

ANNA STEFAŃSKA i STANISŁAW KOWALCZYK

Zakład Biochemii

Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej

Uniwersytet Mikołaja Kopernika

Gagarina 9, 87-100 Toruń

e-mail: ania stef@do ve .boa .uni .torun .pl

DETOKSYKACJA I KOMPARTMENTACJA KSENOBIOTYKÓW W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

WSTĘP

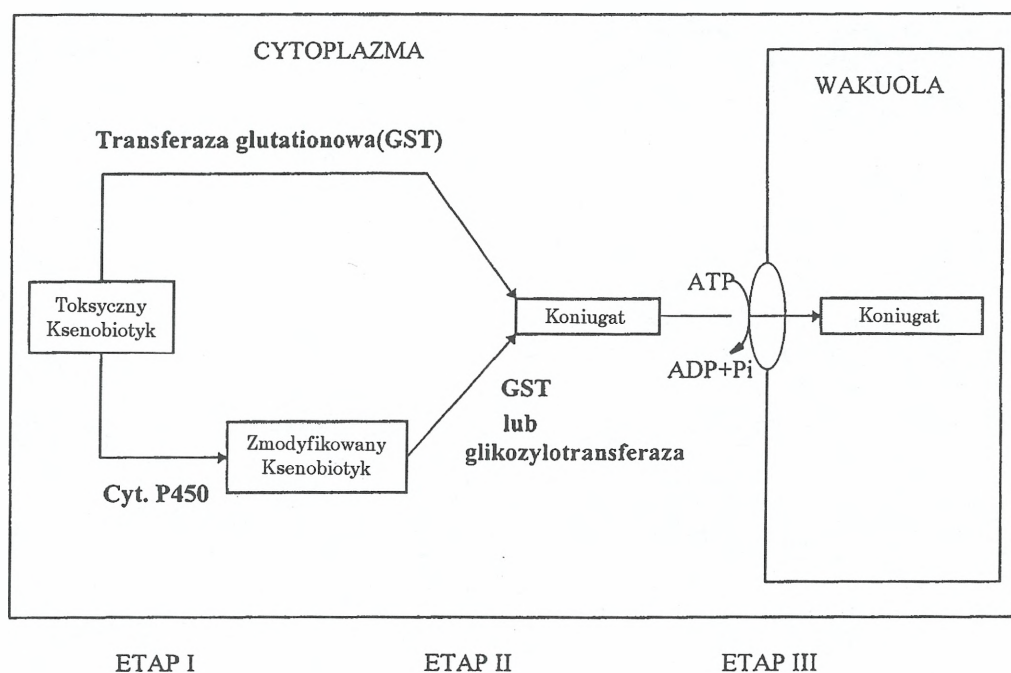
Rośliny, podobnie jak inne organizmy, narażone są na działanie wielu potencjalnie toksycznych, naturalnych lub syntetycznych związków chemicznych obecnych w otaczającym je środowisku. Związki te nazywane są ksenobiotykami od greckiego słowa *xenos* — obcy, ponieważ zostały wytworzone w innych organizmach, głównie jako tak zwane wtórne metabolity, bądź są syntetycznymi związkami wyprodukowanymi przez człowieka. Szczególnie drastyczny wzrost ilości, a także różnorodności tych związków wiąże się z rozwojem agrochemii i przemysłowym skażeniem środowiska. Na przykład, szacuje się, że w światowym handlu dostępnych jest obecnie ponad 3000 różnych produktów z grupy herbicydów, insektycydów, fungicydów oraz preparatów działających jako regulatory wzrostu. Do tej liczby należy jeszcze dodać ogromną ilość różnorodnych związków chemicznych pochodzenia przemysłowego, wśród których szczególnie szkodliwe są węglowodory policykliczne i ich chlorowcopochodne. Większość ksenobiotyków ma charakter lipofilowy, co sprawia, że łatwo wnikają do błon i zaburzają ich strukturę lub przenikając przez błony przedostają się do wnętrza komórki. Możliwość przeżycia komórki, a częstokroć całego organizmu, jest w takiej sytuacji uzależniona od sprawności biochemicznych mechanizmów detoksykacji oraz eliminowania z cytoplazmy trujących substancji.

Rośliny posiadają odpowiednie układy enzymatyczne, które w wyniku określonych przemian obniżają lub znoszą toksyczność obcych związków, a także usuwają zmodyfikowane ksenobiotyki z cytoplazmy. Proces roślinnej deto-

ksykacji ksenobiotyków obejmuje reakcje chemicznej modyfikacji oraz procesy kompartmentacji i magazynowania wewnątrz organizmu rośliny. Tak więc, w roślinnym metabolizmie ksenobiotyków można zasadniczo wyróżnić trzy etapy, a mianowicie: chemiczną modyfikację, koniugację i kompartmentację (Ryc. 1) (COLEMAN i współaut. 1997a, KREUZ i współaut. 1996).

Etap I obejmuje reakcje prowadzące do podniesienia hydrofilności ksenobiotyków, które na ogół polegają na dodaniu lub wyeksponowaniu już istniejącej grupy funkcyjnej, na przykład hydroksylowej lub karboksylowej. Reakcje zachodzące w I etapie mogą być pominięte jeśli ksenobiotyki posiadają już którąś z grup warunkujących ich wejście w kolejną fazę przemian.

W II etapie ksenobiotyki, bądź metabolity powstałe w pierwszym etapie, ulegają koniugacji. Reakcje koniugacji prowadzą do utworzenia połączeń z endogennymi hydrofilowymi związkami i zablokowania w ten sposób grup funkcyjnych ksenobiotyków. U zwierząt związkami tworzącymi koniugaty z ksenobiotykami są glutation, glukuronian i siarczan, natomiast u roślin oprócz koniugatów glutationowych znane są jeszcze połączenia z glukozą, malonianem i niektórymi aminokwasami. Produkty II etapu są znacznie lepiej rozpuszczalne w wodzie i zazwyczaj są już nietoksyczne lub wykazują wyraźnie zmniejszoną toksycznością w porównaniu z wyjściowymi związkami (MARRS 1996). Reakcje II etapu pełnią więc decydującą rolę w procesie detoksykacji ksenobiotyków (COLEMAN i współaut. 1997a).



Ryc. 1. Schemat detoksykacji ksenobiotyków w komórkach roślinnych. Proces obejmuje trzy zasadnicze etapy: I — chemiczna modyfikacja; II — koniugacja; III — kompartimentacja (według LU i współaut. 1997, 1998).

Zinaktywowane, rozpuszczalne w wodzie koniugaty są usuwane z cytozolu i magazynowane w wakuoli, bądź po przetransportowaniu do apoplastu mogą się wiązać z ligninami lub innymi komponentami ściany komórkowej (SANDERMANN 1992). Ten III etap detoksykacji ksenobiotyków nie zawsze jest ostatnim etapem ich metabolizmu. W wakuoli koniugaty mogą ulegać hydrolitycznej degradacji (WOLF i współaut. 1996, REA i współaut. 1998), a także przemianom, które, jak się przypuszcza, umożliwiają transport tych związków do apoplastu (COLEMAN i współaut. 1997a).

