakterie syntetizují enzym nitrogenasu katalyzující redukci vzdušného dusíku na amonné kationty, tedy formu přijatelnou pro rostliny (Broughton *et al.*, 2000, Spaink, 2000). Mezi rostliny, u nichž byly popsány a izolovány isoflavonoidy jakožto induktory rhizobiálních *nod* genů, patří sója (*Glycine max*), fazol (*Phaseolus vulgaris*) a *Vigna unguiculata* (viz Tab. 3).

Rhizobiální symbiosa má značný hospodářský význam, neboť v souladu se současným trendem trvale udržitelného zemědělství snižuje nároky luskovin na hnojení dusíkatými hnojivy a rovněž činí z luskovin ideální předplodinu zvyšující úrodnost půdy.

Hostitelská rostlina (Fabaceae)	Druh rhizobia	Isoflavonoid
<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	daidzein genistein kumestrol genistein-7- <i>O</i> -glukosid genistein-7- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -malonylglukosid) daidzein-7- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -malonylglukosid)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , <i>R. etli</i> , <i>R. tropici</i>	daidzein genistein kumestrol isoliquiritigenin*

		liquiritigen* naringenin*
<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Rhizobium</i> spp.	daidzein genistein kumestrol

*isoliquiritigenin – chalkon, liquiritigenin a naringenin – flavanony, prekurzory isoflavonoidů

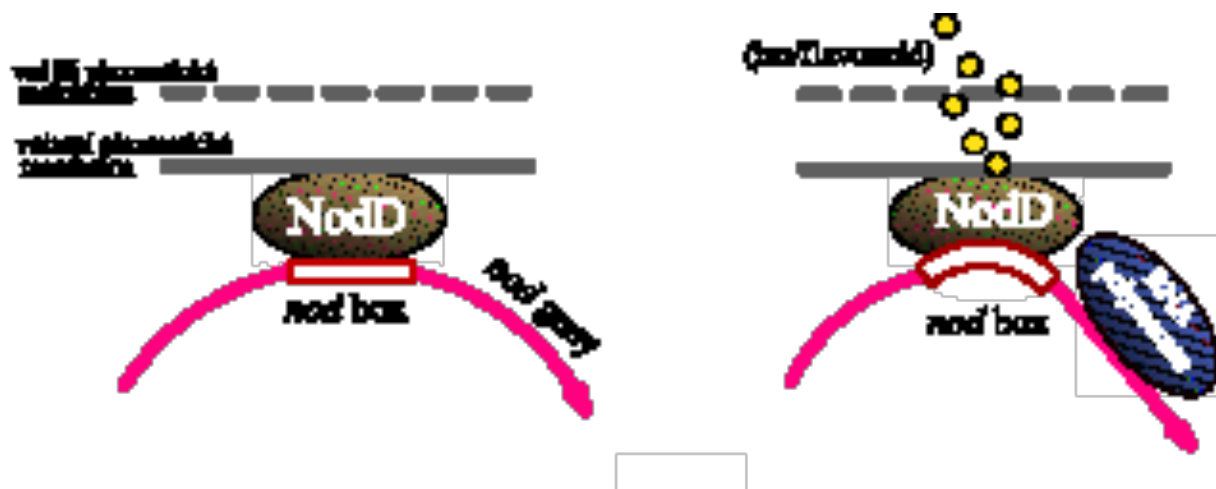
Tab. 3: Isoflavonoidní induktory rhizobiálních *nod* genů u vybraných bobovitých rostlin (Podle Cooper, 2004).

Proces navozování symbiosy zahrnuje počáteční signalizaci mezi rostlinou a s ní kompatibilním typem rhizobia, rozpoznávání partnerů, vstup bakterie do kořenového vlásku, vznik infekčního vlákna a vytváření kořenových hlízek nezbytných pro fixaci vzdušného dusíku. Flavonoidy a isoflavonoidy (dále jen iso/flavonoidy) produkované rostlinnými kořeny fungují jako chemoatraktanty pro rhizobia a indukují expresi bakteriálních nodulačních genů (*nod*). Indukce vede k produkci Nod faktorů, modifikovaných *N*-acetylglukosaminů (chitolipooligosacharidů), které pozitivní zpětnou vazbou vyvolávají tvorbu nodulů na kořenových vláscích dané bobovité rostliny a další produkci iso/flavonoidů v mladé diferenciací zóně kořene (princip aktivity elicitorů; Sreevidya *et al.*, 2006; Subramanian *et al.*, 2006).

Aktivace nodulačních genů, jejichž produkty jsou nezbytné pro syntézu Nod faktoru, je zprostředkována proteiny NodD patřícími do rodiny transkripčních regulátorů LysR (Feng *et al.*, 2003). NodD se váže v nepřítomnosti iso/flavonoidních a jiných induktorů na konzervovanou sekvenci DNA nazvanou *nod* box nacházející se v oblasti promotoru inducibilních nodulačních genů (Fisher a Long, 1993). V přítomnosti vhodných rostlinných iso/flavonoidů a NodD proteinu jsou tyto geny transkribovány. Pouze NodD1 ze tří známých NodD proteinů funguje jako receptor iso/flavonoidů. Sója uvolňuje v exudátech isoflavonoidy genistein a daidzein, které indukují v *B. japonicum* *nodYABCSUIJ* operon. Kromě těchto *nod* genů má *B. japonicum* dva vzdálenější geny *nodVW*, které jsou spolu s *nodD* zapojeny v regulaci syntézy Nod faktoru v přítomnosti isoflavonoidních induktorů (Cooper, 2004).

V otázce interakcí NodD proteinu a iso/flavonoidů dosud neexistuje přímý důkaz jejich fyzického kontaktu, ačkoliv již mnoho let zůstává u představy, že iso/flavonoidy vytváří s NodD komplex, což vyvolá konformační změnu na vazebných místech *nod* boxu a následnou aktivaci transkripce. NodD je ukotven jako tetramer na dvou vazebných místech promotoru nodulačního genu v oblasti od -75 do -20 bp od iniciačního místa transkripce a zahrnuje tak téměř celý *nod* box. Předpokládá se, že v nepřítomnosti iso/flavonoidů způsobuje tato interakce ohyb DNA v místě promotoru *nod* genu (Feng *et al.*, 2003). Iso/flavonoidní koinduktor interaguje s NodD

dosud nedefinovaným způsobem a vyvolá tak relaxaci příslušného úseku DNA, což umožní RNA polymeráze iniciaci transkripce (Hu *et al.*, 2000; viz Obr. 9).



