



Niskocząsteczkowe białka obronne roślin

Robert Nawrot, Anna Goździcka-Józefiak

Zakład Wirusologii Molekularnej, Instytut Biologii Eksperymentalnej,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Plant defensins

Summary

Many plants possess antimicrobial peptides (AMP) constitutively expressed or induced after infection. These families of peptides include four cysteine-type peptides: hevein and knottin-type peptides, lipid transfer proteins, plant defensins and thionins. Plant AMP are basic, cysteine-rich peptides with molecular masses of approximately 5 kDa. They are mainly identified in peripheral cell layer of plants. These peptides may have an important role to play in the protection of plants from microbial infection, and they might prove to be useful tools for the genetic engineering of fungal and other pathogen resistance in transgenic plants. Plant defensins family show very limited sequence conservation.

Key words:

plant defensins family.

1. Wstęp

Na podstawie analizy czynników zaangażowanych w obronę roślin przed różnymi patogenami wykazano, że w procesie tym bierze udział kilka rodzajów białek, należących do co najmniej 7 rodzin, jak na przykład: tioniny, defensyny, białka przenoszące lipidy, peptydy podobne do heweinu (ang. *hevein-like peptides*), peptydy zawierające w strukturze „węzeł cysteinowy” (ang. *knottin-like peptides*), peptydy bogate w reszty glicynowe (GRP, ang. *glycine-rich peptides*), białka Ib-AMP czy homologi MBP-1. Większość z nich to peptydy kationowe, bogate w reszty cysteinowe, o aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybowej (AMP,

Adres do korespondencji

Robert Nawrot,
Zakład Wirusologii
Molekularnej,
Instytut Biologii
Eksperymentalnej,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Umultowska 89,
61-614 Poznań.

ang. *antimicrobial peptides*), niekiedy przeciwwirusowej. Niektóre są toksyczne dla komórek ssaczy, natomiast nie są toksyczne dla komórek roślinnych – tabela 1 (1-5).

Tabela 1

Niskocząsteczkowe białka obronne u roślin (wg 5)

Rodzina białek	Przedstawiciel	Liczba aminokwasów w cząsteczce
defensyny	Rs-AFP2 z rzodkiewki	51
tioniny	α -purotionina z pszenicy	45
LTP (ang. <i>lipid transfer proteins</i>)	Ace-AMP1 z szarłatu	93
typu heweiny	Ac-AMP2 z szarłatu	30
typu węzła (ang. <i>knottin-type</i>)	Mj – AMP1	36
białka izolowane z <i>Macadamia integrifolia</i>	MiAMP1 z <i>Macadamia integrifolia</i>	76
białka izolowane z <i>Impatiens balsamina</i> (niecierpek)	Ib-AMP1 z niecierpka	20
cyklotydy	kalata B1	29

Peptydy te, poza stałymi pozycjami cystein, dwóch glicyn i jedną resztą kwasu glutaminowego, mają mało zachowawczą sekwencję aminokwasową. Huang i wsp. (6), uwzględniając w cząsteczkach AMP ilość reszt cysteinowych, wyróżnili trzy typy defensyn: typu tioniny, typu o strukturze węzła (ang. *knottin-type*) oraz peptydy typu heweiny. Peptydy o strukturze węzła mają w cząsteczce sześć reszt cysteinowych, natomiast typu tioniny i heweiny – osiem. AMP izolowano z różnych tkanek i organów roślinnych, jak również z płynu pozakomórkowego.

2. Tioniny

Tioniny stanowią rodzinę homologicznych peptydów, do której zalicza się purotioniny, wyizolowane jako pierwsze z nasion pszenicy i ich homologi (np. wiskotoksyny, foratoksyny i krabiny), otrzymane z roślin różnych gatunków (1-8). Występują one w różnych tkankach roślinnych, nasionach, łodygach, korzeniach, w przestrzeni międzykomórkowej, zazwyczaj w formie monomerów, ale mogą również tworzyć oligomery. Scharakteryzowano także dwie tioniny z bielma (endospermy) jęczmienia, określane jako α -horodotionina i β -horodotionina oraz dwie z bielma owsa i ryżu. Wykazano, że wiskotoksyny izolowane z liści i łodyg jemioli pospolitej (*Viscum album*, rodzina *Loranthaceae*) stanowią mieszaninę bardzo podobnych peptydów. Z roślin należących do rodziny *Loranthaceae* otrzymano również takie toksyny, jak foratoksyna A (z *Phoradendron tomentosum*) i ligatoksyna (z *Phoradendron liga*) oraz

denklatoksyna D (z *Dendrophthora clavata*) (1,5,8-14). Białka te wykazują działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe w stężeniu nawet 10^{-5} M (tab. 2). Niektóre tioniny są cytotoksyczne dla komórek ludzkich (1).

Tabela 2

Aktywność biologiczna roślinnych białek obronnych (wg 5)

Białko	Roślina, z której białko wyizolowano	Aktywność biologiczna
Rs-AFP1-4	<i>Raphanus sativus</i>	przeciwgrzybowa
Pth-St1	<i>Solanum tuberosum</i>	przeciwbakteryjna
VrCRP	<i>Vigna radiata</i>	przeciw owadom
γ 1-H	<i>Hordeum vulgare</i>	hamuje syntezę białka
Slal-3	<i>Sorghum bicolor</i>	inhibitor alfa-amylazy
CfD2	<i>Cassia fistula</i>	inhibitor proteinyazy
γ 1-Z	<i>Zea mays</i>	inhibitor kanału Na ⁺