Roślinne enzymy uczestniczące w metabolizmie ksenobiotyków są znacznie słabiej poznane niż analogiczne układy z tkanek zwierzęcych. W obu przypadkach zwraca jednak uwagę ogromne zróżnicowanie izoform, a także wielka różnorodność przemian katalizowanych przez poszczególne izoenzymy. Ta wielka różnorodność dotyczy szczególnie monooksygenazy cytochromu P450 — kluczowego układu enzymatycznego funkcjonującego w pierwszym etapie detoksykacji. W ostatnich latach opublikowano kilka prac przeglądowych, które częściowo porządkują stosunkowo liczne już wyniki

badania eksperymentalnych tego układu enzymatycznego u roślin (BOLWELL i współaut. 1994, SCHULER 1996, CHAPPLE 1998).

Enzymem o podobnie zróżnicowanej i wielorakiej funkcji, budzącym ciągle żywe zainteresowanie biochemików, jest transferaza glutationowa. Izoforny tego enzymu, oprócz syntezy koniugatów typu ksenobiotyk-glutation, uczestniczą w wielu różnorodnych reakcjach obronnych będących odpowiedzią komórki na różne czynniki stresowe (PICKETT i LU 1989, WILCE i PARKER 1994, MARRS 1996, DROOG 1997, DIXON i współaut. 1998a).

Uwagę Czytelnika pragniemy także zwrócić na sklonowane z kilku roślin geny kodujące białka transportujące koniugaty ksenobiotyków do wakuoli. Białka te należą do nadrodziny transporterów ABC (ang. ATP-binding cassette) intensywnie badanych u bakterii i zwierząt (ENDICOTT i LING 1989, HIGGINS 1992, LINTON i HIGGINS 1998). W piśmiennictwie polskim problematyka związana z badaniami zwierzęcych transporterów ABC prezentowana była w ostatnim czasie w pracach monograficznych (BARTOSZ 1997, 1998).

CHEMICZNE MODYFIKACJE KSENOBIOTYKÓW

W pierwszej fazie detoksykacji, obce dla organizmu związki ulegają przekształceniu pole-

gającym na ich utlenianiu, redukcji lub hydrolizie. Hydroliza ksenobiotyków jest katalizowa-

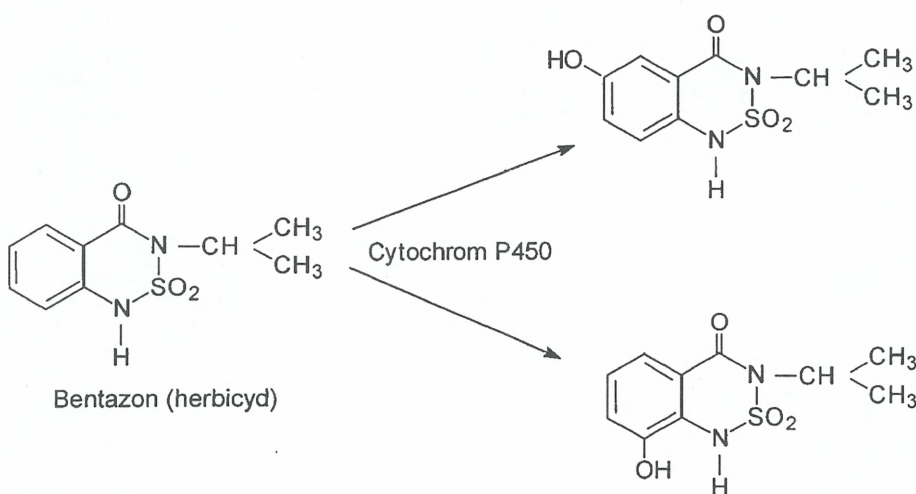
na przez amidazy i esterazy, jednak kluczową rolę w procesach odtruwania organizmu z obcych dla niego substancji odgrywa układ cytochromu P450 (COLEMAN i współaut. 1997a). Nazwa cytochrom P450 (P-pigment) pochodzi stąd, że enzym w formie zredukowanej wiążąc tlenek węgla wykazuje maksimum absorpcji przy 450 nm. Hamowanie aktywności przez CO jest znoszone w wyniku naświetlenia preparatu światłem o długości 450 nm. Cytochrom P450 jest białkiem zawierającym hemową grupę prostetyczną związaną kowalencyjnie z resztą cysteiny położonej w obrębie wysoce konserwatywnego motywu (F- -G-R-C-G) zlokalizowanego w części C-końcowej polipeptydu.

Typową reakcją z udziałem układu cytochromu P450 jest reakcja hydroksylacji, która ma następujący przebieg:



XH — toksyczny substrat; XOH — utleniony produkt.

W przedstawionej reakcji atom tlenu w grupie hydroksylowej wprowadzonej do ksenobiotyku pochodzi z O_2 . Drugi atom z cząsteczki tlenu ulega redukcji do wody. Enzymy katalizujące reakcje tego typu nazwano monooksygenazami lub oksygenazami o mieszanej funkcji.



Ryc. 2. Reakcje hydroksylacji bentazonu, katalizowane przez monooksygenazę cytochromu P450 (według Lu i współaut. 1997, 1998).

Ostatnia nazwa pochodzi stąd, że cząsteczka O_2 przyjmuje 4 elektrony, z których dwa pochodzą z NADPH, dwa natomiast z utlenianego substratu (BOLWELL i współaut. 1994). Aktywacja tlenu odbywa się w wyniku przeniesienia elektronów z NADPH za pośrednictwem flawoproteiny na cytochrom P450 lub w przypadku tak zwanych nieklasycznych izoform — bezpośrednio z NADPH na cytochrom P450.

Najpowszechniejszymi reakcjami katalizowanymi przez cytochrom P450 są reakcje hy-

droksylacji pierścienia aromatycznego, bądź reszty alkilowej w łańcuchu alifatycznym. Na rycinie 2 pokazano reakcje hydroksylacji znanego herbicydu bentazonu będące przykładem wprowadzenia tlenu do pierścienia benzenowego w dwóch różnych pozycjach.

Oprócz reakcji hydroksylacji poszczególne izoformy cytochromu P450 mogą katalizować cały wachlarz reakcji, takich chociażby jak wprowadzenie atomu tlenu do podwójnego wiązania między atomami węgla, co prowadzi do utworzenia grupy epoksydowej, czy też reakcje dealkilacji lub dezaminacji. Szczegółowy przegląd reakcji katalizowanych przez izoformy cytochromu P450, a także ich miejsce w przemianach wewnątrzkomórkowych został przedstawiony w pracach przeglądowych (BOLWELL i współaut. 1994, CHAPPLE 1998, SCHULER 1996). Warto podkreślić, że oprócz reakcji modyfikujących ksenobiotyki, należą tu również reakcje prowadzące do syntezy pośrednich związków w szlakach syntezy lignin, steroli, terpenoidów, flawonoidów, alkaloidów, niektórych roślinnych hormonów i szeregu innych związków z grupy wtórnych produktów metabolizmu komórkowego.

Większość izoform cytochromu P450 stanowią białka o masie cząsteczkowej 50–60 kDa związane z siateczką śródplazmatyczną. Białka

te w N-końcowej części posiadają hydrofobową domę, tworzącą strukturę helisy α , za pośrednictwem której enzym zakotwiczony jest w błonie. Większa część białka pozostaje po stronie cytoplazmatycznej siateczki śródplazmatycznej. Za N-końcową hydrofobową helisą położony jest region bogaty w prolinę i glicynę [(P/J)PGPx(G/P)xP], który jak wynika z badań, jest istotny dla zachowania aktywności enzymatycznej. Przypuszcza się, że fragment ten ze względu na skład aminokwasowy, destabilizuje

strukturę helisy α i dlatego przypuszczalnie funkcjonuje jako „zawias” konieczny dla optymalnego ułożenia enzymu względem błony (CHAPPLE 1998).

