

ROSTLINNÉ β -GLUKOSIDASY

VLADIMÍR ROTREKL

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova
Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika,
e-mail: rotrekl@chemi.muni.cz*

Došlo dne 30.X. 1997

Obsah

1. Úvod
2. Mechanismus katalýzy
3. Rostlinné β -glukosidasy
 - 3.1. Substrátová specifita
 - 3.2. Nejdůležitější biochemické cesty, v nichž hrají P-glukosidasy u rostlin klíčovou roli
 - 3.2.1. Rostlinný obranný systém
 - 3.2.1.1. Kyanogeneze
 - 3.2.1.2. Glukosidy derivátů hydroxamové kyseliny jsou také součástí obranného systému rostlin
 - 3.2.1.3. Avenakosidy: prekurzory proti-plísňových sloučenin
 - 3.2.1.4. β -D-Glukosid kyseliny salicylové: prekurzor signální molekuly rostlinného obranného systému
 - 3.2.1.5. Glukosinoláty
 - 3.2.2. Degradace buněčné stěny
 - 3.2.2.1. β -Glukosidasa: mediátor účinku auxinu?
 - 3.2.3. Další funkce (uvolňování flavonů a flavonoidů, či fytohormonů)
 - 3.2.3.1. Hydrolýza fytohormonálních konjugátů
 - 3.2.3.2. Hydrolýza konjugátů flavonoidů
 - 3.2.4. Další pochody, v nichž jsou zapojeny p-glukosidasy

1. Úvod

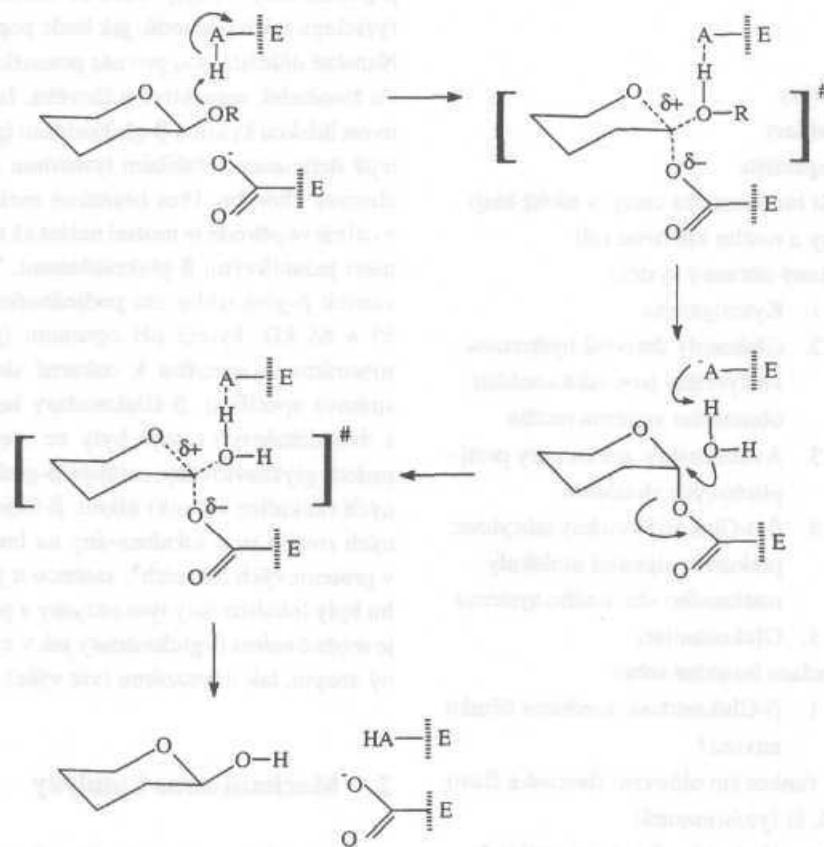
P-Glukosidasy (β -D-glukosid- β -D-glukohydrolasy EC 3.2.1.21.) katalyzují hydrolytické štěpení glykosidických vazeb aryl a alkyl glukosidů a stejně tak glukosidů obsahujících pouze cukernou složku (tj. cellobiosa). Vyskytují se prakticky v celém živém světě, od bakterií přes houby, až k rostlinám a živočichům. U hub a bakterií se zapojuje celulasa spolu s β -glukosidasou v podobě tzv. celulasového komplexu do katabolismu celulosy, která v současné době tvoří největší část odpadů lidské civilizace. U rostlin se p-glukosidasy zapojují hned do několika velmi důležitých fyziologických pochodů, jak bude popsáno v dalším textu. Neméně důležité jsou pro nás poznatky o těchto enzymech i u živočichů, respektive u člověka. Jako příklad je možné uvést lidskou kyselou β -glukosidasu (glukocerebrosidasu), jejíž deficiencie v lidském lysozomu může způsobit Gaucherovu chorobu. Přes nesmírné rozšíření těchto enzymů v celé živé přírodě je možné nalézt až zarážející podobnosti mezi jednotlivými β -glukosidasami. Valná většina studovaných β -glukosidas má podjednotkovou hmotnost mezi 55 a 65 kD, kyselé pH optimum (pH 5-6) a vysokou substrátovou specifitu k cukerné složce (viz kap. Substrátová specifita). β -Glukosidasy hub, bakterií, člověka a dvouděložných rostlin byly ve všech studovaných případech glykosylovány, zatímco P-glukosidasy jednoděložných (kukuřice a čirok) nikoli. p-Glukosidasy dvouděložných rostlin jsou lokalizovány na buněčné stěně^{2,3}, nebo v proteinových tělískách⁴, zatímco u jednoděložných rostlin byly lokalizovány tyto enzymy v plastidech⁵⁻⁷. U savců je možné nalézt p-glukosidasy jak v cytosolu jako rozpustný enzym, tak v lysozomu (viz výše).

2. Mechanismus katalýzy

Z celé škály experimentů na různých β -glukosidasách, zahrnující krystalografické studie, místně řízenou mutagenezu, afinitní značení, chemické modifikace a jiné, jejichž příklady budou popsány v následujícím textu, byl zkonstruován model mechanismu katalýzy těchto enzymů. V tom-

to modelu hrají klíčovou roli dva kyselé aminokyselinové zbytky (Asp/Glu), které v průběhu katalýzy vystupují jako pár kyselina a aniont/nukleofil. β -Glukosidasy společně s celulasami, cellobiohydrolasami a xylanasami, jsou enzymy zachovávající při hydrolýze substrátu jeho anomerní konfiguraci⁸. Z čistě mechanistického pohledu je na ně proto pohlíženo jako na enzymy pracující „s dvojím přeskupením substrátu”. Tento mechanismus (vykreslený na obr. 1) zahrnuje následující znaky⁹:

- kyselá skupina protonuje substrát
- musí být přítomna karboxylová skupina na opačné straně cukerného kruhu, než je necukerná složka substrátu
- tato karboxylová skupina atakuje substrát za vzniku kovalentního intermediátu, který by se dal popsat jako adukt glykosyl-enzym a ve kterém má sacharid opačnou anomerní konfiguraci než výchozí sloučenina
- tento adukt vzniká v obou směrech přes tranzitní stav zahrnující oxokarboniový iont



Obr. 1. Předpokládaný mechanismus hydrolýzy β -glukosidů. Na nákrese je vidět princip enzymové reakce s dvojím přeskupením substrátu. V první části reakce se mění původní anomerní konfigurace substrátu. V druhé se pak uvolňuje produkt s původní anomerní konfigurací. Obrázek byl volně převzat z (Esen A.; 1993)

- dále tento mechanismus zahrnuje různé nekovalentní vazby přizpůsobující a stabilizující jednotlivé tranzitní stavy.