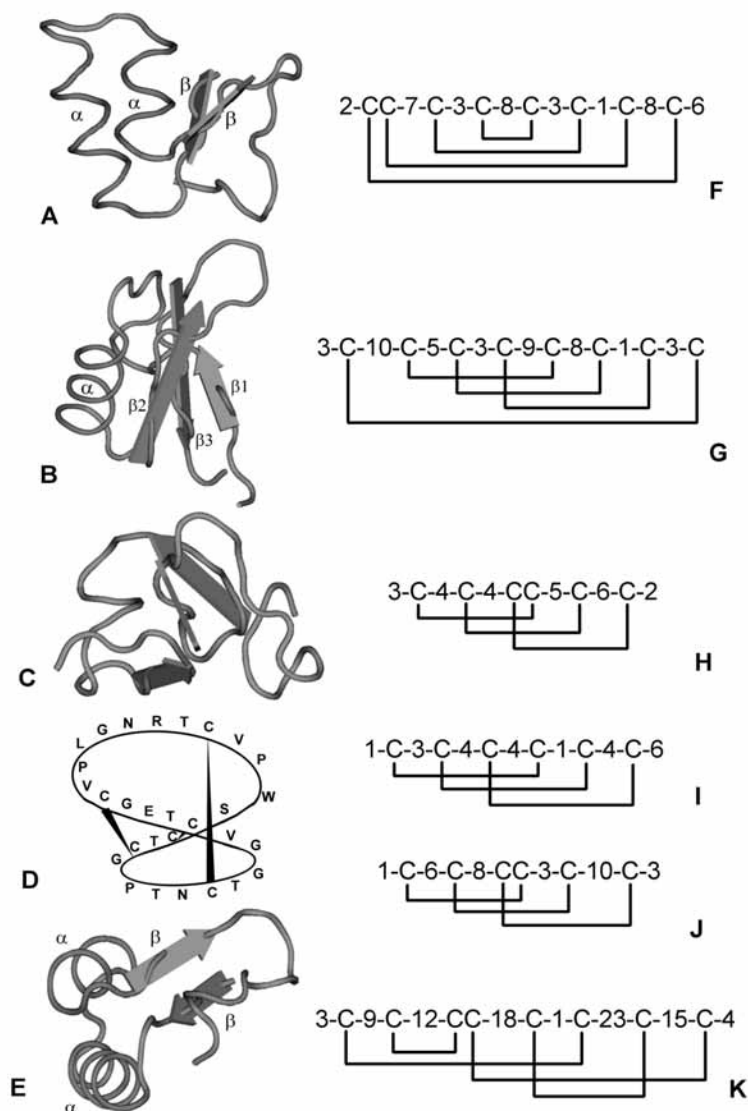
Dojrzałe peptydy tioninowe zbudowane są z 45-47 aminokwasów (rys. 1A,F). Ich cząsteczki mają właściwości amfipatyczne i ładunek wypadkowy dodatni. Białka te podzielono, na podstawie poznanej sekwencji aminokwasowej, na trzy podklasy: alfa, beta i gamma. Struktura I-rzędowa tionin alfa i beta jest bardzo podobna, ale różni się od struktury podklasy gamma. Obecnie tioniny gamma zaliczane są do roślinnych białek obronnych, zwanych defensynami roślinnymi, z uwagi na ich duże podobieństwo do białek obronnych owadów oraz defensyn ludzkich.

Tioniny, na podstawie porównania ich sekwencji aminokwasowych, podzielono także na pięć typów (I-V). Oryginalne purotioniny, wyizolowane z endospermy pszenicy, są silnie zasadowe, nie zawierają reszt aminokwasowych naładowanych ujemnie oraz posiadają 4 mostki dwusiarczkowe.

Tioniny należące do typu I zbudowane są z 45 aminokwasów, z których 8 występuje w centralnej pętli, stabilizowanej wiązaniami dwusiarczkowymi. Peptydy te są cytotoksyczne dla bakterii i grzybów, jak również niektóre z nich dla komórek myszy, świnki morskiej i królika, kiedy zostaną podane dożylnie, natomiast nie mają właściwości toksycznych po podaniu doustnym (1). Sugeruje się, że tioniny typu I mają także miejsce wiążące fosfolipidy, które może mieć ważne znaczenie dla aktywności toksycznej tych peptydów.

Tioniny typu II wyizolowano z liści *Pyralia pubera* (*Santalaceae*) oraz z jęczmienia. Peptydy te mają cztery mostki dwusiarczkowe w tej samej pozycji jak tioniny typu I, lecz ich cząsteczka zawiera mniej aminokwasów zasadowych oraz więcej naładowanych ujemnie (jeden lub dwa) w pętli centralnej, niż tioniny typu I.

Do tionin typu III zaliczane są wiskotoksyny i foratoksyny z jemioly (*Loranthaceae*). Ich cząsteczki zbudowane są z 46 aminokwasów, z czego 9 tworzy pętlę, stabilizowane



Rys. 1. A-E – Struktury wybranych niskocząsteczkowych białek obronnych; α – α helisa, β – arkusz β . A – struktura alfa-purotioniny z *Triticum aestivum*. B – struktura defensyny RsAFP1 z rzodkiewki (*Raphanus sativus*). C – struktura heweinu z *Hevea brasiliensis*. D – struktura cyklotydy kalaty B1. E – struktura krambiny z *Crambe abyssinica*. F-K – lokalizacja reszt cysteinowych w peptydach, tzw. sekwencja zgodna. Na schematach zaznaczono reszty cysteinowe (C) połączone wiązaniami dwusiarczkowymi. Cyfry oznaczają liczbę reszt aminokwasowych występujących pomiędzy kolejnymi resztami cysteinowymi w strukturze 1-rzędowej białka. F – sekwencja zgodna w alfa-purotioninach. G – lokalizacja reszt cysteinowych w defensynie RsAFP1 z rzodkiewki. H – lokalizacja reszt cysteinowych w białkach zawierających domenę heweinową. I – lokalizacja reszt cysteinowych kalaty B1. J – lokalizacja reszt cysteinowych w peptydach o strukturze węzła. K – lokalizacja cystein w białkach LTP.

trzema mostkami dwusiarczkowymi, zlokalizowanymi w podobnej pozycji, jak w innych typach tionin. Peptydy te mają mniej aminokwasów zasadowych niż inne typy tionin. Wykazano, że są one cytotoksyczne dla komórek myszy i kotów oraz powodują zaburzenia w pracy serca i innych mięśni różnych ssaków (1).

Czwartą grupę tionin stanowią krambiny, wyizolowane z nasion *Crambe abyssinica* (*Cruciferae*). Białka te zbudowane są z 46 aminokwasów, tworzących dwie helisy alfa i dwa arkusze beta ułożone antyrównolegle (rys. 1E). W cząsteczce krambin występuje sześć reszt cysteinowych, połączonych mostkami dwusiarczkowymi o podobnej organizacji, jak w tioninach typu II. Peptydy te nie mają właściwości białek obronnych przeciw patogenom roślinnym, natomiast nadają roślinie słodki smak.