Wszystkie białka cytochromu P450, poza konserwatywnym motywem w centrum katalitycznym, charakteryzują się ogromnym zróżnicowaniem sekwencji. Zróżnicowanie to wydaje się być oczywiste, zważywszy na ogromną liczbę substratów ulegających przemianom w reakcjach katalizowanych przez izoformy cytochromu P450. Regiony o stosunkowo wysokiej zmienności sekwencji określane są jako miejsca rozpoznania substratu — SRS (ang. substrate recognition site). W klasyfikowaniu poszczególnych izoform przyjęto kryterium 40% identyczności sekwencji aminokwasowej jako podstawę do tworzenia poszczególnych rodzin, a w obrębie rodzin poziom identyczności niższy niż 55% stał się podstawą do tworzenia podrodzin. Dotychczas opublikowano sekwencje ponad

90 genów cytochromu P450 z różnych roślin, które tworzą aż 26 rodzin (CHAPPLE 1998, SCHULER 1996). Dla większości enzymów kodowanych przez te geny nie są znane naturalne substraty, a zatem nie jest również znana ich rola w przemianach komórkowych. Jedynym genem znanym autorom, który został sklonowany w oparciu o poznaną wcześniej sekwencję aminokwasową oczyszczonego enzymu jest gen CYP71A1 cytochromu P450 z owoców awokado (BOZAK i współaut. 1990, O'KEEFE i LETO 1989). Sklonowanie tego genu pozwoliło na identyfikowanie i klonowanie kolejnych cDNA z różnych roślin metodami opartymi na hybrydyzacji oraz wykorzystującymi reakcję łańcuchową polimerizacji (PCR). W ostatnich latach sklonowano również szereg nowych genów cytochromu P450 poznanych u roślinnych mutantów, szczególnie mutantów *Arabidopsis thaliana* (CHAPPLE 1998).

KONIUGACJA KSENOBIOTYKÓW

Ksenobiotyki posiadające dodaną lub wyeksponowaną grupę funkcyjną mogą zostać włączone do następnego etapu procesu detoksykacji. Najważniejszymi enzymami zaangażowanymi w reakcje detoksykacji II etapu są glikozylotransferazy i transferazy glutationowe (GST) (MARRS 1996).

Glikozylotransferazy są enzymami katalizującymi przeniesienie reszty glukozy z UDP-glukozy na ksenobiotyki bądź ich pochodne po-

kozą bądź z malonianem. W tym ostatnim przypadku dawcą grupy acylowej jest malonylo-CoA.

Transferazy glutationowe tworzą rodzinę enzymów katalizujących przyłączenie glutationu (γ -glutamylcysteinylglycyna) do różnych endobiotycznych bądź ksenobiotycznych, zazwyczaj cytotoksycznych komponentów. Transferazy glutationowe katalizują reakcję polegającą na nukleofilowym ataku atomu siarki gluta-



Ryc. 3. Reakcja glikozylacji zmodyfikowanego bentazonu (herbicyd), katalizowana przez glikozylotransferazę (według LU i współaut. 1997, 1998).

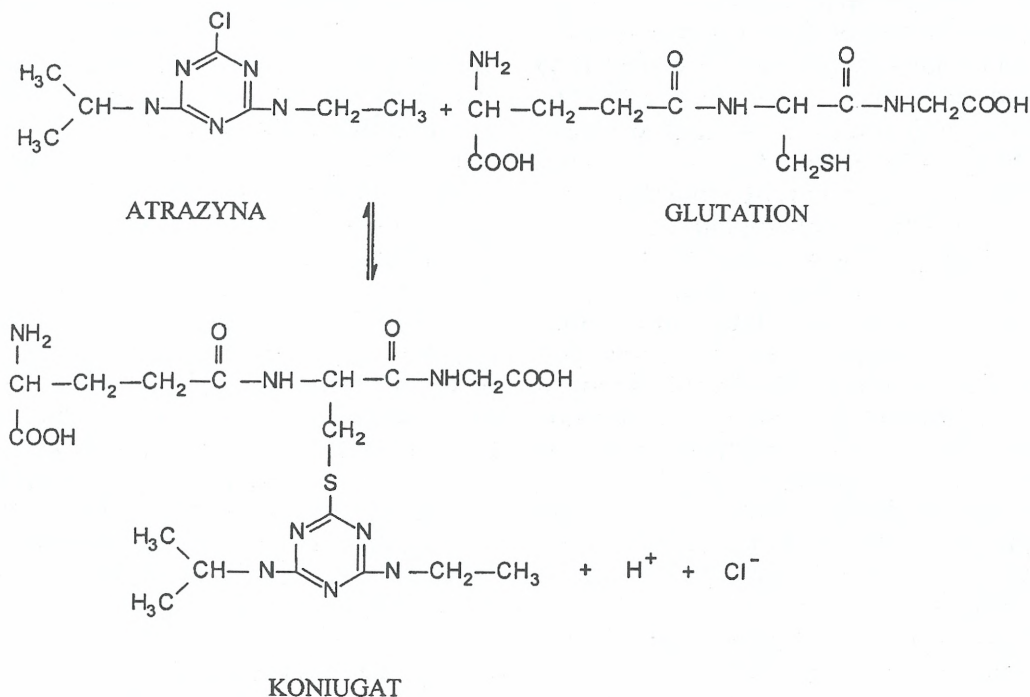
wstałe w wyniku chemicznej modyfikacji (Ryc. 3). W wyniku tych reakcji powstają połączenia typu O-, N- lub S-glikozydów, a w niektórych przypadkach mogą również powstawać koniugaty estrowe. Grupami funkcyjnymi są więc najczęściej grupy: hydroksylowa, aminowa i karboksylowa. Aktywność glikozylotransferaz stwierdzono u wielu gatunków roślin (PFLUGMACHER i SANDERMANN 1998), jednak jak na razie brakuje szerszej biochemicznej charakterystyki tej rodziny enzymów. Pierwotne koniugaty glikozyłowe mogą tworzyć wtórne koniugaty z glu-

tionu na centrum elektrofilowe substratu (PICKETT i LU 1989, WILCE i PARKER 1994). Utworzeniu koniugatu glutationowego na ogół towarzyszy obniżenie toksyczności ksenobiotyku, chociaż są znane niektóre związki (aminofenole, chlorowcopochodne alkenów, hydrochinony), których koniugaty glutationowe wykazują wyższą toksyczność.