Jedním z prvních a nejpřesvědčivějších důkazů o přítomnosti kyselých karboxylových skupin fungujících jako katalyzátor a aniont/nukleofilu stabilizujícího tranzitní stav, se stala rentgenová strukturní analýza krystalu lysozymu ze slepičího vaječného bílku (HEWL). Glu35 byl u tohoto enzymu identifikován jako donor protonů v průběhu katalýzy, zatímco Asp52 stabilizoval oxoniový tranzitní stav^{10,11}. Navíc výše uvedená funkce Glu35 byla doložena výsledky místně řízené mutagenese¹². Také v mnohých kinetických studiích byla potvrzena přítomnost jak kyselého katalyzátoru, tak stabilizujícího aniont/nukleofilu. Při studiích závislosti aktivity β -glukosidas na pH byly ve všech případech naměřeny křivky ve tvaru zvonu, což indikovalo přítomnost dvou ionizovatelných skupin. Odpovídající hodnoty pK, vypočítané z těchto křivek se pohybovaly v rozmezí 3,2–4,4 pro kyslejší skupinu a 5,3–6,9 pro bazičtější.

V případě skupiny s nižší hodnotou pK se jednoznačně jedná o karboxylovou kyselinu. V případě skupiny s vyšší vypočtenou pK hodnotou však tyto studie neposkytly jednoznačnou odpověď, i když výsledky podrobnějších kinetických studií naznačují, že i druhou ionizovatelnou skupinou je opět karboxyl¹³. Roli aniontu/nukleofilu by však mohl hrát i histidinový boční řetězec. Proti této teorii však kromě rentgenostrukturních studií silně hovoří výsledky chemických modifikací. Při těchto experimentech byl použit diethylpyrokarbonát k modifikaci všech histidinových zbytků přítomných v celulase ze *Saccharomyces communis*¹⁴ a xylanase¹⁵ bez negativního vlivu na aktivitu enzymů. Také výsledky ireverzibilní inhibice P-glukosidasy a celulasasy ze 5. *commune* přechodnými kovy je dalším v řadě důkazů o přítomnosti katalytického karboxylu v aktivním centru. V tomto případě se pravděpodobně jedná o chelatační efekt karboxylu v aktivním centru¹⁶. Další analýzy krystalových struktur xylanasy z rodiny F, (1-3)-(i-glukanasy a dalších, opět potvrdily domněnku, že aktivní centrum těchto enzymů je tvořeno párem karboxylů. Všechny tyto enzymy reprezentují strukturu osmičteného α/β -barelu, přičemž aktivní centrum tvoří dva zbytky kyseliny glutamové umístěné ve smyčkách na C-konci p-řetězců čtyři a sedm¹⁸. Ještě více údajů o aktivním centru těchto enzymů bylo získáno kombinací výsledků RTG-analýzy, chemických modifikací a inhibičních studií na příkladu β -glukanasy z ječmene. Funkční enzym vyžaduje dokonce čtveřici ionizovatelných aminokyselin v aktivním centru. Mechanismus katalýzy je zde založen opět na páru glutamových kyselin (v pozicích 231 a 288). K iniciaci hydrolýzy jsou u tohoto enzymu však ještě esenciální dvě další aminokyseliny Glu279 a Lys282, jejichž ionizovatelné boční řetězce jsou nezbytné ke štěpení substrátu. Mechanismus jejich vlivu na enzymovou aktivitu není zatím uspokojivě vysvětlen¹⁹.

Experimentální důkazy uvedené v předchozím textu podporují model katalýzy „s dvojným přeskupením substrátu“²⁰ všeobecně akceptovaný v případě β -glukosidas zachovávajících anomerní konfiguraci substrátu a produktu, který je vyobrazený na obr. 1.

3. Rostlinné p-glukosidasy

3.1. Substrátová specifita

β -Glukosidasy obecně mají takřka absolutní požadavky na cukernou složku substrátu (tj. glukosu a v mnohem

menším měřítku jsou schopny využívat jako substrátu fukosidy či galaktosidy). Navíc P-glukosidasy ze zcela odlišných zdrojů vykazují významnou podobnost týkající se substrátové specifity k cukerné složce a některým nefyziologickým aglykonům (například nitrofenoly nebo umbeliferon)²¹. V dřívějších dobách převládal názor, že β -glukosidasy jsou enzymy, jejichž substrátová specifita vůči aglykonu je velmi nízká. V mnohých případech byl částečně purifikován enzym, který byl schopen štěpit celou řadu strukturně velmi odlišných β -glukosidů. Tato špatná interpretace byla způsobena podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi jednotlivých enzymů a byla opravena až v době zavedení účinnějších dělicích technik (např. dvojrozměrná elektroforéza ap.), kdy enzymové preparáty se zdánlivě nízkou substrátovou specifitou byly rozděleny na několik frakcí preferujících jen určité substráty. Jedním příkladem za všechny nám může být emulsin z mandlí, který byl později identifikován jako směs dvou enzymů s vysokou substrátovou specifitou (podrobnosti o tomto enzymu jsou popsány v odstavci pojednávajícím o kyanogenezi).

3.2. Nejdůležitější biochemické cesty, v nichž hrají p-glukosidasy u rostlin klíčovou roli

Rostlinné p-glukosidasy jsou známy již přes 150 let, kdy byla poprvé popsána hydrolýza amygdalinu (kyanogenního glukosidu z mandlí) emulsinem (β -glukosidasa z mandlí). Od té doby byla prokázána, či předpokládána přítomnost β -glukosidas v mnoha klíčových fyziologických procesech rostlin, od funkcí spojených s obranyschopností rostlin proti některým patogenům a býložravcům, přes uvolňování kumarinů, thiokyanátů, terpenů a kyanidu, až po hydrolýzu konjugátů rostlinných hormonů. Přes prokazatelně důležitou roli, kterou tyto enzymy hrají v rostlinném světě, byla věda až příliš skoupá na informace o tomto druhu enzymů. Proto bude ještě třeba mnohých informací, abychom dokázali zcela pochopit a docenit existenci těchto enzymů u rostlin.