Bardzo zróżnicowane są tioniny typu V, nie zawierają drugiej i ósmej cysteiny, obecnej w tioninach typu I. W efekcie, przerwane zostaje pierwsze i drugie wiązanie dwusiarczkowe, natomiast połączenia takie mogą tworzyć się pomiędzy niezwiązanymi resztami cysteinowymi. Tioniny typu V wyizolowano z ziarna pszenicy i trawy *Aegilops* sp. (15,16).

Struktura III-rzędowa tionin jest bardzo dobrze poznana. Wykazano, że mimo znacznych różnic w ich składzie aminokwasowym (tioniny typu III i V różnią się sekwencją aminokwasową w 70%), cząsteczki tych białek mają podobny kształt, przypominający grecką literę gamma (1).

Wykazano, że tioniny z endospermy jęczmienia są syntetyzowane w formie dużej cząsteczki prekursorowej na polirybosomach związanych z błonami. Cząsteczki prekursorowe mają na końcu N peptyd sygnałowy, natomiast na końcu C – peptyd bogaty w aminokwasy kwaśne. Peptydy końcowe usuwane są w trakcie dojrzewania tej cząsteczki. Wykazano, że w wakuolach występują enzymy wycinające peptyd C-końcowy i proces ten może być hamowany przez jony cynku. Alfa-hordotionina, wyizolowana z endospermy jęczmienia, jest kodowana przez gen zawierający dwa introny: 420- i 91-nukleotydowe, które przerywają sekwencję kodującą dodatkowy peptyd C-końcowy. Domena C-końcowa w dojrzałej cząsteczce tionin ma znaczenie dla aktywności biologicznej tych peptydów, przede wszystkim przeciwgrzybowej. Znacząca jest również zawartość w niej aminokwasów zasadowych, jak na przykład lizyny i argininy. Na podstawie analizy ekspresji genów tionin wykazano, że duże ilości ich mRNA występują w siewkach jęczmienia hodowanych w ciemności. Ponadto, wzrost ich ekspresji obserwowano w wyniku ataku patogenów. Niektóre z poznanych tionin roślinnych oddziałują z glikozydoceramidami i sfingolipidami błonowymi. Prowadzi to do wbudowania ich do błony komórkowej, destabilizacji tej błony oraz wypływu z komórki jonów potasu. Niektóre tioniny roślinne hamują aktywność enzymów, takich jak: alfa-amylaza, proteinaza serynowa, beta-glukoronidaza czy fosfotransferaza II neomycyny (tab. 2) (1,5,17,18).

3. Defensyny

Defensyny, zwane także gamma-tioninami, są to małe peptydy (ok. 5 kDa, 45-54 aminokwasowe), bogate w aminokwasy zasadowe i cysteinę. Wszyscy poznani dotychczas przedstawiciele tej rodziny białek mają w cząsteczce 8 cystein, połączonych mostkami dwusiarczkowymi, w tym jeden zlokalizowany na końcu C cząsteczki (rys. 1G). Peptydy te wyizolowano z roślin różnych gatunków i są prawdopodobnie powszechnie występującymi białkami roślinnymi. Najlepiej poznano defensyny izolowane z nasion (4-6,19-23). Struktura II-rzędowa defensyn roślinnych jest bardzo podobna. Można w niej wyróżnić alfa helisę oraz trzy arkusze beta ułożone antyrównolegle, zorganizowane jako beta-alfa-alfa-beta, stabilizowane wiązaniami dwusiarczkowymi i wodorowymi – rysunek 1B (1,24).

Struktura II-rzędowa defensyn roślinnych jest również podobna do struktury defensyn owadzych i beta defensyn ludzkich. Wykazano ponadto, że defensyna RsAFP2 z rzodkiewki (*Raphanus sativus*) i defensyna owadzia helomycyna z *Heiothis virescens* wykazują bardzo podobną aktywność biologiczną. Obydwa peptydy przejawiają raczej aktywność przeciwgrzybową niż przeciwbakteryjną (25). Sekwencja aminokwasowa RsAFP2 jest także w 41% podobna do sekwencji drosomycyny – defensyny izolowanej z muszki owocowej *Drosophila melanogaster* (26). Z nasion rzodkiewki wyizolowano również defensynę RsAFP1, różniącą się od RsAFP2 dwoma aminokwasami, natomiast jej aktywność przeciw grzybom wybranych szczepów jest od 2-30 razy niższa (26). W kwiatach *Petunia hybrida* zidentyfikowano nowy typ defensyn – PhD1 i PhD2 – zawierających w cząsteczce 5 wiązań dwusiarczkowych. PhD1 hamuje wzrost grzybów *Botrytis cinerea* i *Fusarium oxysporum*, *F. sp. dianthi*. Sekwencja aminokwasowa obu białek jest podobna do defensyny NaD1 z tytoniu (*Nicotiana glauca*) odpowiednio w 51 i 72% (25,27).

Prawie we wszystkich poznanych defensynach roślinnych stałe pozycje w cząsteczce zajmują cysteiny, seryna (pozycja 7), reszta aminokwasu aromatycznego (pozycja 10), dwie glicyny (w pozycji 12 i 32) oraz kwas glutaminowy (pozycja 27); oznaczenia te odnosi się do NaD1 (27). Piąte wiązanie dwusiarczkowe w PhD1 występuje w pierwszej pętli helisy alfa, w sąsiedztwie wiązania wodorowego tworzonego pomiędzy zachowawczą resztą treoniny i kwasu glutaminowego w innych defensynach roślinnych. Miejsce to odgrywa prawdopodobnie ważną rolę w stabilizacji struktury tych cząsteczek, a obecność dodatkowego wiązania dwusiarczkowego znacznie ją wzmacnia. Struktura II-rzędowa PhD1 jest taka sama, jak innych defensyn roślinnych.