Aktywność transferazy glutationowej zidentyfikowano po raz pierwszy około 28 lat temu badając u kukurydzy metabolizm herbicydu atrazyny ulegającego detoksykacji w wyniku

utworzenia koniugatu z glutationem (Ryc. 4) (FREAR i SWANSON 1970, SHIMABUKURO i współaut. 1970). Z czasem okazało się, że rośliny posiadają kilka podklas transferazy glutationowej funkcjonujących w przemianach, które w warunkach stresowych są jednymi z wielu reakcji obronnych związanych z wniknięciem do

Geny kodujące GST typu I są indukowane w warunkach obronnych jako odpowiedź na atak patogenu, zranienie, a także w warunkach starzenia. Transferazy z tej grupy uczestniczą w usuwaniu produktów peroksydacji tłuszczów (DUDLER i współaut. 1991, ZHOU i GODLSBROUGH 1993). Typ I reprezentowany jest też przez 5 izo-



Ryc. 4. Reakcja koniugacji atrazyny (herbicyd) z glutationem, katalizowana przez transferazę glutationową według Lu i współaut. 1997, 1998).

komórki metali ciężkich, z atakiem patogenu czy stresem oksydacyjnym. GST funkcjonują też w przemianach wtórnych metabolitów takich jak kwas cynamonowy czy antocjany (EDWARDS i DIXON 1991, MARRS i współaut. 1995).

Zwierzęce izoformy GST klasyfikowane na podstawie ich specyficzności substratowej, sekwencji aminokwasowej, liczby intronów i eks-onów w genie oraz właściwości immunologicznych dzielone są na 5 klas oznaczonych greckimi literami: pi, mu, alfa, teta, zeta (WILCE i PARKER 1994). Większość poznanych dotychczas roślinnych enzymów wykazuje podobieństwo do klasy teta, chociaż są również transferazy podobne do innych klas zwierzęcych enzymów (DROOG 1997).

Roślinne transferazy glutationowe klasyfikowane są też według innych kryteriów. Proponowany podział na 3 typy oparto na podstawie stopnia identyczności sekwencji aminokwasowej oraz położenia intronów i egzonów, natomiast bez uwzględniania specyficzności substratowej i właściwości immunologicznych (MARRS 1996, DIXON i współaut. 1998a).

form GST oczyszczonych i sklonowanych z kukurydzy, a badanych intensywnie głównie w aspekcie detoksykacji herbicydów (DIXON i współaut. 1998b).

Geny kodujące GST typu II z kwiatów goździka są indukowane przez etylen i starzenie. Te izoformy wykazują podobieństwo do klasy alfa zwierzęcych GST (MEYER i współaut. 1991, ITZHAKI i WOODSON 1993).

Geny kodujące GST typu III są indukowane przez auksyny, etylen, metale ciężkie, szok termiczny, a także w następstwie infekcji patogenem (MARRS 1996).

Roślinne GST funkcjonują zazwyczaj jako homo- lub heterodimery polipeptydów o masie cząsteczkowej od 23 do 30 kDa. Większość izoform GST znajdowano w cytoplazmie, aczkolwiek są również doniesienia wskazujące na lokalizację błonową oraz obecność enzymu w apoplazmie (FLURY i współaut. 1996). Transferaza glutationowa z tytoniu (NtParA) indukowana przez auksyny zlokalizowana jest w jądrze (ABEL i THEOLOGIS 1996). Przypuszcza się, że funkcja tej ostatniej GST może polegać na detoksykacji

produktów degradacji DNA powstających w wyniku stresu oksydacyjnego.

Obie podjednostki homo- lub heterodimericznych GST posiadają centra aktywne utworzone przez dwa charakterystyczne miejsca, miejsce G wiążące glutation oraz miejsce H wiążące elektrofilowe substraty (REINEMER i współaut. 1996, NEUEFEIND i współaut. 1997a, b). Badania struktury roślinnych GST wskazują ponadto, że podobnie jak enzymy zwierzęce, posiadają wysoko konserwatywne N-terminalne reszty argininy oraz seryny, które uczestniczą w wiązaniu glutationu i ułatwiają tworzenie anionu sulfidowego. Poza regionem N-terminalnym izoformy GST wykazują niski stopień identyczności, zazwyczaj nie przekraczający 25–35%. Tak duże zróżnicowanie sekwencji można wiązać, podobnie jak w przypadku cytochromu P450, z ogromną różnorodnością związków tworzących koniugaty z glutationem. Oprócz klasycznych transferaz glutationowych znane są enzymy, które posiadają dodatkowo aktywność peroksydazową (BARTLING i współaut. 1993). Swoistą grupę transferaz glutationowych tworzą tak zwane ligandyny, które wiążą i przenoszą różne ligandy na przykład auksyny czy tetrapirole (MARRS 1996).

Badania roślinnych transferaz glutationowych, zainicjowane przed ponad ćwierćwieczem, ukierunkowane były głównie na śledzenie reakcji prowadzących do detoksykacji herbicydów. Od tego czasu włożono wiele wysiłku w identyfikowanie izoform GST odpowiedzialnych za tolerancję roślin na określone herbicydy. Efektem tych badań są obserwacje stwierdzające, że selektywność herbicydów może zależeć między innymi od możliwości ich metabolizowania przez określone gatunki roślin, w tym również od możliwości tworzenia koniugatów z glutationem bądź glukozą. Eksperymentalnie wykazano, że obecność odpowiedniej transferazy syntetyzującej koniugaty określonego herbicydu w wielu przypadkach warunkuje oporność rośliny względem temu herbicydowi (HATTON i

współaut. 1996, ANDREWS i współaut. 1997). I tak, kukurydza i sorgo są odporne na atrazynę, ponieważ zawierają wysoki poziom odpowiedniej izoformy GST katalizującej tworzenie koniugatu glutationowego. Groch, owies, pszenica, jęczmień nie posiadają takiej izoformy GST i dlatego nie wykazują oporności względem atrazyny. Jak dalece selektywność roślin względem określonych herbicydów jest zależna od obecności określonych izoform GST, mogą świadczyć wyniki badań prowadzonych na kukurydzy. Wszystkie poznane izoformy GST w kukurydzy utworzone są z 3 polipeptydów o masie cząsteczkowej 29 kDa, 27 kDa i 26 kDa, które mogą tworzyć 5 izoform GST będących homo- bądź heterodimerami. Homodimery zbudowane z polipeptydu 29 kDa (GST I-I) bądź 26 kDa (GST III-III) są aktywne względem 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu i alachloru. Indukowana przez „ochraniacze” izoforma GST II-II jest homodimerem zbudowanym z podjednostki 27 kDa aktywnym względem metalochloru i alachloru, ale nieaktywnym względem 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (IRZYK i FUERST 1993).

Badania selektywności herbicydów mają ścisły związek z badaniami tak zwanych ochraniaczy herbicydów (safeners). Ochraniacze są związkami nietoksycznymi podobnymi pod względem strukturalnym do herbicydów (FARGO i współaut. 1994). Ich działanie, jak to wykazano eksperymentalnie, może polegać między innymi na indukowaniu ekspresji genów cytochromu P450, GST bądź glikozylotransferaz, co w efekcie prowadzi do podniesienia efektywności detoksykacji herbicydów. Na przykład, rośliny charakteryzujące się niską tolerancją względem metalochloru i alachloru, potraktowane wcześniej ochraniaczami takimi jak flurazol, dichlormid czy benoksakor stają się roślinami o znacząco podniesionej tolerancji na te herbicydy na skutek selektywnej indukcji ekspresji GST (WIEGAND i współaut. 1986, DEAN i współaut. 1990, IRZYK i FUERST 1993, JEPSON i współaut. 1994).