3.2.1. Rostlinný obranný systém

Rostliny produkují celou škálu sekundárních metabolitů, z nichž mnohé jsou nadány fungicidními vlastnostmi. Některé z těchto látek jsou syntetizovány i skladovány ve zdravých rostlinách v jejich aktivní formě. Jiné, jako kyanogenní glukosidy, glukosinoláty apod. se vyskytují

v rostlinách v inaktivní konjugované formě, a k jejich aktivaci dochází teprve při poškození pletiva nebo napadení rostlinným patogenem. Aktivace těchto látek většinou zahrnuje rostlinné enzymy, jejichž uvolnění je výsledkem poškození pletiva²². O některých takovýchto enzymech, uvolňujících aktivní látky rostlinného obranného systému z jejich inaktivních glukosidů, bude pojednáno v následujících odstavcích.

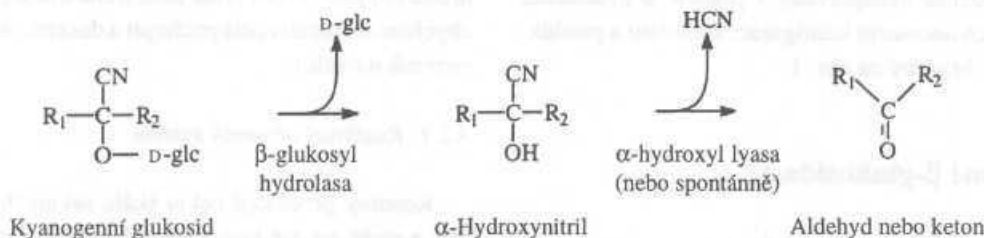
3.2.1.1. Kyanogeneze

Většina rostlinných druhů produkuje malé množství kyanogenních sloučenin pouze jako vedlejší produkt při syntéze ethylenu. Přes 2000 z nich je však schopno produkovat tyto látky v množství dostatečném k tomu, aby mohly sloužit jako přenosná forma redukováného dusíku, respektive jako prekurzory chemických obranných látek proti některým patogenům, případně býložravým živočichům^{23,24}. Kyanovodík se z těchto prekurzorů (většinou kyanogenních glykosidů) uvolňuje účinkem hydrolytických enzymů. Hydrolyza kyanogenních glykosidů je iniciována odštěpením cukerné složky jednou či více β -glykosidasami za vzniku hydroxynitrilu. Ten se pak účinkem specifické lyasy, případně spontánně, rozpadne za vzniku HCN a příslušného aldehydu, či ketonu (viz obr. 2). Kyanid je díky svému silně inhibičnímu vlivu na respirační řetězec toxický většině organismů, rostliny nevyjímaje. Proto je jeho obsah v intaktních rostlinných pletivech nedetegovatelný. Aby mohly rostliny takovýto stav udržet, musí mít rostlina v nepoškozeném pletivu k dispozici systém regulace tvorby toxického HCN. Mechanismus pravděpodobně spočívá v kompartmentaci jak na úrovni buněčné, tak na úrovni vnitrobuněčné^{25,26}. Cukernou složkou kyanogenních glykosidů je ve všech případech glukosa, která však může být modifikována glykosidovou vazbou s dalším monosacharidem, popřípadě tvoří ester. Doposud bylo identifikováno přes 300 kyanogenních glykosidů, repre-

zentujících asi 50 samostatných strukturních typů²⁷. Vzhledem k obrovskému množství těchto látek a jim odpovídajícímu množství specifických hydrolytických enzymů, má smysl uvést jen velmi zhruba pouze ty nejznámější, již zcharakterizované zástupce. Snad nejznámějším a současně prvním popsaným příkladem kyanogenního systému u rostlin se stala před 150 lety směs enzymů se substrátem (*R*)-amygdalinem, známá jako emulsin²⁸. Emulsin je ve skutečnosti směsí dvou enzymů amygdalinhydrolasy a prunazinhylolasy s pravděpodobně velmi vysokou substrátovou specifitou. Podobný systém, skládající se ze tří enzymů, navíc podrobně popsaných, byl nalezen u černé višně²⁹. Plodinou, důležitou ze zemědělského hlediska je cassava (*Manihot esculenta* Cranz)³⁰. Hlavním kyanogenním glykosidem v této plodině je linamarin, který účinkem dvou enzymů linamarasy a hydroxynitrillyasy dá vzniknout HCN a acetonu.

3.2.1.2. Glukosidy derivátů hydroxamové kyseliny jsou také součástí obranného systému rostlin

4-Hydroxy-7-metoxy-1,4-benzoxazin-3-on (DIMBOA) je derivát hydroxamové kyseliny známý svým pesticidním účinkem. Je to velmi reaktivní sloučenina, inaktivující celou řadu enzymů. Tato sloučenina se však vyskytuje ve formě glukosidu v intaktním kukuřičném (*Zea mays* L.) pletivu³¹ a u obilnin³². Struktura tohoto glukosidu je zobrazena na obr. 3a. Mechanismus účinku této látky se zdá být podobný s kyanogenním modelem obrany rostlin proti hmyzu. Po mechanickém poškození pletiva dojde ke smíchání DIMBOA-glukosidu a specifické β -glukosidasy a uvolnění aktivní DIMBOA³³. V poslední době byla studována také funkce hydroxamové kyseliny při napadení rostliny plísněmi. Bylo také zaznamenáno výrazné zvýšení hydrolýzy DIMBOA-glukosidu (nejhojněji se vyskytujícího derivátu hydroxamové kyseliny) u pšenice po napadení jejích kořenů patogenem *Septoria tritici*³⁴.



Obr. 2. Obecné schéma produkce kyanovodíku z jeho prekurzoru- kyanogenního glukosidu. Po enzymatickém odštěpení cukerné části molekuly vzniká nestabilní hydroxynitril, který se rozpadá samovolně, či za katalýzy specifické lyasy na kyanovodík a příslušný aldehyd, nebo keton (volně převzato z Osbourn E.; 1996)

3.2.1.3. Avenakosidy: prekurzory protiplísňových sloučenin

Saponiny jsou látky, které se v poměrně vysoké míře vyskytují ve zdravých rostlinách. Jsou jim připisovány různé funkce, které vesměs souvisí s obranným systémem rostlin. Většinou je jim však přisuzována obranná funkce při plísňovém napadení rostliny. Mechanismus protiplísňového účinku tkví v jejich schopnosti komplexně se vázat s membránovými steroly, čímž se tvoří v membráně póry. Chemicky jsou saponiny glykosylované sloučeniny, které se dají podle necukerné složky dělit do tří základních skupin. Jsou to saponiny, jejichž necukernou složkou jsou triterpenoidy, nebo steroidní glykoalkaloidy. Do třetí skupiny pak patří tzv. avenakosidy (obr. 3b). Tyto látky se nachází především ujednodělozých rostlin a to nejčastěji u rodu oves (*Avena*). Avenakosidy jsou biologicky inaktivní látky, které jsou však při poškození rostlinného pletiva konvertovány na fungicidní saponin. Konverze spočívá v odštěpení molekuly D-glukosy z pozice C-26 specifickou hydrolasou (ovesná avenakosinasa)³⁵ za vzniku saponinu s již zmíněným fungicidním charakterem.