Obr. 9: Model regulace transkripce *nod* genů u rhizobií. (Nakresleno v programu ACD/ChemSketch podle Chovanec, Diplomová práce PřF UK, 2001).

Testování více než 1000 flavonoidů (včetně isoflavonoidů) vedlo k závěru, že hydroxylace na pozici C-7 ve struktuře iso/flavonoidu, bez ohledu na další OH- substituce, je společným rysem všech sloučenin, které mají indukční či inhibiční aktivitu v mnoha různých rhizobiích (Cunningham *et al.*, 1991). Rhizobia s užším hostitelským spektrem vyžadují specifičtější substituce iso/flavonoidního skeletu, aby zajistily jeho správnou interakci s NodD.

Kombinací induktorů se často jejich efekt na produkci Nod faktorů výrazně zesiluje. Synergický efekt liquiritigeninu či isoliquiritigeninu s daidzeinem byl pozorován u *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Bolanos-Vasquez a Werner, 1997). Zároveň bylo zjištěno, že flavonoidy a isoflavonoidy, které fungují pro určitá rhizobia jako induktory mohou být anti-induktory pro jiná: isoflavony genistein a daidzein stimulují expresi *nod* genů u *Bradyrhizobium japonicum* a širokospektrých *Rhizobium* sp., ale naopak zabráňují expresi u *R. leguminosarum* bv. *trifolii* a *viciae*. Ekologický význam anti-induktorů zůstává nejasný (Cooper, 2004). Některé iso/flavonoidy v kořenových exudátech mají v symbiotické komunikaci dvojí funkci: daidzein, genistein a isoliquiritigenin indukují expresi *nod* genů a zároveň také rezistenci k sójovému fytoalexinu glyceollinu (isoflavonoid – pterokarpan) u *Bradyrhizobium japonicum* (Kape *et al.*, 1992; Parniske *et al.*, 1991). Kromě toho se isoflavon genistein uplatňuje jako induktor bakteriálních genů *gunA2* kódujícího celulasu a *pgl* kódujícího polygalakturonasu. Vyjmenované enzymy jsou nezbytné pro lokalizovanou degradaci buněčné stěny kořenového vlásku a umožnění vstupu rhizobia (Baumberger *et al.*, 2003).

Isoflavonoidy mají rovněž schopnost ovlivňovat koncentraci auxinu v kořeni. Umlčením sojového genu pro IFS využitím RNA interference byla prokázána role isoflavonoidů jakožto

endogenních regulátorů transportu auxinu v kořeni sóji a exprese auxinem inducibilních genů (Subramanian *et al.*, 2006).

Vzhledem k tomu, že sekrece isoflavonoidů je prvním krokem v interakcích mezi leguminózou a rhizobiem, přenesl Sreevidya sojový gen pro isoflavonsynthasu do rýže (*Oryza sativa* L. R86, *Poaceae*) s cílem determinovat její schopnost produkce isoflavonoidů z flavanonů (zde genisteinu z naringeninu) a navodit tak rhizobiální symbiosu. Analýza *S35-IFS* transgenní rýže potvrdila přítomnost genisteinu, a to v glykosidické formě, což dosvědčilo schopnost endogenních glykosyltransferáz rozpoznat genistein jako substrát. Následné studie prokázaly, že extrakty z kořenů i listů transgenní rýže byly díky přítomnosti genisteinu schopny stimulovat expresi *nod* genů v různých rhizobiích (Sreevidya *et al.*, 2006). Vznik nodulující rýže a dalších nodulujících nebobovitých rostlin významných ve výživě však nadále zůstává předmětem intenzivního snažení mnoha světových laboratoří a výzvou pro metabolické inženýrství.

2.5. DIETETICKÝ A FARMAKOLOGICKÝ VÝZNAM ISOFLAVONOIDŮ

2.5.1. Chemopreventivní vlastnosti isoflavonoidů

Vedle nepopiratelného významu pro rostliny samotné jsou v současnosti rostlinné isoflavonoidy považovány za nesmírně hodnotné, pro člověka i jiné savce zdraví prospěšné sloučeniny a těší se stále rostoucímu zájmu humánní medicíny. Řadou studií bylo prokázáno, že isoflavonoidy hrají důležitou roli v prevenci rakoviny prsu, prostaty a tlustého střeva, kardiovaskulárních onemocnění, osteoporózy a zmírňují menopauzální symptomy (Corwell *et*

al., 2004). I přes rozporuplnost publikovaných dat je zřejmá spojitost mezi konzumací na isoflavonoidy bohaté stravy a sníženým rizikem rakoviny (Ososki a Kennelly, 2003 a další). Kupříkladu asijská populace, jež je známa málo častým výskytem rakoviny prsu a prostaty, konzumuje denně 20-80 mg isoflavonoidu genisteinu pocházejícího převážně ze sóji, zatímco ve Spojených státech je denní příjem genisteinu odhadován na 1-3 mg denně (Tham *et al.*, 1998). Doložený zvýšený výskyt rakoviny prostaty v několika asijských zemích v období 1978-1997 je považován za důsledek přejímání západního životního stylu včetně stravování (např. Singapur; Sim a Cheng, 2005).