KOMPARTMENTACJA KSENOBIOTYKÓW

Ksenobiotyki, a wśród nich również leki, usuwane są z komórek zwierzęcych za pośrednictwem specjalnych białek transportujących nazywanych transporterami ABC. W organizmach ssaków miejscem intensywnego usuwania koniugatów ksenobiotyków są regiony błon hepatocytów położone najbliżej kanalików żółciowych, poprzez które związki te wydalane są do żółci. W piśmiennictwie polskim, poszczególne rodziny zwierzęcych transporterów ABC

omawiane są w pracach przeglądowych opublikowanych w ostatnich latach w KOSMOSIE i Postęпах Biochemii (BARTOSZ 1997, 1998).

W komórkach roślinnych koniugaty ksenobiotyków są transportowane przez tonoplast do wnętrza wakuoli lub mogą być usuwane do apoplastu, gdzie łączą się z ligninami, chemice-lulozami i innymi komponentami ściany komórkowej (REA i współaut. 1998). Już pierwsze prace poświęcone badaniom kompartmentacji

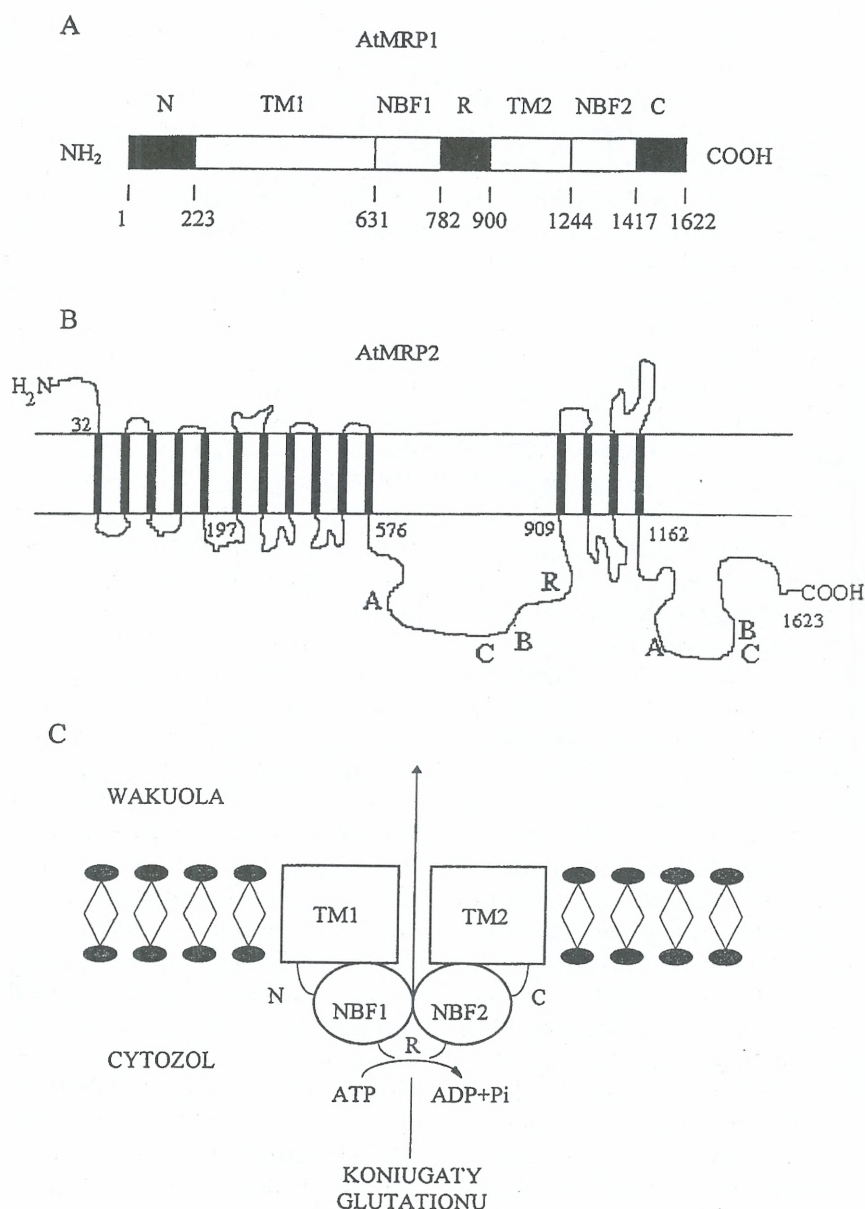
ksenobiotyków wskazywały, że transport koniugatów do wnętrza wakuoli zależny jest od ATP (MARTINOIA i współaut. 1993). Jednak już te pierwsze, podobnie jak szereg późniejszych eksperymentów, nie potwierdzały pierwotnych przypuszczeń zakładających, że transport ksenobiotyków jest zależny od gradientu elektrochemicznego. Jak wiadomo, transport do wnętrza wakuoli niektórych cukrów, aminokwasów, organicznych i nieorganicznych anionów oraz niektórych kationów uzależniony jest od gradientu elektrochemicznego (MARTINOIA 1992). Gradient elektrochemiczny na tonoplaście jest generowany przez wakuolarnie pompy protonowe, a mianowicie H^+ -ATPazę (V-ATPazę) i H^+ -pirofosfatazę (H^+ -PPazę) (KOWALCZYK 1992). Tworzony w wyniku hydrolizy ATP lub pirofosforanu gradient protonowy (ΔpH), zamieniany na tak zwaną siłę protonomotoryczną, umożliwia z kolei aktywny transport wspomnianych wyżej związków. W przypadku transportu koniugatów okazało się jednak, że związki rozprzęgające gradient H^+ lub jonowy, takie jak karbonylocyjanek *p*-(trójfluorometoksy)fenylohydrazonu, gramicydyna D czy NH_4Cl , nie hamują ich wnikania do wakuoli. Transport nie jest również hamowany przez bafilomycynę – znany inhibitor V-ATPazy, natomiast ulega zahamowaniu przez *orto*-wanadan, inhibitor ATPazy typu P. Obserwacje powyższe jednoznacznie wskazywały, że transport koniugatów nie jest zależny od gradientu elektrochemicznego natomiast może być związany z bezpośrednią „energizacją białka” transportującego, która towarzyszy hydrolizie ATP (LI i współaut. 1995, KLEIN i współaut. 1996, BLAKE-KALFF i COLEMAN 1996, COLEMAN i współaut. 1997b, LI i współaut. 1997). Mechanizm transportu ksenobiotyków do wakuoli przypomina zatem usuwanie koniugatów z komórek zwierzęcych, transportowanych przez błonę plazmatyczną. Sugestie powyższe zostały w ostatnim czasie potwierdzone w badaniach molekularnych. Efektem tych badań było najpierw sklonowanie i zsekwencjonowanie z *A. thaliana*, ziemniaka i jęczmienia genów, których produkty są homologiczne z białkami oporności wielolekowej MDR (ang. multidrug resistance) (DUDLER i HERTIG 1992, WANG i współaut. 1996, DAVIES i współaut. 1997). Białka MDR stanowią jedną z wielu podrodzin grupy białek transportujących, tak zwanych transporterów ABC tworzących liczną nadrodzinę białek błonowych, zawierających domenę wiążącą ATP (ang. ATP binding cassette) (ENDICOTT i LING 1989). Sklonowane z roślin geny kodują białka o zbliżonej wielkości do zwierzęcych glikoprotein-P zawierających dwie domeny wiążące ATP oraz 2 domeny transbło-

nowe utworzone z 12 hydrofobowych fragmentów przezbłonowych. Żadne z białek kodowanych przez sklonowane geny nie zostało, jak dotychczas, scharakteryzowane pod względem biochemicznym, tym niemniej, podobieństwo sekwencji aminokwasowej z poznanymi wcześniej białkami zwierzęcymi jest na tyle znaczące, że pozwala przypuszczać, że również ich funkcje mogą być podobne.