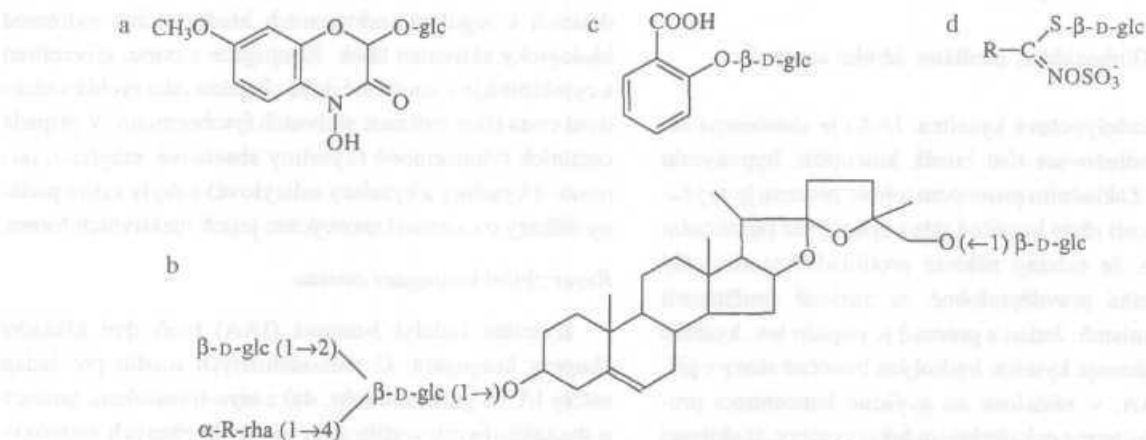
3.2.1.4. β -D-Glukosid kyseliny salicylové: prekurzor signální molekuly rostlinného obranného systému

Kyselina salicylová je jednoduchá chemická sloučenina, která byla po dlouhou dobu považována za nedůležitý produkt celé řady rostlin. Velký zájem soustředila tato látka teprve v době, kdy byl demonstrován její regulační vliv na rostlinnou termogenezi³⁶ a její funkce přirozené signální

molekuly při indukci rostlinného obranného systému³⁷. Salicylová kyselina se nachází v rostlinném pletivu především v konjugované formě jako β -glukosid (obr. 3c). Jeho hydrolýzou β -glukosidasovou aktivitou asociovanou k buněčné stěně tabáku (*Nicotiana tabacum*) se při infekci virem tabákové mozaiky uvolňuje volná kyselina salicylová. Volná kyselina salicylová, případně její aktivní analogy, inhibuje katalasu. Následkem této inhibice se zvýší vnitrobuněčná hladina H_2O_2 . Peroxid návnazně, pravděpodobně v roli druhého posla, indukuje geny zapojené do rostlinné obrany (například „pathogenesis related protein 1“- PR1)^{38,39}.

3.2.1.5. Glukosinoláty

Další skupinou substrátů specifických hydrolas tzv. myrozinas jsou glukosinoláty (glukosidy hořčičného oleje). Jsou to thioglukosidy, vyskytující se hojně v čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), či u, z vědeckého hlediska důležitého, plevele huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Hlavní zájem o tyto thioglukosidy spočívá v jejich schopnosti odpudit jak býložravé obratlovce, tak škůdce z řad bezobratlého hmyzu. Mechanismus uvolnění aktivních látek z biologicky neaktivních glukosinolátů je obdobný jako glukosidů saponinů či u kyanogenních glukosidů. Glukosinoláty jsou aktivovány při poškození rostlinného pletiva. Enzym myrozinasa, který je pravděpodobně v inaktivním pletivu oddělen od svého substrátu vnitrobuněčnou kompartmentací, při poškození štěpí thioglykosidickou vazbu. Nestabilní aglykon se může dále přeměnit na celou řadu produktů. Všechny tyto produkty, mezi nimiž nalézáme též isothiokyanáty, thiokyanáty a organické



Obr. 3. **Struktury základních typů sloučenin zapojených do chemického obranného systému rostlin (podrobnosti viz text).** a) V přírodě se nejčastěji vyskytující derivát hydroxamové kyseliny DIMBOA-glukosid, b) zástupce avenakosidů: Avenakosid A, c) salicyl- β -D-glukosid, d) struktura glukanosilátů (thioglukosidů)

nitrily, jsou velmi reaktivními látkami. Přesto, že není přesně znám mechanismus jejich účinků, *in vitro* byl u těchto produktů hydrolýzy glukosinolatů prokázán jejich výrazný antifungicidní charakter^{40 41}.

3.2.2. Degradace buněčné stěny

V průběhu klíčení a dalšího růstu rostliny, jako ječmene či jiné obilniny, využívají zásob škrobu v endospermu. V průběhu růstu klíčků dochází k degradaci škrobu amylasami za vzniku maltosy a dextrinů⁴². V celém procesu degradace škrobu je zapojeno velké množství enzymů, kterých aktivita je kontrolována několika cestami. V aleuronu *a/nebo* ve skutelu se v průběhu klíčení syntetizují proteasy, peptidasy a amylasy. Tyto enzymy se však ke svému zásobnímu substrátu dostanou až po degradaci buněčné stěny buněk endospermu⁴³. Takže právě tato degradace je limitujícím krokem při aktivaci zásobních látek v endospermu. Degradace buněčné stěny je sama také nezanedbatelným zdrojem sacharidů pro klíčící semena. Totální hydrolýza β -glukanu je výsledkem několika enzymových aktivit. Několik specifických endoglukanas rozštěpí polysacharidy na směs oligosacharidů. Ty jsou pak dále degradovány β -glukosidasovou aktivitou⁴⁴. Příkladem takovéto β -glukosidasové aktivity je enzym BGQ60 izolovaný z ječmene. Tato β -glukosidasa se akumuluje ve vyvíjejícím se klíčku ječmene, kde je pravděpodobně zodpovědná za degradaci několika polysacharidů ze stěny buněk endospermu. K totální hydrolýze hlavních polysacharidů stěny buněk zásobního endospermu v klíčcích ječmene za vzniku volné glukosy je tedy třeba souhry endo-(1-3,1-4)-(3-glukanas a BGQ60 (cit.⁴⁵).

3.2.2.1. β -Glukosidasa: mediátor účinku auxinu?

Auxin (indolyloctová kyselina, IAA) je sloučenina indukující prodlužovací růst buněk koleoptili, hypokotylu a epikotylu. Základním principem tohoto procesu je zvyšování schopnosti růstu buněčné stěny způsobené působením IAA. Přesto, že existují některé protikladné teorie, celý proces probíhá pravděpodobně na základě součinnosti dvou mechanismů. Jeden z procesů je popsán tzv. kyselou teorií, jež zahrnuje kyselou hydrolýzu buněčné stěny v přítomnosti IAA, v závislosti na zvýšené koncentraci protonů⁴⁶. Druhá teorie pak sleduje indukci syntézy, či aktivaci enzymů zodpovědných za hydrolýzu buněčné stěny. Při účinku auxinu na hypokotyl *soji* byl zaznamenán vzrůst hladiny mRNA, schopné translace⁴⁷. Ve frakci proteinů

z buněčné stěny epikotylu *cizrny* beraní (*Cicera arietinum*) vystaveného po dobu jedné hodiny účinkům IAA byl zaznamenán vzrůst aktivit β -glukosidas a α/β -galaktosidas o 65-70 % oproti kontrole. Po čtyřech hodinách inkubace epikotylů s IAA nebyla zaznamenána významná změna uvedených aktivit. Naproti tomu na elektroforegramu po SDS-PAGE nebyla zaznamenán markantní rozdíl po jednotlivé inkubaci, zatímco u vzorků inkubovaných s IAA byl zaznamenán viditelný vzrůst obsahu β -glukosidas (66 kDa) a některých dalších enzymů⁴⁸. Přes jistým způsobem rozporuplné výsledky uvedených experimentů lze očekávat zjištění, že v procesu prodlužovacího růstu buněk indukovaného IAA hraje β -glukosidasa spolu s dalšími glykanhydrolýtickými enzymy důležitou roli.