Mnohé polyfenolické látky, mezi nimi rovněž isoflavonoidy, mají vlastnosti antioxidantů a modulátorů enzymů (Sakakibara *et al.*, 2003). Potlačují oxidaci LDL (low-density lipoproteins), čímž snižují riziko cévních onemocnění, a vystupují jako agonisté nebo antagonisté receptorů zapojených v kancerogenezi, jako je např. EGF (Epidermal growth factor) či β -estrogenový receptor (fytoestrogenní aktivita isoflavonoidů viz dále kap. 2.5.2). Modulují sekreci cytokinů, čímž regulují buněčný cyklus, a expresi tyrozinových proteinkináz (PTKs) při proliferaci nádorových buněk. Dále indukují expresi antikancerogenních enzymů či naopak inhibují enzymy podporující vznik nádorů a prokazují antialergické a vasodilatační účinky (Sakakibara *et al.*, 2003). Genistein podávaný krysím samicím snížil jejich náchylnost k rakovině mléčných žláz a napomohl jim předejít řidnutí kostí způsobenému nedostatkem estrogenů (Dixon a Steele, 1999). Isoflavonoidy (především genistein a daidzein) a některé jejich metabolity (např. equol) prokázaly inhibiční účinky na mnohé enzymy, jmenovitě aromatasu, 5- α -reduktasu, 7- α -hydroxylasu, dehydrogenasu 3 β -hydroxysteroidů a 17 β -hydroxysteroidů a další (Lapčík, 2004).

Spolu s ostatními flavonoidy a karotenoidy, hojně se vyskytujícími v ovoci, zelenině a bylinách, fungují isoflavonoidy díky své antioxidační aktivitě jako inhibitory při peroxidaci lipidů (LPO), jež je indukována reaktivními formami kyslíku (ROS; Toda a Shirataki, 1999). LPO je příčinou řady onemocnění, např. arteriosklerózy, diabetu, halotanové hepatotoxicity a jaterních poruch (Toda a Shirataki, 1999). Vedle běžných antioxidantů přítomných v lidském organismu (např. glutation, superoxiddismutasa, katalasa) byl prokázán inhibiční efekt přírodních isoflavonoidů biochaninuA, formononetinu, daidzeinu a genisteinu na peroxidaci lecitinu, která je spouštěna hydroxylovými radikály a superoxidovými anionty (Toda a Shirataki, 1999). Díky schopnosti ovlivňovat biofyzikální vlastnosti membrány byly některé isoflavonoidy odhaleny také jako inhibitory ABC transportéru MRP1 (multidrug resistance transporter; Lania-Pietrzak *et al.*, 2005)

Na druhou stranu byly popsány nežádoucí inaktivační účinky isoflavonoidů na lidskou thyroidální peroxidasu (TPO), enzym, který inkorporuje jód do thyreoglobulinu (prekurzor

thyroidních hormonů; Doerge a Sheehan, 2002, Lapčík, 2004). Tento inhibiční efekt je způsoben kovalentní vazbou isoflavonoidu (zkoumáno na daidzeinu a genisteinu) v aktivním místě dané peroxidasy (stejný princip při inhibici LPO) a projevuje se jako hypothyreosa při nedostatku jódu (tzv. goitrogenní efekt; Doerge a Sheehan, 2002).

Vedle hlavních isoflavonoidních producentů – bobovitých rostlin – je známa také řada nebobovitých producentů využívaných v tradiční medicíně. Typickým příkladem je kosatec (*Iris potanini*), který se v mongolském lidovém léčitelství odnepaměti používá k léčbě bakteriálních infekcí, zánětů a dokonce rakoviny. Další nebobovité druhy rostlin známé značným obsahem isoflavonoidů slouží v tradiční medicíně v různých částech světa k léčbě žloutenky, venerických chorob a odstraňování ledvinových a jaterních kaménků (Reynaud *et al.*, 2005).

2.5.2. Phytoestrogeny

Mnohé z účinků, o nichž bylo pojednáno v předchozí kapitole, souvisely s jednou z typických vlastností isoflavonoidů: phytoestrogenní aktivitou. Phytoestrogeny jsou obecně chápány jako přirozeně se vyskytující nesteroidní sloučeniny produkované rostlinami a napodobující strukturně i funkčně estrogeny savců. Mezi phytoestrogeny byly zařazeny také další rostlinné metabolity z jednotlivých větví fenyylpropanoidové dráhy, např. lignany, chalkony, stilbeny a prenylflavonoidy (Ososki a Kennelly, 2003).

Pohlavní hormony estrogeny ovlivňují růst a funkci samčích i samičích reprodukčních orgánů, kostí, centrálního nervového systému, kardiovaskulárního systému apod. V období menopauzy hladiny estrogenů u žen prudce klesají, což je doprovázeno řadou nepříjemných symptomů, např. osteoporózou, návaly horka, změnami v sekreci vaginální sliznice či zvýšeného rizika kardiovaskulárních onemocnění. Pro prevenci či zmírnění těchto komplikací podstupuje značná část žen tzv. hormonální (estrogenovou) substituční léčbu (HRT, Hormone replacement therapy), u níž však byly mnohými studiemi prokázány nežádoucí vedlejší účinky, včetně zvýšeného rizika rakoviny prsu (Cornwell *et al.*, 2004).

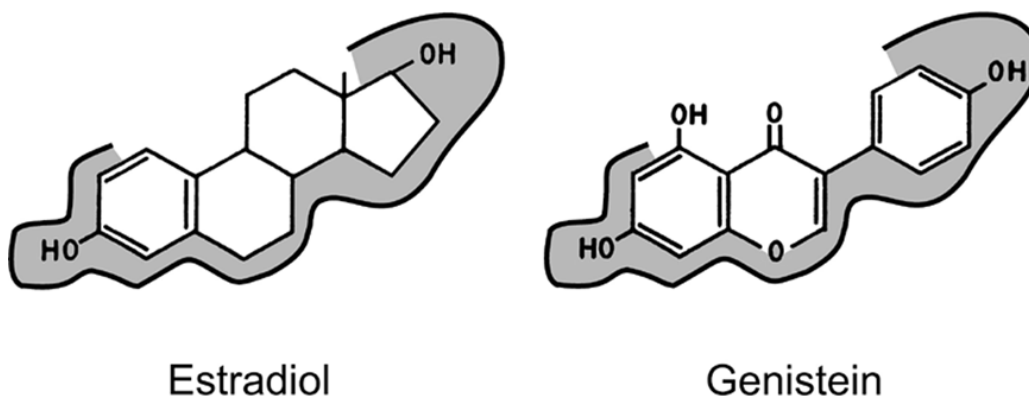
V posledních dvaceti letech se proto úsilí zaměřilo na hledání méně riskantní alternativy a právě přírodní phytoestrogeny se ukázaly být potenciálně vhodným řešením. Tématem phytoestrogenů se zabývá nepřehledné množství literatury a bylo mnohokrát doloženo, že jejich příjem se pozitivně odráží na metabolismu kostí, metabolismu tuků a cholesterolu, snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění, osteoporózy a hormonálně závislých typů rakoviny, hlavně prsu, dělohy, prostaty a tlustého střeva (Ososki a Kennelly, 2003). Rozsáhle jsou však diskutována i potenciální rizika spojená s konzumací phytoestrogenů.