W ostatnich dwóch latach z *A. thaliana* sklonowano nowe geny kodujące białka homologiczne z inną grupą transporterów ABC nazywanych białkami związanymi z opornością wielolekową MRP (ang. multidrug resistance-associated protein). Gen *AtMRP1* (LU i współaut. 1997) koduje białko o masie cząsteczkowej 181 kDa charakteryzujące się 36% identycznością sekwencji aminokwasowej z poznanymi wcześniej białkami podrodziny MRP z drożdży i człowieka (LEIER i współaut. 1994, SZCZYPKA i współaut. 1994). Kolejny gen z *A. thaliana* nazywany *AtMRP2* koduje białko zbudowane z 1623 aminokwasów, którego stopień identyczności sekwencji aminokwasowej z białkiem *AtMRP1* sięga 87% (LU i współaut. 1998). Podobny do *AtMRP1* jest również sklonowany ostatnio gen *AtMRP3* (TOMMASINI i współaut. 1997, 1998). Doświadczenia prowadzone na drożdżach transformowanych sklonowanymi genami z *A. thaliana* jednoznacznie dowodzą, że produkty tych genów są białkami transportującymi różne związki do wakuoli. Geny *AtMRP* wprowadzano do drożdży linii DTY168, które mają prawie całkowicie usunięty gen *YCF1* kodujący białko z rodziny MRP (SZCZYPKA i współaut. 1994). Pęcherzyki wakuolarnie transformowanych drożdży intensywnie pobierają koniugaty glutationowe metolachloru, dinitrofenolu, antocjanów, a także utleniony glutation (LU i współaut. 1997). Drożdże transformowane *AtMRP2* i *AtMRP3* transportują ponadto metabolity chlorofilu (LU i współaut. 1998, TOMMASINI i współaut. 1998).

Białka kodowane przez geny *AtMRP* zawierają 2 domeny wiążące ATP oznaczone jako NBF1 i NBF2 oraz dwie domeny transbłonowe (TM1 i TM2) utworzone przez hydrofobowe fragmenty przezbłonowe. Białka MRP zawierają dodatkowo domenę regulacyjną R. Na rycinie 5A przedstawiono schemat budowy białka *AtMRP1* z zaznaczonymi charakterystycznymi domenami. Rycina 5B pokazuje przypuszczalną topologię białka *AtMRP2* w tonoplaście.

Domeny NBF1 i NBF2 mają bardzo charakterystyczną budowę, typową dla wszystkich transporterów ABC. Stopień identyczności w obrębie tych domen między poszczególnymi transporterami ABC wynosi 30–40%. Domeny



Ryc. 5. Białka transportujące ksenobiotyki do wakuoli.

A. Schemat budowy transportera AtMRP1 z zaznaczonymi domenami przezbłonowymi (TM1 i TM2), domenami wiążącymi nukleotydy (NBF1 i NBF2), domeną regulatorową (R) oraz fragmentami N- i C-terminalnymi.

B. Topologiczny model białka AtMRP2 z zaznaczonymi fragmentami przezbłonowymi i dwiema charakterystycznymi domenami wiążącymi nukleotydy (NBF1 i NBF2), obejmującymi motywy A, B i C oraz domeną regulatorową (R).

C. Schemat budowy białka AtMRP transportującego koniugaty glutationowe z cytoplazmy do wakuoli. Zaznaczono domeny transbłonowe, domeny wiążące nukleotydy, domenę regulatorową oraz fragmenty C- i N-końcowe (według Lu i współaut. 1997, 1998).

te zawierają trzy wysoce konserwatywne motywy, którymi są kaseta A (GSTGEG) (GRTGAG) i kaseta B (VYIFD) (ILVLD) przedzielone dłuższym motywem C (HIGGINS 1992, LU i współaut. 1998, REA i współaut. 1998). Domeny A i B, nazywane motywami Walkera, występują w wielu innych enzymach, które wiążą bądź hydroлизują ATP. Motyw A odpowiada w tych białkach pętli-P lub pętli bogatej w glicynę. Obydwie domeny wiążące ATP są silnie hydrofilowe i

położone są po cytoplazmatycznej stronie błony. Motyw C jest charakterystyczny tylko dla białek ABC. Jego funkcja wiązana jest z przenoszeniem „stanu zenergowania” na inne części transportera (LINTON i HIGGINS 1998). Hamowanie transportu koniugatów przez wanadan sugeruje, że transportery ABC w cyklu katalitycznym ulegają fosforylacji, w której najprawdopodobniej uczestniczy reszta asparaginianu bądź glutaminianu. Szereg badań prowa-

dzonych na transporterach zwierzęcych wskazuje jednak, że fosforylacja białka gra rolę regulacyjną, nie pełniąc przypuszczalnie żadnej roli w mechanizmie sprzęgania hydrolizy ATP z transportem.

Jak pokazano na rycinie 5B obydwie białka AtMRP1 i AtMRP2 zawierają po 2 domeny TM. Domena TM1 utworzona jest z 6 a TM2 z 4 fragmentów przezbłonowych. Wszystkie białka AtMRP posiadają w części N-końcowej 5 dodatkowych sekwencji przezbłonowych. Długość TM tworzą „kanał przezbłonowy”, a ponadto, jak się przypuszcza, decydują o specyficzności substratowej.

Molekularny mechanizm transportu koniugatów przez transportery ABC nie został do końca poznany. Na ogół rozważane są dwie możliwości. Pierwsza z nich zakłada funkcjonowanie transportera jako pompy, w której domeny transbłonowe tworząc przezbłonowe „pory” umożliwiają przepływ koniugatów z wodnej fazy cytoplazmatycznej do wodnej fazy wakuolarnej. Model „flipazy” natomiast zakłada, że koniugat najpierw ulega związaniu po stronie cytoplazmatycznej transportera, a następnie w procesie zależnym od ATP przenoszony jest na drugą stronę błony.

W strukturze niektórych transporterów ABC, w tym również sklonowanych z *A. thaliana*, zidentyfikowano jeszcze dodatkową wysoce hydrofilową domenę R (Ryc. 5C). Na podstawie sekwencji aminokwasowej przypuszcza się, że jej rola polega na regulacji transportu (HIGGINS 1992, REA i współaut. 1998). Drożdżowy transporter ScYCF1 zawiera w obrębie domeny R charakterystyczną sekwencję, która przypomina

na substraty fosforylowane przez kinazę białkową A.

Na obecnym etapie badań roślinnych transporterów ABC bez odpowiedzi pozostaje pytanie o to czy białka te oprócz koniugatów glutationowych mogą transportować również połączenia ksenobiotyków z glukozą. Nie wiadomo również czy roślinne transportery ABC są obecne jedynie w tonoplazmie, czy też podobnie jak u zwierząt, zlokalizowane są także w plazmalemmie. Wyniki badań na *A. thaliana* opublikowane ostatnio przez SIDLERA i współaut. (1998) wskazują na plazmalemmową lokalizację białka homologicznego z glikoproteiną-P.