3.2.3. Další funkce (uvolňování flavonů a flavonoidů, či fytohormonů)

3.2.3.1. Hydrolýza fytohormonálních konjugátů

Fytohormony jsou přirozeně se vyskytující skupina organických sloučenin, které jsou schopny ve velmi nízkých koncentracích regulovat nejrůznější fyziologické procesy u rostlin. Kontrola relativních koncentrací jednotlivých fytohormonů v daném vývojovém stádiu a v daném rostlinném pletivu je jedním z mechanismů předurčujících jejich biologickou aktivitu. Existuje několik mechanismů kontroly koncentrace jednotlivých fytohormonů. Patří sem *de novo* syntéza, respektive degradace biologicky aktivních fytohormonů a též jejich konjugace jinými metabolity. Právě reverzibilní konjugace rostlinných hormonů by mohla být jedním ze základních fyziologických a biochemických procesů vedoucích k regulaci endogenních hladin těchto extrémně biologicky aktivních látek. Konjugace auxinu, gibberelinů a cytokininů je v současné době chápána jako rychlá a efektivní cesta (i) mobilizace aktivních fytohormonů. V případě ostatních fytohormonů (kyseliny abscisové, ethylen, jasmonové kyseliny a kyseliny salicylové) nebyly zatím podány důkazy o existenci takovýchto jejich inaktivních forem.

Reverzibilní konjugace auxinu

Kyselina indolyl-3-octová (IAA) tvoří dvě základní skupiny konjugátů. U jednoděložných rostlin převládají estery IAA s glukosou (obr. 4a) a *myo*-inositolem, zatímco u dvouděložných rostlin jsou to amidy různých aminokyselin⁴⁹. Konjugace je jedním z mechanismů, které popisuje tzv. teorie hormonální homeostasy⁵⁰. Ta předpovídá, že volná IAA se uvolňuje z jejich esterů v závislosti na envi-

ronmentálních stimulech, v množství odpovídajícím potřebám rostlinného růstu a vývoje. Důkaz této teorie byl získán při charakterizaci genu *rolB* z T₁-DNA rostlinného patogena *Agrobacterium rhizogenes*. Produkt tohoto genu byl charakterizován jako β -glukosidasa štěpící indoxyl-glukosidy⁵¹. Při tranzientní expresi tohoto genu u transgenních rostlin došlo k drastickým změnám v rostlinném růstu a vývoji. Přesto, že byl později podán důkaz, že tento enzym není schopen hydrolyzovat IAA-glukosidy⁴², převládá názor, že IAA-glukosidy by mohly fungovat jako regulační článek relativního množství volné a esterifikované IAA (cit.⁵³).

Konjugáty cytokininů

Cytokiny, tak jako auxiny, jsou relativně jednoduché organické sloučeniny vystavené na základě adeninového skeletu, které již ve velmi malých koncentracích vyvolávají drastické změny rostlinného růstu a vývoje. Nejhojněji se vyskytujícím cytokininem je zeatin (N-(A--isopentenyl)-adenin). Ke konjugaci dochází na atomech dusíku v polohách 7 a 9 purinového kruhu a na hydroxyskupině isopentenylového bočního řetězce (obr. 4b). Cytokiny rostlinám dodávané jsou konvertovány do několika glykosidických metabolitů⁵⁴. O-Glukosidy cytokininů jsou považovány za metabolicky aktivní zásobní formu těchto hormonů. Tyto glukosidy jsou také nejhojněji se vyskytující forma cytokininů v rostlinných pletivech. Z těchto sloučenin po jejich přesunutí do cílového místa, pak mohou být β -glukosidasou jednoduše uvolněny biologicky aktivní formy⁵⁵.

Produktem genu *rolC* T-DNA z *Agrobacterium rhizogenes* je β -glukosidasa, schopná uvolňovat cytokiny z jejich glukosidů v transgenním tabáku⁵⁶. Z klíčků kukuřice byla izolována cDNA *Zm-p60.1* kódující β -glukosidasu. Tento enzym štěpí cytokinin-O-glukosidy a kinetin-N3-glukosid, zatímco cytokinin-N7 a N9-glukosidy, stejně tak

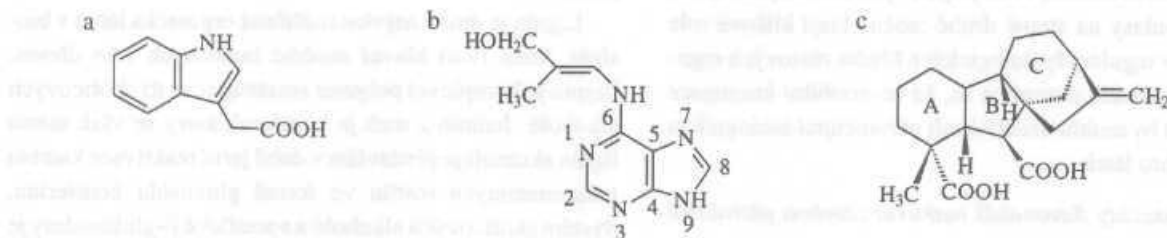
jako IAA-estery nebyly tímto enzymem štěpeny. Protoplasty transgenního tabáku, tranzientně exprimující *Zm-p60.1*, byly schopny iniciovat buněčné dělení po přidavku zeatin-O-glukosidu, respektive kinetin-N3-glukosidu. *Zm-p60.1* byla lokalizována v meristematických buňkách a její funkce by mohla spočívat v zásobování vyvíjejícího se kukuřičného embrya aktivním cytokininem⁵⁷. Ve vyvíjejícím se pletivu řepky olejky (*Brassica napus*) byla lokalizována i další (3-glukosidasa, jejímž fyziologickým substrátem se zdá být zeatin-O-glukosid⁵⁸. Tato β -glukosidasa vykazuje vysokou sekvenční podobnost s kukuřičným enzymem (44 %). Přes nutnost provedení dalších analýz je možné předpokládat podobnou funkci obou uvedených enzymů.