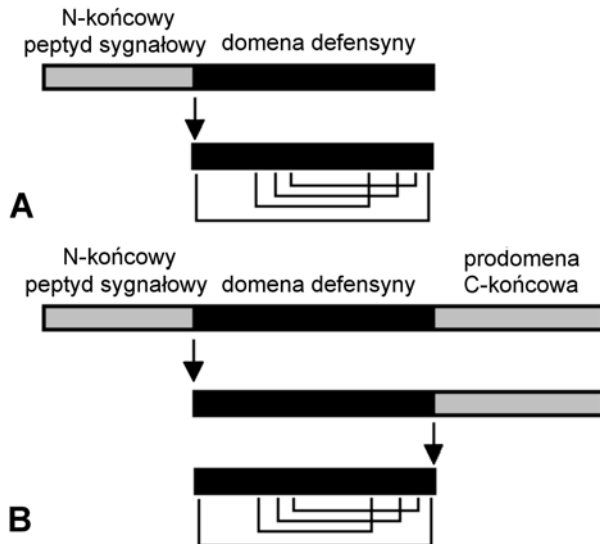
Geny defensyn roślinnych ulegają ekspresji w komórkach wielu tkanek i organów roślinnych. Ich ekspresja może być regulowana przez czynniki biotyczne i abiotyczne (5,20,28). Wykazano, że geny defensyn w komórkach grochu, rzodkiewki, tytoniu i rzodkiewnika indukowane są w wyniku infekcji – tabela 3 (5,27-32). Na podstawie analizy sekwencji nukleotydowej genomu *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano przypuszczalnych 13 genów kodujących defensyny (PDF). Są one ułożone tande-

mowo i zlokalizowane na chromosomach 2 i 5. Wysoki stopień ich homologii wskazuje, że mogły one powstać w wyniku duplikacji pojedynczego genu i dalszego jego różnicowania w trakcie ewolucji. Produkty białkowe dwóch genów defensyn *Arabidopsis thaliana* są dobrze poznane. Jeden z nich – oznaczony *At4g30070* – koduje białko zawierające 129 aminokwasów, natomiast drugi – *At5g38330* – koduje podobne białko zbudowane z 122 aminokwasów, z czego 56% reszt jest identycznych, jak w białku kodowanym przez *At4g30070*. Końce aminowe obu białek są bogate w reszty cysteinowe i zawierają 26-aminokwasową sekwencję sygnałową, która znacznie różni się od sekwencji w innych poznanych dotychczas defensynach (5,32,33).

Tabela 3

Czynniki indukujące syntezę defensyn w roślinie (wg 5)

Defensyna	Roślina, w której występuje	Miejsce syntezy	Czynnik indukujący syntezę
DRR230-a FST	<i>Pisum sativum</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	niedojrzały strąk działki kielicha	zakażenie patogenem
DRR230-c	<i>Pisum sativum</i>	liście	zranienie
NpThio1	<i>Nicotiana paniculata</i>	liście	zasolenie
Dhn8	<i>Glycine max</i>	liście i korzenie	susza
Tad1	<i>Triticum aestivum</i>	tkanki okrywające, młode siewki	zimno



Rys. 2. Dwa rodzaje defensyn roślinnych. A – wszystkie defensyny roślinne wytwarzane są jako dojrzała domena defensyny z dodatkowym peptydem sygnałowym na N-końcu białka kierującym do retikulum endoplazmatycznego (ER). B – defensyny z dodatkową prodomeną C-kończową poznano u niektórych psiankowatych (*Solanaceae*).

Znana jest sekwencja ponad 80 defensyn roślinnych. Wszystkie, oprócz dojrzałej domeny defensyny, mają w swej cząsteczce także charakterystyczny N-końcowy peptyd sygnałowy, natomiast niektóre defensyny (dotychczas poznane u kilku przedstawicieli *Solanaceae*) zawierają 30-aminokwasowe C-końcowe prodomeny, podobne do występujących w tioninach – rysunek 2 (1,5).

Na podstawie poznanej dotychczas sekwencji aminokwasowej defensyn, można je podzielić na cztery grupy lub podrodziny (1). Różnice w sekwencji odpowiadają ich zróżnicowanym właściwościom przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybowym. Defensyny należące do grupy I hamują wzrost bakterii gramododatnich i grzybów, niszcząc połączenia rozgałęzień strzępek grzybni. Defensyny grupy II wykazują aktywność przeciw grzybom, chociaż nie hamują wzrostu rozgałęzień grzybni i nie mają aktywności przeciwbakteryjnej. Do grupy III zaliczono defensyny wykazujące aktywność przeciw bakteriom gramododatnim i gramujemnym, lecz nie działające przeciwgrzybowo. Z kolei, defensyny należące do grupy IV wykazują aktywność przeciw bakteriom gramododatnim i gramujemnym oraz przeciw grzybom, jednak nie powodują uszkodzeń w połączeniach rozgałęzień grzybni. Aktywność antybakteryjna defensyn zwiększa się przy wzroście siły jonowej, głównie w obecności kationów dwuwartościowych. Mechanizmu działania defensyn na komórki bakterii i grzybów do końca jeszcze nie poznano. Analiza oddziaływań defensyny DmAMP1, wyizolowanej z dalii, z komórką drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wskazuje, że wiążącą ją cząsteczką w komórce mogą być sfingolipidy błonowe (32,34). W wyniku interakcji obu cząsteczek następuje wbudowanie defensyny roślinnej do błony komórki, co powoduje destabilizację błony i zmianę w jej przepuszczalności (32). Cząsteczkami wiążącymi defensyny są także glukozyloceramidy (GlcCer). Ich brak w błonach komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* stanowi prawdopodobnie przyczynę ich oporności na defensynę z rzodkiewnika RsAFP2, która wiąże się z glukozyloceramidami izolowanymi z drożdży *Candida albicans* i *Pichia pastoris* (32,35-37). GlcCer grzybów różnią się także strukturą (długością łańcuchów kwasów tłuszczowych, zawartością wiązań nienasyconych, metylacją) od znajdujących w komórkach ssaków czy roślin. Różnice te odgrywają ważną rolę w interakcjach z defensynami. W cząsteczce defensyny RsAFP2 zidentyfikowano dwa rejony istotne dla jej aktywności przeciwgrzybowej. Jeden zawiera aminokwasy Tyr-38, Phe-40, Pro-41, Ala-42, Lys-44 i Ile-46, natomiast drugi – Thr-10, Ser-12, Leu-28, Phe-49. Wykazano ponadto, że 25-aminokwasowe peptydy zawierające aminokwasy z rejonu od Cys-27 do Cys-47 tej defensyny wykazują aktywność przeciw grzybom, ale tylko jeden z nich przeciw bakteriom (38).