K objevu estrogenní aktivity isoflavonoidů přispěl výskyt tzv. jetelové nemoci u australských ovcí ve 40. letech 20. století (Benetts *et al.*, 1946; citováno dle Lapčík, 2004). Tyto ovce, jejichž dominantní potravou byl jetel (*Trifolium subterraneum*), trpěly poruchami reprodukčních orgánů a funkcí, především permanentní neplodností. Isoflavonoid kumestrol byl jako nový fytoestrogen poprvé izolován v roce 1957 z jetelů (*Trifolium repens* a *T. fragiferum*) a vojtěšky (*Medicago sativa*; Bickoff *et al.*, 1957, citováno dle Ososki a Kennelly, 2003).

V současnosti je známo více než 300 rostlin produkujících fytoestrogeny (Reynaud *et al.*, 2005). Patrně nejvýznamnějším producentem isoflavonoidních fytoestrogenů je sója (*Glycine max*) obsahující 50-300 mg především genisteinu, daidzeinu a jejich glykosidů na 100 g plodů, dále *Vigna* sp., cizrna (*Cicer* sp.), vojtěška (*Medicago sativa*) a jetel (*Trifolium* sp.; Lapčík, 2004). Mimo čeleď bobovitých rostlin byly isoflavonoidy (především daidzein a genistein) detekovány v množstvích 5-140 µg na 100 g suché hmotnosti v kosatci (*Iris* sp.), semenech sezamu (*Sesamum indicum*), slunečnice (*Helianthus* sp.) a máku (*Papaver* sp.), dále v červeném zeli, brokolici, kvěťáku (vše *Brassica oleracea* spp.) a další plodinách (Mazur a Adlercreutz, 1998; Ososki a Kennelly, 2003). Patrně z obilí ječmene (*Hordeum vulgare*) či samičích šištic chmele (*Humulus lupulus*) pocházejí nejvýznamnější isoflavonoidní fytoestrogeny daidzein, genistein, formononetin a biochanin A, jež byly v nízkých koncentracích (méně než 0,1 µM) objeveny v pivu (Lapčík *et al.*, 1998).

Rozličné biologické funkce fytoestrogenů vycházejí z jejich schopnosti vystupovat jako agonisté, napodobující endogenní estrogeny, i jako antagonisté, kteří blokují či jinak pozměňují funkci estrogenních receptorů a mají antiestrogenní účinky. Proto se také fytoestrogeny v literatuře označují jako selektivní modulátory estrogenních receptorů (SERMs; Brzezinsky a Debi, 1999).

Fytoestrogeny se váží na dva typy estrogenových receptorů: receptory α (ER α) a β (ER β). Tyto receptory se částečně liší svou distribucí v jednotlivých tkáních a afinitou k ligandům. K ER β , který se exprimuje především v lidských vaječnících, varlatech, slezině a brzlíku, mají některé fytoestrogeny větší vazebnou afinitu než k ER α , ovšem vykazují obecně nižší afinitu k oběma receptorům než 17 β -estradiol (strukturně nejbližší estrogen; Kuiper *et al.*, 1998; viz Obr. 10). Isoflavonoidy genistein a kumestrol mají větší vazebnou afinitu k ER β než kterýkoliv jiný fytoestrogen (Whitten a Naftolin, 1998)



Obr. 10: Porovnání struktury estrogenu estradiolu a fytoestrogenu genisteinu vázající se do estrogenního receptoru (Převzato od Demmig-Adams a McCauley, 2005).

Mechanismus působení fytoestrogenů na lidské zdraví je založen na jejich schopnosti interagovat s enzymy a receptory a díky své stabilní struktuře a nízké molekulové hmotnosti prostupovat buněčnými membránami. To jim umožňuje indukovat expresi specifických, na estrogenech závislých genů, pozměňovat strukturu estrogenních receptorů a regulovat jejich transkripci, interferovat s metabolismem steroidních hormonů a celou řadu dalších efektů na buněčné i molekulární úrovni (Ososki a Kennelly, 2003). Předpokládanými mechanismy, jimiž inhibují nádorové buňky, jsou inhibice DNA topoizomerasy, suprese angiogeneze, indukce diferenciacie rakovinných buněčných linií a indukce apoptózy (Glazier a Bowman, 2001).

O nežádoucích účincích fytoestrogenů a potenciálních zdravotních rizicích spojených s jejich konzumací jsou v literatuře dostupná rozporuplná data. Konečný efekt fytoestrogenů závisí na mnoha faktorech, jako např. způsobu podání, koncentraci a dávce, individuálním metabolismu, interakcích s jinými farmaky, cílové tkáni, typu receptorů a v neposlední řadě jsou účinky fytoestrogenů ovlivněny hladinou endogenních estrogenů (Ososki a Kennelly, 2003). Kupříkladu v *in vitro* systému stimuluje genistein ve fyziologických dávkách 100nM/l až 1μM/l proliferaci savčích rakovinných buněk. V přítomnosti fyziologického množství estrogenu 17β-estradiolu naopak buněčnou proliferaci lehce inhibuje a v dávkách větších než 10 μM/l proliferaci inhibuje výrazně, pravěpodobně inaktivací tyrozinkinázové aktivity receptorů růstového faktoru (This *et al.*, 2001). *In vivo* studie prováděné na myším modelu a ženách i mužích jsou však svými závěry velmi nejednoznačné a nekonzistentní a celá problematika žádoucích a nežádoucích účinků fytoestrogenů vyžaduje zcela nezbytně další studium.