Konjugáty giberelinů

Gibereliny jsou isoprenoidní terpenoidy (obr. 4c), kterých bylo v houbách, meších, kapradinách a vyšších rostlinách identifikováno více než 80 (cit.⁵⁹). Tyto sloučeniny jsou zapojeny v nejrůznějších procesech rostlinného růstu a vývoje, především pak v procesu kvetení, tvorby plodů a klíčení semen. Gibereliny nejčastěji tvoří konjugáty s glukosou. Ta se váže na hydroxyskupiny giberelinů za vzniku příslušného glukosidu, respektive na karboxyskupinu, za vzniku příslušného esteru. V případě esterů se pravděpodobně jedná o finální inaktivaci giberelinů, zatímco glukosidy mohou zpětně poskytovat, v závislosti na výskytu specifických β -glukosidas, biologicky aktivní gibereliny. Reverzibilita této reakce nabádá k myšlence, že konjugace giberelinů je zásobním mechanismem, respektive slouží k regulaci půlu aktivních giberelinů u rostlin⁶⁰.

3.2.3.2. Hydrolýza konjugátů flavonoidů

Flavonoidy jsou patnáctiuhlíkaté sloučeniny patřící mezi sekundární metabolity, obecně velmi rozšířené v říši



Obr. 4. Struktury základních typů fytohormonů tvořících v rámci rostlinného mechanismu glukosidy či estery s glukosou (podrobnosti viz text); a) nejznámějším auxinem a současně také nejstudovanějším je indolyl-3-octová kyselina tvořící, pomocí své karboxylové skupiny, estery s glukosou nebo myo-inositolem, b) *trans*-zeatin, nejznámější cytokinin, tvořící N-glukosidy v polohách 3, 7 a 9 a O-glukosidy na hydroxylu isopentenylového řetězce, c) gibereliny jsou látky vystavené na základě gibberanového skeletu substituované celou řadou skupin. Jako příklad je uveden giberelin GA₁₂

roślin. U většiny rostlin tvoří tyto látky součást pigmentů. Právě kvůli jejich barevnosti byly dlouhou dobu považovány za pouhé atraktanty, respektive za látky schopné zabránit poškození rostlinného genetického materiálu způsobenému UV-zářením⁶¹. Kromě jejich pigmentační funkce však byla jejich přítomnost implikována v některých důležitých biochemických procesech. Jsou součástí obranného systému proti fytopatogenům, proti hmyzu a také fungují při regulaci transportu auxinů. Na několika příkladech byl prokázán rozdílný efekt přítomnosti konjugovaných a nekonjugovaných flavonoidů. Tak například anthokyaniny jsou sloučeniny patřící mezi flavonoidy hojně se vyskytující u rostlin. Při porovnání jejich kapacity coby lapačů volných radikálů byl prokázán silný vliv glukosylace těchto sloučenin. I v tomto případě by mohla hrát deglukosylace svoji roli v procesu regulace hladiny lapačů volných radikálů⁶².

V současné době je známo již několik β -glukosidas specificky štěpících glykosidickou vazbu konjugátů flavonoidů. Dlouho je známa β -glukosidasa z *Cicer arietinum* L. Při kinetických studiích byl identifikován její fyziologický substrát isoflavon-7-O-glukosid ($K_m = 2 \cdot 10^{-5}$ M) (cit.⁶³). β -Glukosidasy zodpovědné za štěpení glukosidických vazeb konjugovaných flavonoidů se vyznačují vysokou specificitou ke svému substrátu. U cibule byly identifikovány dvě specifické p-glukosidas, jedna štěpící flavonol-4-O- a druhá flavonol-3-O-glukosidy⁶⁴. Při studiu obsahu flavonoidů a specifických hydrolas heřmánku (*Chamomilla recutita*) a příbuzných druhů *Matricaria* a *Anthemis* byla nalezena zajímavá koincidence akumulacího profilu derivátů apigeninu a výskytu katabolické P-glukosidas⁶⁵.

Kromě toho, že některé konjugáty flavonoidů hrají roli sustrátů β -glukosidas, byly také některé flavonoidy identifikovány jako velmi silné a specifické inhibitory těchto enzymů⁶⁶. Vzhledem k faktu, že flavonoidy na jedné straně mohou ovlivnit například fertilitu pylu a zasahují do regulace transportu auxinu, či do jiných výše uvedených funkcí a p-glukosidas na straně druhé možná hrají klíčové role například v regulaci fyziologických hladin růstových regulatorů, je nasnadě domnívat se, že reverzibilní konjugace flavonoidů by mohla uzavřít kruh ohraničující biologickou funkci těchto látek.

Jsou β -glukosidy flavonoidů inaktivní zásobou aktivátorů genů nod?: mýty a skutečnost...

Leguminózní rostliny jsou rostliny schopné symbiozy s bakteriemi rodu *Rhizobium*. Při této symbióze se uplatňují mimo jiné jako signální molekuly flavonoidy. Kořeny infikované bakterií produkují zpětně flavonoidy, schopné

indukovat bakteriální geny *nod*. Vůči těmto flavonoidům také projevují bakterie pozitivní chemoatraktanci. Vzhledem k tomu, že u rostlin nezaočkovaných symbiotickou bakterií byly nalezeny glukosidy flavonoidů, vyvstala otázka, zda flavonoidy schopné indukovat geny *nod* jsou produkty β -glukosidasové aktivity, nebo zda šlo o produkty *de novo* syntézy. Exudáty kořenů a semen vojtěšky (*Medicago sativa* L.) jsou schopny indukovat nodulační geny *nod* bakterie *Rhizobium meliloti*. Při testech biologické aktivity jednotlivých derivátů luteolinu byla zaznamenána vysoká aktivita samotného luteolinu, avšak jeho glukosidy a jiné deriváty měly schopnost indukce *nod* genů výrazně redukovány. navíc tato aktivita derivátů luteolinu je pravděpodobně asociována s degradací těchto látek na luteolin a chryzoeriol⁶⁷. Zaočkování vikve seté (*Vicia sativa nigra*) bakterií *Rhizobium leguminosarum viciae* podstatně zvyšuje schopnost vikve indukovat geny *nod*, zodpovědné za kořenovou nodulaci. Při analýze hlavních flavonoidů v kořenech vikve seté před a po naočkování bakterií *Rhizobium leguminosarum viciae* byly identifikovány čtyři 3-O-glykosidy flavonoidu kaempferolu. V kořenech sedmidenních klíčků vikve však nebyla nalezena kaempferol-glykosidasová aktivita⁶⁸. Toto zjištění, současně s faktem, že kaempferol samotný je účinným inhibitorem aktivovaného stavu *nod* genů ukazuje spíše, že flavonoidy uvolňované z kořenů leguminózních rostlin a indukující bakteriální geny *nod* jsou produktem *de novo* syntézy a ne hydrolýzy již existujícího půlu glykosidů.

3.2.4. Další pochody, v nichž jsou zapojeny β -glukosidas

Kromě již uvedených funkcí hrají P-glukosidas svoji roli ještě v mnohých dalších procesech metabolismu rostlin. Tyto budou v dalším textu zevrubně popsány bez toho, že bych zacházel do detailů a popisů souvislostí těchto procesů.