Niektóre defensyny roślinne nie blokują wzrostu strzępek grzybów, ale raczej hamują aktywność alfa-amylazy i syntezę białka – tabela 2 (1). Defensyny roślinne występują w formie monomerów. Ostatnio wyizolowano defensynę z nasion *Pachyrrhizus erosus*, zwaną SPE 10, która funkcjonuje jako dimer. Monomer SPE 10 zbudowany jest z 47 aminokwasów, z czego osiem stanowią cysteiny. Peptyd ten cechuje się aktywnością przeciwgrzybową, która znacznie spada w obecności

10 mM CaCl₂. SPE 10 wykazuje nieznaczne podobieństwo do Rs-AFP2. W cząsteczce Rs-AFP2 można wyróżnić część hydrofobową zbudowaną z pętli 1 i 2 (rys. 1B), której sekwencja odpowiada sekwencji SPE 10 (23,24).

W nasionach defensyny stanowią zaledwie 0,5% całkowitej puli białek. Wykazano, że do zahamowania wzrostu grzybów wystarczy ich roztwór o stężeniu mikromolarnym.

Defensyny roślinne są syntetyzowane w warstwach tkanek okrywających, co potwierdza ich udział w pierwszej linii obrony roślin przed różnymi patogenami.

4. Białka LTP (ang. *plant nonspecific lipid transfer proteins*)

Białka LTP wyizolowano z tkanek szeregu roślin jednoliściennych i dwuliściennych. Występują one przede wszystkim w ścianie komórkowej komórek tkanek okrywających, kutikuli i epidermie. Są to niskocząsteczkowe białka zasadowe, zbudowane z 90-95 aminokwasów, zaś 1/3 reszt aminokwasowych w ich cząsteczce jest zachowana, w tym osiem cystein, połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi (rys. 1K). Znane są także LTP (np. z bawełny) zawierające tylko sześć reszt cysteinowych.

W strukturze tych białek można wyróżnić cztery zwinienia typu alfa helis, stabilizowane wiązaniami dwusiarczkowymi, połączone przez elastyczną pętlę z hydrofobową szczeliną, w której mogą gromadzić się lipidy i inne cząsteczki hydrofobowe, z wyjątkiem steroli (39-45). Niezależnie od dużego podobieństwa sekwencji aminokwasowej LTP, podobnego zwinienia, wykazują one różnice strukturalne, które decydują o ich zróżnicowanym powinowactwie do lipidów (46). LTP kodowane są przez dwie duże rodziny genów: typ I o masie około 9 kDa, natomiast typ II – o masie 7 kDa. Ich wspólnym motywem jest osiem reszt cysteinowych, połączonych czterema mostkami dwusiarczkowymi. W komórkach jęczmienia zidentyfikowano sześć genów kodujących LTP, zlokalizowanych na chromosomach 3, 5 i 7. Geny te ulegają ekspresji w komórkach łodygi, liści, korzeni, a jeden z nich – w warstwie aleuronowej. Najwyższą ich ekspresję stwierdzono w epidermie oraz w tkankach okrywających organy roślinne (46). Funkcja LTP, jak również ich znaczenie w fizjologii roślin nie są poznane. Sugeruje się, że mogą one być włączane do wewnątrzkomórkowych lipidów błonowych. Wykazano, że LTP z tytoniu wiążą się ze specyficznym białkiem zlokalizowanym w błonie komórkowej, jak również z kwasami tłuszczowymi oraz kwasem jasmonowym (47, 48). Mogą brać także udział w transporcie różnych lipidów, w tym fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy, fosfatydyloinozytolu, a ponadto galaktolipidów. Białka te występują przede wszystkim w komórkach tkanek okrywających organy roślinne i są syntetyzowane jako preproteiny z N-końcowym peptydem sygnałowym (42).

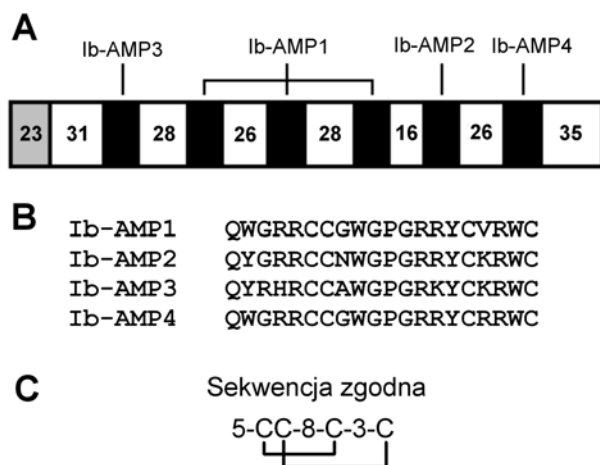
Wykazano, że LTP są masowo wydzielane podczas embriogenezy winorośli i marchwi. Sugeruje się, że mogą brać udział w rozwoju roślin, transporcie cząstek oraz w mechanizmie obronnym (43-45). Zróżnicowane właściwości przeciw-

bakteryjne opisywano dla wszystkich białek tej rodziny, w tym izolowanych z jęczmienia, kukurydzy, szpinaku, rzodkiewnika i rzodkiewki. Niektóre wykazywały wyższą aktywność, na przykład przeciw bakteriom *Calvibacter michanensis* subsp. *Sepedonicus* oraz przeciw grzybom *Fusarium solani*, niż tioniny.