I přes řadu nepopíratelných důkazů pozitivního efektu isoflavonoidních fytoestrogenů na lidské zdraví, zůstává v dané problematice mnoho otázek. Další výzkum se proto musí zaměřit především na určení prospěšných a škodlivých dávek, rozdílné odpovědi na fytoestrogeny u žen

a mužů, na rozdílné účinky chemicky odlišných fytoestrogenů a na jejich synergický či a antagonický efekt s jinými faktory (Ososki a Kennelly, 2003; Lapčík, 2004).

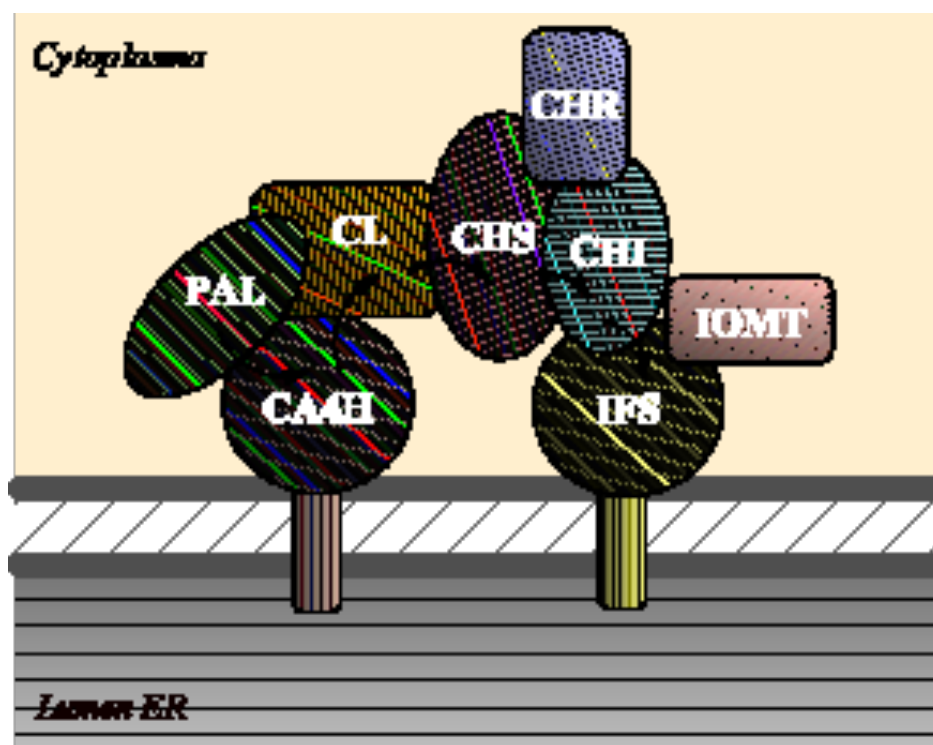
2.5. METABOLICKÉ INŽENÝRSTVÍ BIOSYNTÉZY ISOFLAVONOIDŮ V NEBOBOVITÝCH ROSTLINÁCH

Díky svým rozličným biologickým funkcím se isoflavonoidy bobovitých rostlin staly předmětem intenzivního zájmu metabolického inženýrství, jehož snahy se zaměřují především na introdukci enzymů nezbytných v biosyntéze isoflavonoidů do hospodářsky významných rostlin, které náležejí do jiných čeledí. Kromě zvýšení nutriční hodnoty těchto rostlin by se posílila také jejich rezistence vůči patogenům a potenciálně by mohlo dojít i k interakcím se symbiotickými diazotrofními bakteriemi.

Esenciálním krokem v tomto procesu je heterologní exprese IFS, enzymu, který hraje klíčovou úlohu při vzniku isoflavonů z flavanonů, především pak z naringenu, který se běžně vyskytuje ve vyšších rostlinách. Jak bylo zmíněno dříve, Jung *et al.* exprimovali pod silným konstitutivním promotorem sojovou cDNA pro IFS v huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*, Brassicaceae). Podobné experimenty pak byly provedeny také na tabáku (*Nicotiana tabacum*, Solanaceae), kukuřici (*Zea mays*, Poaceae; Yu *et al.*, 2000) a rýži (*Oryza sativa*, Poaceae; Sreevidya *et al.*, 2006). Ve všech případech byla prokázána přítomnost genisteinu v glykosidické formě, ovšem nutno dodat, že jeho koncentrace byly 40-krát až 60-krát nižší než u sóji (Yu a McGonigle, 2005). Opakovaně bylo také demonstrováno, že IFS interaguje s dalšími enzymy fenyylpropanoidové dráhy a kritickým momentem při produkci genisteinu v *Arabidopsis* je kompetice IFS s dalšími enzymy o flavanonový substrát (Yu a McGonigle, 2005).

Yu a McGonigle navrhli na základě teorie tzv. metabolického „channelingu“ (angl. vytváření „kanálů“, tj. přímé interakce enzymů jedné metabolické dráhy) model metabolonu* pro enzymy zapojené v biosyntéze isoflavonoidů (viz Obr. 11). Otázkou do budoucna zůstává, jak je tento metabolon skutečně formován, jak spolu jednotlivé enzymy interagují a jak jsou regulovány interakce jednotlivých metabolických větví. Pochopení těchto procesů pak otevírá cestu metabolickému inženýrství biosyntézy nejen isoflavonoidů, ale také dalších rostlinných metabolitů z méně poznanych metabolických drah (Yu a McGonigle, 2005).

*Metabolony jsou dynamické makromolekulární komplexy, vytvořené kolokalizací enzymů určité metabolické dráhy v definovaném místě v buňce (Dixon a Steele, 1999).



Obr. 11: Model metabolonu biosyntetické dráhy vedoucí ke vzniku isoflavonoidů. Enzymy: PAL, fenylalaninamoniaklyasa; CA4H, 4-hydroxylasa kyseliny skořicové; CL, kumaroyl-CoA ligasa; CHS, chalkonsynthasa; CHI, chalkonisomerasa; CHR, chalkonredukta; IFS, isoflavonsynthasa; IOMT, isoflavanon *O*-methyltransferasa; šipky znázorňují tok metabolitů. (Nakresleno v programu ACD/ChemSketch podle Yu a McGonigle, 2005).