Lignin je druhá nejvíce rozšířená organická látka v biosféře, která tvoří hlavní součást buněčných stěn dřevin. Lignin je komplexní polymer sestávající ze tří skořicových alkoholů. Jedním z nich je koniferol, který se však mimo lignin akumuluje především v době jarní reaktivace kambia nahosemenných rostlin ve formě glukosidu koniferinu. Systém skořicových alkoholů a specifické P-glukosidas je považován za klíč k lignifikaci (dřevnatění). V průběhu lignifikace dochází ke štěpení glykosidické vazby, přičemž volné skořicové alkoholy polymerují za vzniku ligninu⁶⁹. Výzkum tohoto systému v xylému pinie (*Pinus contorta*) vedl k objevení p-glukosidas hydrolyzující přirozený sub-

strát koniferin. Pomocí *in situ* lokalizace byl lokalizován výskyt jak β -glukosidasové aktivity, tak reakčních produktů v zóně rychle se diferencujícího a lignifikujícího xylému. Navíc koniferin-specifická β -glukosidasa byla lokalizována s peroxidasou, která je zapojena v závěrečném kroku polymerace ligninu⁷⁰. Podobný enzym byl vyizolován z cytoplazmy jiného druhu borovice bankovka (*Pinus banksiana*). Tento enzym je schopen hydrolyzovat E-koniferin na *trans*-koniferol⁷¹.

Limonoidy jsou triterpenoidní látky, vyskytující se pouze u omezeného počtu rostlinných druhů. Tyto látky se podílí na hořké chuti citrusových plodů. Z tohoto hlediska je těmto látkám připisován velký, především průmyslový a potravinářský význam. Méně je toho už známo o biologické funkci těchto látek. Při měření obsahu limonoidů v semenech citrónu (*Citrus limon*) bylo identifikováno velké množství limonoid-17- β -D-glukopyranosidu, zatímco v mladých klíčcích těchto rostlin nebyly glukosidy prakticky detegovány. β -Glukosidasová aktivita, zodpovědná za hydrolyzu glykosidů v mladých klíčcích citrusu, byla charakterizována pomocí experimentů se značeným substrátem⁷². Přestože nebyla tato β -glukosidasa izolována a její funkce podrobně studována, je oprávněné se domnívat, že tento enzym má své nezaměnitelné místo v procesu klíčení semen citrusových rostlin.

Nezanedbatelnou funkci mají glukosidasy ve druhé fázi posttranslačních úprav N-vázaných glykoproteinů. V první fázi tohoto procesu dochází k syntéze $\text{Clc}_3\text{-Man}_9(\text{GlcNAc})_2\text{-PP-dolicholu}$ v endoplazmatickém retikulu. Tento intermediát slouží dále jako donor při přenesení oligosacharidu na specifický arginin daného proteinu, stále ještě vázaného na ednoplazmatickou membránu. Ve druhé fázi pak dochází v celé řadě reakcí a k následným úpravám těchto N-vázaných oligosacharidů. Tato reakce byly velmi podrobně studovány u živočišných buněk, zatímco u rostlin je o nich známo jen málo a jen některé enzymy byly částečně purifikovány⁷³. Příkladem je glukosidasa II ze skočce. Tato α -glukosidasa je klíčovým enzymem maturace N-vázaných glykoproteinů⁷⁴.

Již z výše uvedeného textu vyplývá, že β -glukosidasy jsou u rostlin velmi rozšířené enzymy s vysokou substrátovou specifitou, které se účastní mnoha biochemických pochodů rostlinného metabolismu. Kromě výše uvedených enzymů však byla objevena celá řada dalších β -glukosidas, jejichž biologická funkce v rostlinném metabolismu zůstává i nadále zastřena rouškou tajemství. Mezi takové již částečně popsané enzymy patří například β -glukosidasa z *Costus speciosus* specifická k furostanol-glykosidu⁷⁵.

Aktivita tohoto enzymu byla zaznamenána při mechanickém zpracování semen, avšak o její biologické funkci lze pouze spekulovat.

LITERATURA

1. S podporou grantu MSMT r.c. VS96096 a grantu AV CR (#A5004603, B B.).
2. Kakes P.: *Planta* 766, 156 (1985).
3. Frehner M., Conn E. E.: *Plant Physiol.* 84, 1296 (1987).
4. Swain E., Li C. P., Poluton J. E.: *Plant Physiol.* 100, 291 (1992).
5. Thayer S. S., Conn E. E.: *Plant Physiol.* 67, 617 (1981).
6. Nisus A., Rupel H. G.: *Planta* 171, 443 (1987).
7. Esen A.: *Plant Physiol.* 98, 174 (1992).
8. Gebler J., Gilkes N. R., Claeysens M., Wilson D. B., Béguin P., Wakarchuk W. W., Kilburn D. G., Miller Jr. R. C., Warren R. A. J., Withers S. G.: *J. Biol. Chem.* 267, 12559 (1992).
9. Sinnott M. L.: *In Enzyme Mechanisms*. Royal Society of Chemistry, London 1987.
10. Blake C. C. F., Mair G. A., North A. T. C., Phillips D. C., Sarma V. R.: *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B.*, 767, 365 (1967).
11. Imoto T., Johnson L. N., North A. T. C., Phillips D. C., Rupley J. A., v knize: *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), sv. VII. Academic Press, New York and London 1972.
12. Anand N. N., Stephen E. R., Narang S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 862 (1988).
13. Clarke A. J., Bray M. R., Strating H., v knize: *β -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology* (Esen A., ed.), str. 1. American Chemical Society, Washington, DC 1993.
14. Clarke A. J., Yaguchi M., *Eur. J. Biochem.* 149, 233 (1985).
15. Bray M. R., Clarke A. J.: *Biochem. J.* 270, 91 (1990).
16. Clarke A. J.: *Biochim. Biophys. Acta* 1040, 145 (1990).
17. Clarke A. J., Adams L. S.: *Biochim. Biophys. Acta* 976, 213 (1987).
18. Jenkins J., Legio L. L., Harris G., Pickersgill R.: *FEBS Lett.* 362, 281 (1995).
19. Chen L., Garret T. P. J., Fincher G. B., Hoj P. B.: *J. Biol. Chem.* 270, 8093 (1995).
20. Koshland D. E.: *Biol. Rev.* 28, 416 (1953).
21. Esen A., v knize: *β -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology* (Esen A., ed.), str. 14. American Chemical Society, Washington, DC 1993.