5. Białka Ib-AMP

Z nasion niecierpka (*Impatiens balsamina*) wyizolowano cztery podobne peptydy: Ib-AMP1 – Ib-AMP4, które silnie hamują wzrost grzybów i bakterii, natomiast są nietoksyczne dla komórek roślinnych oraz owadzi i ludzkich w hodowli (49). Ib-AMP mają charakter zasadowy, są zbudowane z 20 aminokwasów, z czego cztery to cysteiny połączone wiązaniami dwusiarczkowymi. Wszystkie cztery Ib-AMP kodowane są przez jeden gen, którego transkrypt stanowi matrycę do syntezy 333-aminokwasowego białka prekursorowego, zawierającego prepeptyd oraz sześć domen znajdujących w dojrzałych białkach AMP. Sekwencja każdej domeny jest oskrzydłona przez 16- do 35-aminokwasowe prepeptydy (rys. 3).

Mechanizm ich działania, przeciwgrzybowego i przeciwbakteryjnego, nie jest poznany. Peptydy te nie tworzą raczej jonoforów w błonach komórek, ale hamują procesy wewnątrzkomórkowe.



Rys. 3. A – schemat struktury 333-aminokwasowego białka prekursorowego Ib-AMP. Prekursor białka zawiera 23-aminokwasowy prepeptyd oraz sześć 20-aminokwasowych domen znajdujących w dojrzałych białkach Ib-AMP (kolor czarny). Sekwencje każdej z domen są oskrzydłone przez 16- do 35-aminokwasowe prepeptydy (kolor biały). B – sekwencje aminokwasowe dojrzałych domen Ib-AMP. C – lokalizacja reszt cysteinowych w peptydach Ib-AMP, tzw. sekwencja zgodna. Na rysunku zaznaczono reszty cysteinowe połączone wiązaniami dwusiarczkowymi. Cyfry oznaczają liczbę reszt aminokwasowych występujących pomiędzy kolejnymi resztami cysteinowymi w strukturze 1-rzędowej białka.

6. Białka podobne do heweiny (ang. *hevein-like proteins*)

Białka podobne do heweiny, poprzez reszty aminokwasowe tworzące tak zwane domeny heweinowe, są zdolne do wiązania chityny (50,51). W ich cząsteczce występuje 6-8 reszt cysteinowych, połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi (rys. 1H). Domeny heweinowe, bogate w reszty cysteinowo/glicynowe, występują w 43-aminokwasowym białku – heweinie, które wyizolowano z mleczka drzewa kauczukowego *Hevea brasiliensis* (rys. 1C).

Podobne do niego białka izolowano ze słodkiego pieprzu, nasion *Pharbitis nil*, liści buraka cukrowego oraz z nasion szarłatki (*Amaranthus retroflexus*) i bzu czarnego (*Sambucus nigra*). W cząsteczce białka z szarłatki Ar-AMP brakuje dwóch cystein, w wyniku delekcji aminokwasów na końcu C cząsteczki. Na podstawie analizy cDNA, kodującego to białko, wykazano obecność na końcu N cząsteczki 25-aminokwasowej sekwencji sygnałowej, 30-aminokwasową sekwencję kodującą dojrzały peptyd oraz 34-aminokwasowy region na końcu C, ulegający rozszczepieniu podczas procesu dojrzewania potranslacyjnego. Białko to hamuje wzrost grzybów (*Alternaria consortiale*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*) w stężeniu mikromolarnym. Dodatkowo wykazuje aktywność przeciw bakteriom gramodatnim *Bacillus subtilis* (52).

7. Peptydy o strukturze węzła (ang. *knottin-type*)

Peptydy te wyizolowano po raz pierwszy z ziemianka w roku 1982. Obecnie poznano ich ponad 100, które zaliczane są do dwunastu rodzin. Ponad czterdzieści z nich wyizolowano z roślin należących do *Rubiaceae* i *Violaceae*. Są to białka 20-30-aminokwasowe, stabilne, z dużą zawartością cysteiny (6 cystein) tworzącej mostki dwusiarczkowe o strukturze węzła (ang. *knotted topology*) (rys. 1J).

Ponadto, jeden z mostków dwusiarczkowych przechodzi przez pętlę, utworzoną przez dwa inne wiązania dwusiarczkowe, łączące segmenty rdzeniowe w cząsteczce, stąd peptydy te nazywane są także knottynami (53). Wśród tych białek znajdują się inhibitory proteaz, hormony, toksyny tworzące kanały jonowe w błonach, białka o aktywności przeciwbakteryjnej, przeciw owadom oraz wykazujące działanie przeciwnowotworowe. Występują one w formie liniowej, jak również cyrkularnej. Cykliczną knottyne, zwaną kalatą B1, wyizolowano po raz pierwszy z rośliny rosnącej w Afryce (*Oldenlandia affinis*). Odwar z tej rośliny, zawierający kalatę B1, stosowany był przez afrykańskie kobiety do wzmocnienia i przyspieszenia skurczów macicy podczas porodu (54) (rys. 1D,I).

Na końcu łańcucha aminokwasowego tego białka występuje zachowawcza sekwencja: Gly-Leu-Pro. W dojrzałym peptydzie obecna jest tylko jedna kopia tej sekwencji. Dotychczas poznano ponad 50 podobnych peptydów, które nazywa się cyklotydami. Białka te nie ulegają denaturacji w temperaturze powyżej 40-50°C. Najmniejszym z nich jest 24-aminokwasowy peptyd wyizolowany ze słonecznika – in-

hibitor trypsyny. Peptydy te wykazują szeroką aktywność biologiczną i mogą cechować się aktywnością przeciwbakteryjną, przeciwgrzybową, przeciwwirusową (np. przeciw HIV), hemolityczną, wiążącą neurotensynę. Sugeruje to możliwość ich szerokiego wykorzystania w leczeniu, jak i rolnictwie.

Roślinne cyklotydy powstają w wyniku rozszczepienia białka prekursorowego. Prekursor zawiera domenę N-końcową, mało zachowawczą w sekwencji jak i długości, za którą zlokalizowana jest zachowawcza 25-aminokwasowa sekwencja poprzedzająca domenę cyklotydomową. Funkcja tej sekwencji nie jest poznana. Odgrywa ona prawdopodobnie istotną rolę w zwijaniu i cyklizacji łańcucha peptydowego tego białka. Również funkcja tych białek w roślinie nie jest znana (55,56).