Transport koniugatów ksenobiotyków do wakuoli nie jest ostatnim etapem w procesie detoksykacji ksenobiotyków. Niektórzy badacze wyróżniają dodatkowo czwarty etap metabolizmu koniugatów, który zachodzi w wakuoli (REA i współaut. 1998). W przypadku koniugatów glutationowych odszczepiana jest z glutationu kolejno reszta glicylowa i γ -glutamylowa, powstający zaś w wyniku tych reakcji proteolitycznych koniugat cysteinowy może ulegać N-malonylacji (WOLF i współaut. 1996, COLEMAN i współaut. 1997a). Na obecnym etapie badań nie wiadomo co dzieje się dalej z powstałymi w ten sposób koniugatami. Nie wiadomo również w jaki sposób niektóre z koniugatów transportowane są następnie do apoplastu. Mimo braku odpowiedzi na te i szereg innych pytań, badania te jeszcze raz pokazują, że wakuole są metabolicznie aktywnymi organellami a nie kompartmentami służącymi jedynie do stałego czy przejściowego magazynowania substancji.

UWAGI KOŃCOWE

U zwierząt w procesie detoksykacji zaangażowana jest głównie wątroba, natomiast u roślin proces ten zachodzi zasadniczo we wszystkich komórkach organizmu. Wydaje się zatem całkowicie uzasadniony pogląd wysunięty niedawno przez SANDERMANN (1994) przypisujący roślinom funkcję globalnego układu detoksykacji środowiska i przez analogię do „zielonych płuc” nazwanego „zieloną wątrobą”.

Poznanie szlaków detoksykacji ksenobiotyków u roślin ma wielkie znaczenie dla ludzi jako konsumentów produktów roślinnych. Aktualna wiedza na temat procesów detoksykacji ksenobiotyków u roślin wskazuje na konieczność podejmowania szczegółowych badań poświęconych możliwości uwalniania przez enzymy trawienne szkodliwych związków z produktów II etapu detoksykacji.

Badanie roślinnych układów uczestniczących w detoksykacji ksenobiotyków staje się ważne również ze względu na możliwość wpływania za pośrednictwem metod inżynierii genetycznej na zmianę tolerancji roślin uprawnych względem określonych herbicydów. Pierwsze tego rodzaju próby zostały już podjęte w doświadczeniach nad transformowaniem tytoniu genem GST z kukurydzy, co w efekcie doprowadziło do wystąpienia u tytoniu oporności na herbicyd (THOMPSON i współaut. 1998). W kontekście tych prób, można sobie również wyobrazić, że co najmniej w przypadku szczególnie wrażliwych roślin będzie można w przyszłości wpływać przy pomocy określonych manipulacji genetycznych na poprawę oporności względem ksenobiotykom.

DETOXIFICATION AND COMPARTMENTATION OF XENOBIOTICS IN PLANT CELLS

Summary

Detoxification of xenobiotics in plants can be divided into three phases. In phase I, xenobiotics are chemically transformed into more hydrophilic compounds, cytochrome P450 monooxygenase system playing a pivotal role in these chemical modifications. In phase II, the xenobiotics or their derivatives are deactivated by covalent linkage to glutathione, glucose or malonate. These phase II reactions are

catalysed by glutathione-, glucosyl- and malonyl- transferases. The resulting xenobiotic conjugates are exported from the cytosol to the vacuole by a ATP-dependent tonoplast transporters. Recently, *AtMRP* genes were cloned from *Arabidopsis thaliana*, which encode proteins belonging to the subclass of the ATP-binding cassette (ABC) transporters.

LITERATURA

- ABEL S., THEOLOGIS A., 1996. *Early genes and auxin action*. Plant Physiol. 111, 9–17.
- ANDREWS C. J., SKIPSEY M., TOWNSON J. K., MORRIS C., JEPSON I., EDWARDS R., 1997. *Glutathione transferase activities toward herbicides used selectively in soybean*. Pestic. Sci. 51, 213–222.
- BARTLING D., RADZIO R., STEINER U., WEILER E. W., 1993. *A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from Arabidopsis thaliana*. Molecular cloning and functional characterization. Eur. J. Biochem. 216, 579–586.
- BARTOSZ G., 1997. *MRP: Nowy transporter wielolekowy*. Kosmos 46, 129–136.
- BARTOSZ G., 1998. *Transportery ABC w komórkach człowieka*. Post. Biochem. 44, 136–150.
- BLAKE-KALFF M. M. A., COLEMAN J. O. D., 1996. *Detoxification of xenobiotics by plant cells: characterisation of vacuolar amphiphilic organic anion transporters*. Planta 200, 426–431.
- BOLWELL G. P., BOZAK K., ZIMERLIN A., 1994. *Plant cytochrome P450*. Phytochemistry 37, 1491–1506.
- BOZAK K. R., YU H., SIREVAG R., CHRISTOFERSEN R. E., 1990. *Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3904–3908.
- CHAPPLE C., 1998. *Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 311–343.
- COLEMAN J. O. D., MECHTOLD M. A., BLAKE-KALFF M. M. A., DAVIES T. G. E., 1997a. *Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation*. Trends Plant Sci. 2, 144–151.
- COLEMAN J. O. D., RANDALL R., BLAKE-KALFF M. M. A., 1997b. *Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: a fluorescent assay using monochlorobimane*. Plant Cell Environ. 20, 449–460.
- DAVIES T. G. E., THEDOULOU F. L., HALLAHAN D. L., FORDE B. G., 1997. *Cloning and characterisation of a novel P-glycoprotein homologue from barley*. Gene 199, 195–202.
- DEAN J. V., GRONWALD J. W., EBERLEIN C. V., 1990. *Induction of glutathione S-transferase isozymes in sorghum by herbicide antidotes*. Plant Physiol. 92, 467–473.
- DIXON D. P., CUMMINS I., COLE D. J., EDWARDS R., 1998a. *Glutathione-mediated detoxification systems in plants*. Curr. Opin. Plant Biol. 1, 258–266.
- DIXON D. P., COLE D. J., EDWARDS R., 1998b. *Purification, regulation and cloning of a glutathione transferase (GST) from maize resembling the auxin-inducible type-III GSTs*. Plant Mol. Biol. 36, 75–87.
- DROOG F., 1997. *Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau*. J. Plant Growth Regul. 16, 95–107.
- DUDLER R., HERTIG C., 1992. *Structure of an mdr-like gene from Arabidopsis thaliana*. Evolutionary implications. J. Biol. Chem. 267, 5882–5888.
- DUDLER R., HERTIG C., REBMANN G., BULL J., MAUCH F., 1991. *A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases*. Mol. Plant Microbe Interact. 4, 14–18.
- EDWARDS R., DIXON R. A., 1991. *Glutathione S-cinnamoyl transferases in plants*. Phytochemistry 30, 79–84.
- ENDICOTT J. A., LING V., 1989. *The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance*. Annu. Rev. Biochem. 58, 137–171.
- FARAGO S., BRUNOLD C., KREUZ K., 1994. *Herbicide safeners and glutathione metabolism*. Physiol. Plant. 91, 537–542.
- FLURY T., WAGNER E., KREUZ K., 1996. *An inducible glutathione S-transferase in soybean hypocotyl is localized in the apoplast*. Plant Physiol. 112, 1185–1190.
- FREAR D. S., SWANSON H. R., 1970. *Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: Partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn*. Phytochemistry 9, 2123–2132.
- HATTON P. J., DIXON D., COLE D. J., EDWARDS R., 1996. *Glutathione transferase activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species*. Pestic. Sci. 46, 267–275.
- HIGGINS C. F., 1992. *ABC transporters: From microorganisms to man*. Annu. Rev. Cell Biol. 8, 67–113.
- IRZYK G. P., FUERST E. P., 1993. *Purification and characterization of a glutathione S-transferase from benoxacor-treated maize (Zea mays)*. Plant Physiol. 102, 803–810.
- ITZHAKI H., WOODSON W. R., 1993. *Characterization of an ethylene-responsive glutathione S-transferase gene cluster in carnation*. Plant Mol. Biol. 22, 43–58.
- JEPSON I., LAY V. J., HOLT D. C., BRIGHT S. W. J., GREENLAND A. J., 1994. *Cloning and characterization of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II and IV*. Plant Mol. Biol. 26, 1855–1866.
- KLEIN M., WEISSENBOCK G., DUFAUD A., GAILLARD C., KREUZ K., MARTINOIA E., 1996. *Different energization mechanisms drive the vacuolar uptake of a flavonoid glucoside and a herbicide glucoside*. J. Biol. Chem. 271, 29666–29671.
- KOWALCZYK S., 1992. *Błonowe pirofosfatazy transportujące protony*. Post. Biochem. 38, 183–189.
- KREUZ K., TOMMASINI R., MARTINOIA E., 1996. *Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants*. Plant Physiol. 111, 349–353.
- LEIER I., JEDLITSCHKY G., BUCHHOLZ U., COLE S. P. C., DEELEY R. G., KEPPLER D., 1994. *The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates*. J. Biol. Chem. 269, 27807–27810.
- LI Z.-S., ZHAO Y., REA P. A., 1995. *Magnesium adenosine 5'-triphosphate-energized transport of glutathione-S-conjugates by plant vacuolar membrane vesicles*. Plant Physiol. 107, 1257–1268.