22. Osbourn A. E.: *Plant Cell* 8, 1821 (1996).
23. Kakes P.: *Euphytica* 48, 25 (1990).
24. Poulton J. E.: *Plant Physiol.* 94, 401 (1990).
25. Poulton J. E., v knize: *Cyanide Compounds in Biology* (Evered D., Harnett S., ed.), Proceedings of the CIBA Foundations Symposium 140. John Wiley, Chichester 1986.
26. Poulton J. E., Li C. P.: *Plant Physiol.* 104, 29 (1994).
27. Davis R. H., v knize: *Toxic Substances in Crop Plants* (D'Mello J. P., Duff's C. M., Duff's J. H., ed.). Royal Society of Chemistry, Cambridge 1991.
28. Liebig J., Wohler F.: *Annalen* 22, 11 (1837).
29. Poulton J. E.: β -*Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology* (Esen A., ed.). American Chemical Society, Washington, DC 1993.
30. McMahon J. M., White W. L. B., Sayre R. T.: *J. Exp. Bot.* 46, 731(1995).
31. Hofman J., Hofmanova O.: *Phytochemistry* 10, 1441 (1971).
32. Cuevas L., Niemeyer H. M.: *Phytochemistry* (Oxford) 54,983(1993).
33. Babcock G. D., Esen A.: *Plant Sci.* 101, 31 (1994).
34. Weibull J., Niemeyer H. M.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47, 201 (1995).
35. Gus-Mayer S., Brunner H., Schroeder-Poetsch H. A. W., Rudiger W.: *Plant Mol. Biol.* 26, 909 (1994).
36. Raskin I., Ehmann A., Melander W. R., Meeuse B. D. J.: *Science* 237, 1601(1987).
37. Malamy J., Klessig D. J.: *Plant J.* 2, 643 (1992).
38. Chen Z., Malamy J., Henning J., Conrath U., Sanchéz-Casas P., Silva H., Ricogliano J., Klessig D. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4134 (1995).
39. Seo S., Ishizuka K., Ohashi Y.: *Plant Cell Physiol.* 36, 447 (1995).
40. Chew F. S., v knize: *Biologically Active Natural Products-Potential Use in Agriculture* (Cutler H. G., ed.), Proceedings of the ACS Symposium 380. American Chemical Society, Washington, DC 1988.
41. Mithen R.: *Euphytica* 63, 71 (1992).
42. Fincher G. B., Stone B. A., v knize: *Barley: Chemistry and Technology* (MacGregor A. W., Bhattay R. S., ed.). AACC, Inc. St. Paul, MN 1993.
43. MacGregor A. W., Fincher G. B., v knize: *Barley: Chemistry and Technology* (MacGregor A. W., Bhattay R. S., ed.). AACC, Inc. St. Paul, MN 1993.
44. Stone B. A., Clarke A. E., v knize: *Chemistry and Biology of (1-3)- β -Glukans* (Stone B. A., Clarke A. E., ed.). La Trope University Press, Victoria, Australia 1992.
45. Leah R., Kigel J., Svendsen I., Mundy J.: *J. Biol. Chem.* 270, 15789 (1995).
46. Kutchera U.: *Phytology* 126, 549 (1994).
47. Bevario D., Giani S., di Vietri P., Corragio I.: *Plant Physiol.* 98, 488 (1992).
48. Dopico B., Nicolas G., Labrador E.: *J. Plant Physiol.* 137, 477 (1991).
49. Cohen J. D., Bandurski R. S.: *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 403 (1982).
50. Bialek K., Cohen J. D.: *Plant Physiol.* 91, 775 (1989).
51. Estruch J. J., Schell J., Spena A.: *EMBO J.* 10, 3125 (1991).
52. Spena A., Estruch J. J., Hansen G., Langenkemper K., Berger S., Schell J., v knize: *Advances in Molecular Genetics of Plant-microbe Interactions* (Nester E. W., Verma D. P. S., ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1992.
53. Kowalczyk S., Bandurski R. S.: *Plant Physiol.* 94, 4 (1990).
54. Letham D. S., Palni L. M. S.: *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34, 163 (1983).
55. Smith R. A., Van Staden J.: *J. Exp. Bot.* 29, 1067 (1978).
56. Estruch J. J., Chriqui D., Grossman K., Schell J., Spena A.: *EMBO J.* 10, 2889 (1991).
57. Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell I., Palme K.: *Science* 262, 1051 (1993).
58. Falk A., Rask L.: *Plant Physiol.* 108, 1369 (1995).
59. Schneider G., v knize: *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins* (Cozier A., ed.). Praeger, New York 1983.
60. Schneider G., Schmidt J., v knize: *Plant Growth Substances* (Pharis R. P., Rood S. B., ed.). Springer Verlag, Heidelberg 1990.
61. Stapleton A. E., Walbot V.: *Plant Physiol.* 105, 881 (1994).
62. Wang H., Cao G.H., Prior R.L.: *J. Agricult. Food Chem.* 45, 304 (1997).
63. Hosel W., Barz W.: *Europ. J. Biochem.* 57, 607 (1975).
64. Tsushida T., Svzuki M.: *J. Jpn Soc. Food Sci. Technol. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* 43, 642 (1996).
65. Maier R., Carle R.: *Planta Med.* 59, 436 (1993).
66. Kopčiková Y., Rotrekl V., Suchý V., Brzobohatý B.: *Chem. Listy* 90, 599 (1996).
67. Hartwig U. A., Maxwell A., Joseph C. M., Phillips D. A.: *Plant Physiol.* 7990, 92.
68. Recourt K., Verkerke M., Schripsema J., van Brussel

- A. A. N., Lugtenberg B. J. J., Kijne J. W.: *Plant Mol. Biol.* 18, 505 (1992).
69. Savidge R. A.: *Canad. J. Bot.* 67, 2663 (1989).
 70. Dharmawardhana D. P., Ellis B. E., Carlson J. E.: *Plant Physiol.* 707, 331(1995).
 71. Leinhos V., Udagama-Randeniya P. V., Savidge R. A.: *Phytochem. (Oxford)* 1994, **311**.
 72. Ronneberg T. A., Hasegawa S., Suhayda C., Ozaki Y.: *Phytochemistry* 39, 1305 (1995).
 73. Elbein A. D.: *Plant Physiol.* 87, 291 (1988).
 74. Kaushal G. P., Pastuszak I., Hatanaka K., Elbein A. D.: *J. Biol. Chem.* 265, 16271 (1990).
 75. Inoue K., Shimomura K., Kobayashi S., Sankawa U., Ebizuka Y.: *Phytochemistry* 41, 725 (1996).

V. Rotrekl (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Plant β -Glucosidases**

β -Glucosidases (β -D-glucoside- β -D-glucosylhydrolase EC 3.2.1.21) catalyze hydrolysis of glycosidic bonds of aryl and alkyl glucosides and also of glucosides containing only

saccharides (e.g. cellobiose). They are widely spread all over the living world, ranging from fungi and plants to animals. The recent progress in research in the field of these enzymes is reviewed. A basic description of metabolic processes and pathways in plants, where β -glucosidases play an important role, is listed. Also the mechanism of action and basic structural and functional properties are explained with regard to the recent progress. The whole range of substrates and inhibitors of β -glucosidases reviewed in the article corresponds to a full set of enzymes responsible for their hydrolysis. These data demonstrate a high substrate specificity of plant β -glucosidases. These findings highlight the importance of β -glucosidases in many important physiological processes as e.g. the plant defense system, or the plant development and growth regulation (mediated by phytohormones), or plant-microbial communication. Although the knowledge of these enzymes has been rapidly growing within the last decades, there is still a huge number of questions disabling us to understand the physiological functions in which β -glucosidases play their role.