8. Roślinne białka obronne w transformacji roślin

Białka obronne roślin są zazwyczaj małymi peptydami kationowymi i amfipatycznymi, o bardzo upakowanej strukturze, zawierającymi kilka wiązań dwusiarczkowych. Większość jest cytotoksyczna dla komórek roślin i ssaków. Geny kodujące te białka są zachowawcze. Podejmowane są próby ich transformacji do roślin nieodpornych na działanie wielu patogenów. Jedną z nich jest ryż, uprawiany w wysokiej wilgotności i temperaturze, narażony na zakażenia licznymi grzybami i bakteriami. Dlatego skonstruowano transgeniczny ryż, zawierający geny defensyn roślinnych *Brassica oleracea* i *B. campestris*, o znacznie zwiększonej oporności na zakażenia (56-58). Z kolei, transgeniczny ziemniak, z genem defensyny alfAFP, izolowanej z nasion *Medicago sativa*, ma bardzo silną aktywność przeciw grzybowi *Verticillium dahliae*. Inne rośliny transgeniczne zawierające geny defensyn przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4

Rośliny transgeniczne zawierające gen kodujący defensynę (wg 5)

Transgen	Roślina dawca genu	Roślina biorca genu	Promotor, pod jaki wklonowano transgen	Wzrost oporności przeciwko:
1	2	3	4	5
<i>Rs-AFP2</i>	rzodkiewka	tytoń	wirusa mozaiki kalafiora 35S	<i>Alternaria longipes</i>
<i>Rs-AFP2</i>	rzodkiewka	pomidor, rzepak	wirusa mozaiki kalafiora CaMV35	<i>A. solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>
<i>AlfAFP</i>	lucerna	ziemniak	CaMV 35S	<i>V. dahliae</i>
<i>Spi 1</i>	świerk norweski	tytoń, kultury zarodkowe świerka norweskiego	CaMV15	<i>Erwinia carotovora</i> , <i>Heterobasidion annosum</i>
<i>DRR230-a</i>	groch	canola	CaMV35	<i>Leptosphaeria maculans</i>

1	2	3	4	5
<i>DRR2302</i> i <i>DRR230-c</i>	groch	tytoń	dwa promotory CaMV35S	<i>F. oxysporum</i> , <i>Ascochyta pinodes</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Ascochyta lentis</i> , <i>F. solani</i> , <i>L. Maculans</i> , <i>Ascochyta pisi</i> , <i>Alternaria alternata</i>
<i>BSD1</i>	kapusta chińska	tytoń	CaMV35S	<i>P. parasitica</i>
<i>WT1</i>	kapusta	ryż	ubikwityny-1 z kukurydzy	<i>Magnaporthe grisea</i>

9. Podsumowanie

Rośliny narażone są na działanie licznych czynników patogennych, w obronie przed którymi syntetyzują szerokie spektrum białek obronnych. Do tej grupy, poza opisanymi, zaliczane są także 63-aminokwasowe peptydy wyizolowane z bulw ziemniaka, które mają w cząsteczce 12 reszt cysteinowych (ST-SN-1). Białka te wykazują aktywność przeciw grzybom i bakteriom w stężeniu niższym niż 10 µM. Postuluje się, że poza funkcją obronną szereg z nich może pełnić także inną rolę, na przykład białek zapasowych bogatych w siarkę. Niektóre z nich wpływają na aktywność układu odpornościowego jak również mają właściwości alergenne. Dwa takie białka – izolowane z astrów Amba1 i Art. V1 – stanowią główne alergeny pyłku. Osobną grupą roślinnych białek obronnych są białka bogate w reszty glicynowe, często występujące w ścianach komórkowych roślin. Roślinne białka obronne stanowią swoisty wrodzony układ obronny roślin (60,61).

Praca napisana w ramach projektu badawczego KBN nr 2P05F 041 27.

Literatura

- Garcia-Olmedo F., Molina A., Alamillo J. M., Rodriguez-Palenzuela P., (1998), Peptides, Biopolymers (Peptide Science), 47, 479-492.
- Fant F., Vranken W., Broekaert W., Borremans F., (1998), J. Mol. Biol., 279, 257-270.
- Pelegri P. B., Franco O. L., (2005), IJBCB, 37, 2239-2253.
- Garcia-Olmedo F., Rodriguez-Palenzuela P., Molina A., Alamillo J. M., Lopez-Solanilla E., Berrocal-Loba M., Poza-Carrion C., (2001), FEBS Lett., 498, 219-222.
- Lay F. T., Anderson M. A., (2005), Curr. Prot. Pep. Sci., 6, 85-101.
- Huang R. H., Xiang Y., Liu X. Z., Hu Z., Wang D. C., (2002), FEBS Lett., 521, 87-90.
- Ponz F., Paz-Ares J., Hernandez-Lucas C., Carbonero P., Garcia-Olmedo F., (1983), EMBO J., 2, 1035-1040.
- Clore M. G., Nilges M., Sukumaran K. D., Bunker A. T., Karplus M., Gronenborn A. M., (1986), EMBO J., 5, 2729-2735.
- Ponz F., Paz-Ares J., Hernandez-Lucas C., Garcia-Olmedo F., Carbonero P., (2000), FEBS Lett., 1896, 103-105.