3. ZÁVĚR

Isoflavonoidy patří díky širokému spektru svých biologických účinků k intenzivně studovaným sekundárním metabolitům rostlin. Jejich hlavními producenty jsou rostliny z čeledi bobovitých (Fabaceae), ovšem stále rostoucí citlivost analytických metod umožňuje izolovat a identifikovat isoflavonoidy také z dalších rostlinných čeledí; v současnosti je známo 60 čeledí produkujících isoflavonoidy (včetně bobovitých rostlin), ale je dosti pravděpodobné, že počet producentů čeledí je ve skutečnosti větší. Dokonce nelze ani vyloučit, že jsou isoflavonoidy v menších či větších množstvích produkovány všemi vyššími rostlinami, ačkoliv, jsouce závislé na pokroku analytických metod, patrně nebudeme v nejbližší době schopni tuto odvážnou spekulaci prohlásit za fakt. Z genomického hlediska, nepřítomnost orthologu *IFS* bobovitých rostlin v genomech nebobovitých rostlin nemusí být jednoznačným důkazem nepřítomnosti isoflavonoidní dráhy, a naopak prokázaná přítomnost genu pro *IFS* ještě nezaručuje, že jsou tyto rostliny aktivními producenty isoflavonoidů.

Biosyntetická větev isoflavonoidů je téměř kompletně popsána na molekulární úrovni. Jednotlivé kroky biosyntézy, zúčastněné enzymy a geny, které tyto enzymy kódují, jsou známy. Díky tomu se tato metabolická dráha jeví jako velmi vhodná pro genové manipulace na různých biosyntetických stupních, včetně možnosti klonování příslušných genů a introdukce isoflavonoidů do mnoha zemědělsky významných plodin jako je pšenice, kukuřice či rýže, které přirozeně isoflavonoidy neprodukují. Tím by se potenciálně posílila schopnost rezistence těchto transgenních rostlin vůči infekcím a navíc zvýšila jejich nutriční hodnota (Dixon, 2005). Isoflavonoidy tak představují velkou výzvu pro metabolické inženýrství.

Přesto však zůstává ve světě isoflavonoidů řada nejasností. Jsme teprve na počátku v pochopení mechanismů, kterými je regulována biosyntéza isoflavonoidů, resp. exprese příslušných genů, a v objasnění struktury klíčového enzymu biosyntézy – isoflavonsynthasy. Zcela chybějí data o genetickém pozadí biosyntézy ve zmíněných nebobovitých rostlinách, u nichž byla přítomnost isoflavonoidů detekována (jedinou výjimkou je *Beta vulgaris*). Na buněčné úrovni pak zůstává nevyjasněna kompartmentace isoflavonoidů. Velkým nezodpovězeným tématem jsou nadále také prospěch a potenciální riziko spojené s konzumací isoflavonoidních fytoestrogenů, jejichž mnohokrát doložený pozitivní efekt na lidské zdraví musí být budoucími studiemi znovu potvrzen a interpretován s notnou dávkou opatrnosti.

Seznam použité literatury

- **Ahmad V.U., Iqbal S., Nawaz S.A., Choudhary M.I., Farooq U., Ali S.T., Ahmad A., Bader S., Kousar F., Arshad S., Tareen R.B. (2006):** Isolation of four new pterocarpanes from *Zygophyllum eurypterum* (Syn. *Z. atriplicoides*) with enzyme-inhibition properties. *Chem. Biodiversity* 3: 996–1003.
- **Akashi T., Aoki T., Ayabe S. (1999):** Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. *Plant Physiol.* 121: 821–828.
- **Akashi T., Sawada Y., Aoki T., Ayabe S. (2000):** New Scheme of the Biosynthesis of Formononetin Involving 2,7,4'-Trihydroxyisoflavanone but Not Daidzein as the Methyl Acceptor. *Biosci., Biotechnol., Biochem* 46: 2276-2279.
- **Ayabe S., Akashoi T. (2006):** Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochem. Rev.* 5: 271-282.
- **Baumberger I.C., Fraefel N., Göttfert M., Hennecke H. (2003):** New NodW- or NifA-Regulated *Bradyrhizobium japonicum* Genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16 (4): 342-351.
- **Boland M. a Donnelly D.M.X. (1998):** Isoflavonoids and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* 15(3): 241-260.
- **Bolanos-Vasquez M. a Werner D. (1997):** Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on *nod* Gene-Inducing Flavonoids in Root Exudates of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10 (3): 339-346.
- **Boydston R., Paxton J.D., Koeppe D.E. (1983):** Glyceollin: a site-specific inhibitor of electron transport in isolated soybean mitochondrion. *Plant Physiol.* 72: 151-155.
- **Broughton W.J., Jabbouri S., Perret X. (2000):** Keys to Symbiotic Harmony. *J. Bact.* 182(20): 5641-5652.
- **Brzezinski A. a Debi A. (1999):** Phytoestrogens: the 'natural' selective estrogen receptor modulators? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 85: 47–51.
- **Buchanan B.B., Gruissem W., Jones. R.L. (2002):** Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, 1304-1306.
- **Cooper E. J. (2004):** Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection *Adv. Bot. Res.* 41: 1–62.
- **Cornwell T., Cohick W, Raskin I. (2004):** Dietary phytoestrogens and health. *Phytochem.* 65: 995–1016.
- **Crombie L. (1984):** Rotenoids and their Biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 1: 1-19.
- **Cunningham S., Kollmeyer W.D., Stacey G. (1991):** Chemical control of interstrain competition for soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1886-1892.
- **Dakora F.D. and Phillips D.A. (1996):** Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49: 1-20.
- **Demmig-Adams B. a McCauley L. (2005):** Breast cancer, estrogen, soy genistein, and other dietary factors Towards an understanding of their mechanistic interactions. *Nutrition & Food Science* 35 (1): 35-42.
- **Dhaubhadel S., McGarvey B.D., Williams R., Gijzen M. (2003):** Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Mol. Biol.* 53(6): 733-743(11).
- **Dixon R.A, Harrison M.J, Paiva N.L. (1995):** The isoflavonoid phytoalexin pathway: from enzymes to genes to transcription factors. *Physiologia Plantarum* 93: 385-392.
- **Dixon R.A., Steele C.L. (1999):** Flavonoids and isoflavonoids-a gold mine for metabolic engineering. *Trends in plant science* 4 (10): 394-400.
- **Dixon R.A. (2005):** Engineering of plant natural products pathways. *Current opinion in Plant Biology* 8: 329-336.
- **Doerge D.R. a Sheehan D.M. (2002):** Goitrogenic and Estrogenic Activity of Soy Isoflavones. *Env. Health Prosp.* 110 (3): 349-353.
- **Feng J., Li Q., Hu H.-L., Chen X.-C., Hong G.-F. (2003):** Inactivation of the *nod* box distal half-site allows tetrameric NodD to activate *nodA* transcription in an inducer-independent manner. *Nucleic Acids Res.* 31(12): 3143-3156.
- **Fisher R.F. a Long S.R. (1993):** Interactions of NodD at the nod Box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. *J. Mol. Biol.* 233(3): 336-48.
- **Frank M. R., Deyneka J. M., Schuler M. A. (1996):** Cloning of Wound-Induced Cytochrome P450 Monooxygenases Expressed in Pea. *Plant physiol.* 110 (3): 1035-1046.
- **Gavaler J.S., Rosenblum E.R., Van Thiel D.H., Eagon P.K., Pohl C.R., Campbell I.M., Gavaler J. (1987):** Biologically active phytoestrogens are present in bourbon. *Alcohol Clin. Exp. Res* 11:399-406.
- **Glazier M.G. a Bowman M.A. (2001):** A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. *Arch. Intern. Med.* 161: 1161–1172.