- LI Z.-S., ALFENITO M., REA P. A., WALBOT V., DIXON R. A., 1997. Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochemistry* 45, 689–693.
- LINTON K. J., HIGGINS C. F., 1998. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol.* 28, 5–13.
- LU Y.-P., LI Z.-S., REA P. A., 1997. AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8243–8248.
- LU Y.-P., LI Z.-S., DROZDOWICZ Y. M., HORSTENSTEINER S., MARTINOIA E., REA P. A., 1998. AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell* 10, 267–282.
- MARRS K. A., 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127–158.
- MARRS K. A., ALFENITO M. R., LLOYDS A. M., WALBOT V., 1995. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* 375, 397–400.
- MARTINOIA E., 1992. Transport processes in vacuoles of higher plants. *Bot. Acta* 105, 232–245.
- MARTINOIA E., GRILL E., TOMMASINI R., KREUZ K., AMRHEIN N., 1993. ATP-dependent glutathione S-conjugate “export” pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364, 247–249.
- MEYER R. C., GOLDSBROUGH P. B., WOODSON W. R., 1991. An ethylene-responsive flower senescence-related gene from carnation encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. *Plant Mol. Biol.* 17, 277–281.
- NEUEFEIND T., HUBER R., DASENBROCK H., PRADE L., BIESELER B., 1997a. Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: Evidence for an induced-fit mechanism. *J. Mol. Biol.* 274, 446–453.
- NEUEFEIND T., HUBER R., REINEMER P., KNABLEIN J., PRADE L., MANN K., BIESELER B., 1997b. Cloning, sequencing, crystallization and X-ray structure of glutathione S-transferase-III from *Zea mays* var. *mutin*: A leading enzyme in detoxification of maize herbicides. *J. Mol. Biol.* 274, 577–587.
- O’KEEFE D. P., LETO K. J., 1989. Cytochrome P-450 from the mesocarp of avocado (*Persea americana*). *Plant Physiol.* 89, 1141–1149.
- PFLUGMACHER S., SANDERMANN H., 1998. Taxonomic distribution of plant glucosyltransferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 49, 507–511.
- PICKETT C. B., LU A. Y. H., 1989. Glutathione S-transferases: Gene structure, regulation, and biological function. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 743–764.
- REA P. A., LI Z.-S., LU Y.-P., DROZDOWICZ Y. M., 1998. From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 727–760.
- REINEMER P., PRADE L., HOF P., NEUEFEIND T., HUBER R., ZETTL R., PALME K., SCHELL J., KOELLN I., BARTUNIK H.D., BIESELER B., 1996. Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: Structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J. Mol. Biol.* 255, 289–309.
- SANDERMANN H., 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.* 17, 82–84.
- SANDERMAN H., 1994. Higher plant metabolism of xenobiotics: the “green” liver concept. *Pharmacogenetics* 4, 225–241.
- SCHULER M. A., 1996. Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 235–284.
- SHIMABUKURO R. H., SWANSON H. R., WALSH W. C., 1970. Glutathione conjugation. Atrazine detoxication mechanism in corn. *Plant Physiol.* 46, 103–107.
- SIDLER M., HASSA P., HASAN S., RINGLI C., DUDLER R., 1998. Involvement of an ABC transporter in a developmental pathway regulating hypocotyl cell elongation in the light. *Plant Cell* 10, 1623–1636.
- SZCZYPKA M. S., WEMMIE J. A., MOYE-ROWLEY W. S., THIELE D. S., 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* 269, 22853–22857.
- THOMPSON P. A., ROUSSEL V., KNIGHT M. E., GREENLAND A. J., JEPSON I., 1998. Overexpression of the 27 kDa maize glutathione S-transferase in transgenic tobacco confers herbicide resistance. *J. Exp. Bot.* 48, 25–26.
- TOMMASINI R., VOGHT E., SCHMID J., FROMENTAULT M., AMRHEIN N., MARTINOIA E., 1997. Differential expression of genes coding for ABC transporters after treatment of *Arabidopsis thaliana* with xenobiotics. *FEBS Lett.* 411, 206–210.
- TOMMASINI R., VOGHT E., FROMENTAULT M., HORSTENSTEINER S., MATILE P., AMRHEIN N., MARTINOIA E., 1998. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J.* 13, 773–780.
- WANG W., TAKEZAWA D., POOVAIAH B. W., 1996. A potato cDNA encoding a homologue of mammalian multidrug resistant P-glycoprotein. *Plant Mol. Biol.* 31, 683–687.
- WIEGAND R. C., SHAH D. M., MOZER T. J., HARDING E. I., DIAZ-COLLIER J., SAUNDERS C., JAWORSKI E. G., TIEMEIER D. C., 1986. Messenger RNA encoding a glutathione-S-transferase responsible for herbicide tolerance in maize is induced in response to safener treatment. *Plant Mol. Biol.* 7, 235–243.
- WILCE M. C. J., PARKER M. W., 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1205, 1–18.
- WOLF A. E., DIETZ K.-J., SCHRODER P., 1996. Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Lett.* 384, 31–34.
- ZHOU J., GOLDSBROUGH P. B., 1993. An *Arabidopsis* gene with homology to glutathione S-transferases is regulated by ethylene. *Plant Mol. Biol.* 22, 517–523.