- **Graham T.L. (1991):** Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiology* 95: 594-603.
- **Giannini J.I., Briskin D.P., Holt J.S., Paxton J.D. (1988):** Inhibition of plasma membrane and tonoplast H⁺-transporting ATPases by glyceollin. *Phytopathol.* 70: 894-896.
- **Guo H., Cai X.H., Qian J.Q. (2007):** A novel isoflavone from *Urophyllum chinensis*. *J. Chem. Res.* 1: 24-25.
- **Hashim M.F., Hakamatsuka T., Ebizuka Y., Sankawa U. (1990):** Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis. *FEBS Lett* 271(1-2): 219-222.
- **Hakamatsuka T., Hashim M.S., Ebizuka Y., Sankawa U. (1991):** P-450-dependent oxidative rearrangement in isoflavone biosynthesis: reconstitution of P-450 and NADPH:P450 reductase. *Tetrahedron* 47: 5969-5978.
- **Hanawa F., Tahara, S. and Mizutani, J. (1991):** Isoflavonoids produced by *Iris pseudacorus* leaves treated with cupric chloride. *Phytochem.* 30(1): 157-163.
- **Hu H., Liu S., Yang Y., Chang W., Hong G. (2000):** In *Rhizobium leguminosarum*, NodD represses its own transcription by competing with RNA polymerase for binding sites. *Nucleic Acids Res.* 28(14): 2784-2793.
- **Chin Y.W., Mdee L.K., Mbwapbo Z.H., Mi Q., Chai H.B., Cragg G.M., Swanson S. M. a Kinghorn A. D. (2006):** Prenylated Flavonoids from the Root Bark of *Berchemia discolor*, a Tanzanian Medicinal Plant. *J. Nat. Prod.* 69: 1649-1652
- **Chovanec P. (2001):** Využití reportérových genů pro sledování raných interakcí hlízkových bakterií s rostlinami. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze.
- **Jung W., Yu O., Lau S.C., O'Keefe D., Odell J., Fader G. McGonigle B. (2000):** Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nat. Biotechnol.* 18: 208-212.
- **Junghans H., Dalkin K., Dixon R.D. (1993):** Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.).15. Characterization and expression patterns of members of a subset of the chalcone synthase multigene family. *Plant Mol. Biol.* 22: 239-253.
- **Kape R., Parniske M., Brandt S., Werner D. (1992):** Isoliquiritigenin, a strong *nod* gene- and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudate. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1705-1710.
- **Kim S.T., Cho K.S., Yu S., Kim S.G., Hong J.C., Han C., Bae D.W., Nam M.H., Kang K.Y. (2003):** Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. *Proteomics* 3: 2368-2378.
- **Koblovská R., Kokoška L., Klejdus B., Lapčík O., Honys D. (2007):** Isoflavonoids in the Cannabaceae family (abstract). Konference experimentální biologie rostlin, Olomouc.
- **Koblovská R., Kokoška L., Klejdus B., Lapčík O. (2006):** Isoflavonoids in the Cannabaceae family (abstract). *Planta Med.* 72: 1027.
- **Kochs G. a Grisebach H. (1986):** Enzymic synthesis of isoflavones. *Eur. J. Biochem.* 155(2): 311-318.
- **Kuanar S.K. (2006):** 5-hydroxy 6,2'-dimethoxy isoflavone 7-O-beta-D-galactopyranoside from the stem bark of antirheumatic plant *Liriodendron tulipifera* Linn. *Asian J. Chem.* 18 (4): 3126-3128.
- **Kuiper G.G.J.M., Lemmen J.G., Carlsson B. (1998):** Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinol.* 139: 4252-4263.
- **Lania-Pietrzak B., Hendrich A.B., Zugaj J., Michalak K. (2005):** Metabolic O-demethylation does not alter the influence of isoflavones on the biophysical properties of membranes and MRP1-like protein transport activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 433(2): 428-34.
- **Lanková P. (2007):** Aplikace imunoanalytických metod ve fytochemii. Diplomová práce, VŠCHT Praha.
- **Lapčík O., Hill M., Hampl R., Wähälä K., Adlercreutz H. (1998):** Identification of isoflavonoids in beer. *Steroids* 63: 14-20.
- **Lapčík O., Hill M., Černý I., Lachman J., Al-Maharik N., Adlercreutz H., Hampl R. (1999):** Immunoanalysis of isoflavonoids in *Pisum sativum* and *Vigna radiata*. *Plant Sci.* 148: 111-119.
- **Lapčík O. (2004):** Endocrinological aspects of dietary habits. *Czech J. Food Sci.* 22: 29-38.
- **Lapčík O., Honys D., Koblovská R., Macková Z., Vítková M., Klejdus B. (2006):** Isoflavonoids are present in *Arabidopsis thaliana* despite the absence of any homologue to known isoflavonoid synthases. *Plant Physiol. Biochem* 44: 106-114.
- **Lapčík O. (2007):** Isoflavonoids in non-leguminous taxa: A rarity or rule? *Phytochem.* 68 (22-24): 2909-2916.
- **Li Z.S., Alfenito M., Rea P.A., Walbot V., Dixon R.A. (1997):** Vacuolar uptake of phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochem.* 45 (4): 689-693.
- **Macková Z. (2004):** ELISA metody pro stanovení isoflavonoidů. Diplomová práce, VŠCHT Praha.
- **Macková Z., Koblovská R., Lapčík O. (2006):** Distribution of isoflavonoids in non-leguminous taxa – An update. *Phytochem.* 67: 849-855.

- **Mazur W. a Adlercreutz H.(1998):** Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. Naturally occurring oestrogens in food. Pure Appl. Chem. 70: 1759–1776.
- **Meragelman T.L., Tucker K.D., McCloud T.G., Cardellina J.H., Shoemaker R.H. (2005):** Antifungal flavonoids from *Hildegardia barteri*. J. Nat. Prod. 68: 1790–1792.
- **Moon H.I., Lee J., Zee O.P., Chung J.H. (2005):** A glycosidic isoflavonoid from *Viola hondoensis* W. BECKER et H. BOISSIEU (Violaceae), and its effect on the expression of matrix metalloproteinase-1 caused by ultraviolet irradiation in cultured human skin fibroblasts. Biol. Pharm. Bull. 28: 1123–1125.
- **Nelson D.R., Kamataki T., Waxman, D.J. Guengerich F.P., Estabrook R.W., Feyereisen R., Gonzalez F.J., Coon M.J., Gunsalus I.C., Gotoh O., Okuda K., Nebert D.W. (1993):** The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. DNA and Cell Biol. 12: 1- 51.
- **Ososki A.L. a Kennelly E.J. (2003):** Phytoestrogens: a Review of Present State of research. Phytoter. Res. 17: 845-869.
- **Pavlová L. (2005):** Fyziologie rostlin.Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum: 166.
- **Parniske M., Ahlborn B., Werner D. (1991):** Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. J.Bacteriol. 173: 3432-3439.
- **Ravichandran K.G., Boddupalli S.S., Hasemann C.A., Peterson J.A., Deisenhofer J. (1993):** Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450s. Science 261: 731-736.
- **Reynaud J., Guilet D., Terreux R., Lussignol M., Walchshofer N. (2005):** Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. Nat. Prod. Rep. 22: 504–515.
- **Rosenblum E.R., Campbell I.M., Van Thiel D.H., Gavalier J.S. (1992):** Isolation and identification of phytoestrogens from beer. Alcohol Clin. Exp. Res. 16: 843-845.
- **Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K. (2003):** Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. J.Agric. Food Chem. 51: 571-581.
- **Savoure .A, Magyar Z., Pierre M., Brown S., Schultze M., Dudits D., Kondorosi A., Kondorosi E. (1994):** Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago microcallus* suspensions. EMBO J. 13:1093-1102.
- **Sawada Y., Kinoshita K., Akashi T., Aoki T., Ayabe S. (2002):** Key amino acid residues required for aryl migration catalysed by the cytochrome P450 2-hydroxyisoflavanone synthase. Plant J. 31: 555–564.
- **Sawada, Y. a Ayabe, S. (2005):** Multiple mutagenesis of P450 isoflavonoid synthase reveals a key active-site residue. Biochemical and Biophysical Research Communications 330: 907–913.
- **Scogin R. (1979):** Nectar constituents in the genus *Fremontia* (Sterculiaceae): Sugars, Flavonoids, and Proteins. Bot. Gaz. 140 (1): 29-31.
- **Schwab W. (2003):** Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? Phytochem. 62: 837–849.
- **Sim H.G. a Cheng C.V. (2005):** Changing demography of prostate cancer in Asia. Eur. J. Cancer 41(6):834-845.
- **Spain H.P. (2000):** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annual Rew. Microbiol. 54: 257-288.
- **Sreevidya V.S., Rao S.C., Sullia S.B., Ladha J.K., Reddy P.M. (2006):** Metabolic engineering of rice with soybean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia. J. Exp. Botany 57: 1957-1969.
- **Steele C.L., Gijzen M., Qutob D., Dixon R.A. (1999):** Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. Arch. Biochem. Biophys. 367,146–150.
- **Subramanian S., Stacey G., Yu O. (2006):** Endogenous isoflavonoids are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. Plant J. 48(2): 261-273.
- **Tham D.M., Gardner C.D., Haskell W.L. (1998):** Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. J.Clin.Endocrinol.Metabol.83: 2223-2235.
- **This P., De la Rochefordiere A., Clough K., Fourquet A., Magdelenat H. (2001):** Phytoestrogens after breast cancer. Endocr. Relat. Cancer 8: 129–134.
- **Toda S. a Shirataki Y. (1999):** Inhibitory effects of Isoflavones on Lipid Peroxidation by Reactive Oxygen Species. Phytoter. Res. 13: 163-165
- **VanEtten H. D., Mansfield J. W., Bailey J. A., Farmer E.E. (1994):** Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins" . Plant Cell 6: 1191-1192.
- **Veitch N. (2007):** Isoflavonoids of the Leguminosae. Nat. Prod. Rep. 24: 417–464.
- **Vítková M. (2005):** Enzyme immunoassay of Isoflavonoids. Disertační práce, VŠCHT Praha.
- **Wang S., Ghisalberti E.L., Ridsdill-Smith J. (1998):** Bioactive Isoflavonols and Other Components from *Trifolium subterraneum*. J. Nat. Prod. 61: 508-510.

- **Whitten P.L. & Naftolin F. (1998):** Reproductive actions of phytoestrogens. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 12: 667–690.
- **Winkel-Shirley B. (2001):** Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant physiol.* 126: 485-493.
- **Yu O., Jung W., Shi J., Croes R.A., Fader G.M., McGonigle B., Odell J.T. (2000):** Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiol.* 124(2): 781-94.
- **Yu O. & McGonigle B. (2005):** Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis. *Adv. Agr.* 86: 147-190.