10. Villa-Perello M., Sanchez-Vallet A., Garcia-Olmedo F., Molina A., Andreu D., (2003), *FEBS Lett.*, 536, 215-219.
11. Kyou-Hoon H., Ku-Hwan P., Hyun-Ju Y., Hoon Ch., Se Won S., Fariwell T., Tae-Sung M., Seung-Moak K., (1996), *Biochem J.*, 313, 885-892.
12. Schaltler G., Urech K., Grazi G., Giannattasio M., (1998), *Planta Medica*, 64, 677-678.
13. Colon A., Moshbah A., Lopez A., Sautereau A. M., Schaller G., Urech K., Rouge P., Karbon H., (2003), *Biochem J.*, 374, 71-78.
14. Vernon L. P., Evett G. E., Zeikus R. D., Gray W. R., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 18-29.
15. Castagnaro A., Marana C., Carbonero P., Garcia-Olmedo F., (1992), *J. Mol. Biol.*, 224, 1003-1009.
16. Castagnaro A., Seruga A., Garcia-Olmedo F., (1995), *Plant. Physiol.*, 107, 1475-1476.
17. Bloch C. J., Richardson M. A., (1991), *FEBS Lett.*, 279, 101-104.
18. Wijaya R., Neumann G. M., Condron R., Hughes A. B., Plota G. M., (2000), *Plant. Sci.*, 159, 243-255.
19. Osborn R. W., Samblanx G. W., Thevissen K., Goderios L., Torrekens S., van Leuven F., Attenborough S., Rees S. B., Broekaert W. F., (1995), *FEBS Lett.*, 368, 257-262.
20. Kragh K. M., Nielsen J. E., Nielsen K. K., Dreboldt S., Mikkelsen J. D., (1995), *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 8, 425-434.
21. Chiang C. C., Hadwiger L. A., (1991), *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 4, 324-331.
22. Terras F. R., Eggermont K., Kovaleva V., Raikhel N. V., Osborn R. W., Kester A., Rees S. B., Vanderleyden J., Cammue B. P., Broekaert W. F., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 15301-15309.
23. Song X., Zhou Z., Wang J., Wu F., Gong W., (2003), *Acta Cyst. D.*, 60, 1121-1124.
24. Song X., Wang J., Wu F., Li X., Teng M., Gong W., (2005), *Plant. Mol. Biol.*, 57, 13-20.
25. Thevissen K., Warnecker D. C., Francis I., Leipelt M., Heine E., Ott C., Zahringer U., Thomma B., Ferket K. A., Cammue B. P., (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 3900-3905.
26. Landon C., Pajon A., Vovelle F., Sodano P., (2000), *J. Pept. Res.*, 56, 231-238.
27. Lay F. T., Schirra H. J., Scanlon M. J., Anderson M. A., Craik D. J., (2003), *J. Mol. Biol.*, 325, 175-188.
28. Broekaert W. F., Cammue B. P. A., de Bolle M. F. C., Thevissen K., de Samblanx G. W., Osborn R. W., (1997), *Cri. Rev. Plant. Sci.*, 16, 297-323.
29. Gu Q., Kawata E. E., Morse M. J., Wu H. M., Cheung A. Y., (1992), *Mol. Gen. Genet.*, 234, 89-96.
30. Schenk P. M., Kazan K., Wilson I., Anderson J. P., Richmond T., Somerville S. C., Manners J. M., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 11655-11660.
31. Mahalingam R., Gomez-Buitrago A., Eckardt N. S., Guevara-Garcia A., Day P. H., Raina R., Fedoroff N. V., <http://genombiology.com/2003/4/3/R20>.
32. Thevissen K., Cammue B. P., Lamaire K., Winderick J., Dickson R. C., Lester R. L., Ferket K. K., van Even F., Parter A. H., Broekaert W. F., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 9531-9536.
33. Leipelt M., Warnecke D., Zahringer U., Ott C., Muller F., Hube B., Heine E., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 33621-33629.
34. Thevissen K., Warnecke D. C., Francis I. E. J. A., Leipelt M., Heine E., Ott C., Zahringer U., Thomma B. P. H. J., Ferket K. K. A., Cammue B. P. A., (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 3900-3905.
35. Sakaki T., Zahringer U., Warnecke D. C., Fahl A., Knogge W., Heine E., (2001), *Yeast*, 18, 679-695.
36. Warnecke D., Heine E., (2003), *Cell. Mol. Life. Sci.*, 60, 919-941.
37. Dickson R. C., Lester R. L., (1999), *Biochim. Biophys. Acta*, 1426, 347-357.
38. de Samblanx G. W., Goderis I. J., Thevissen K., Raemaekers R., Fant F., Borremans F., Acland D., Osborn R. W., Patel S., Broekaert W. F. J., (1997), *Biol. Chem.*, 272, 1171-1179.
39. Buhot N., Gomes E., Milat M. L., Ponchet M., Marion D., Lequen J., Delrot S., Coutos-Thevenot P., Blein J. P., (2004), *Mol. Biol. Cel.*, 15, 5047-5052.
40. Douliez J. P., Michon T., Elmorjani K., Marion D., (2000), *J. Cereal. Sci.*, 32, 1-20.
41. Kader J. C., (1996), *Plant. Mol. Biol.*, 627-645.
42. Arondel V., Vergnolle C., Cantrel C., Kader J. C., (2000), *Plant. Sci.*, 175, 1-12.
43. Blilou I., Ocampo J. A., Carcia-Garrido J. M., (2000), *J. Exp. Bot.*, 51, 1960-1877.
44. Carvalho A. Q., Machado O. L. T., Cucha M. A., Santos I. S., Goimes V. M., (2001), *Physiol. Biochem.*, 39, 137-146.
45. Maldonado A. M., Doerner P., Dixon R. A., Lamb G. J., Cameron R. K., (2002), *Nature*, 419, 399-403.

46. Guerbet F., Grosbois M., Joliot-Croquin A., Kader J. C., Zachowski A., (1999), *Biochemistry*, 38, 14131-14137.
47. Molina A., Garcia-Olmedo F., (1993), *Planta J.*, 4, 983-991.
48. Liechti R., Farmer E., (2002), *Science*, 296, 1649-1650.
49. Tailor R. H., Acland D. P., Attenborough S., Cammue B. P. A., Evans I. J., Osborn R. W., Ray J. A., Rees S., Broekaert W. F., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 24480-24487.
50. van Parijs J., Broekaert W. F., Golstein I. J., Pneumans W. J., (1997c), *Plant J.*, 12, 1251-1260.
51. Fujimura M., Ideguchi M., Minami Y., Watanabe K., Tadera K., (2005), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 642-645.
52. Lipkin A., Anisimova V., Nikonorova A., Babakov A., Krause E., Bienert M., Grishin E., Egorov T., (2005), *Phytochemistry*, 66, 2426-2431.
53. Cammue B. P., de Bolle M. F., Terras F. R., Proost P., van Damme J., Rees S. B., Vanderleyden J., Broekaert W. F., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 2228-2233.
54. Lorents G., Sandberg F., Sletten K., (2000), *J. Ethnopharmacol.*, 70, 197-203.
55. Jennings G., West J., Waine C., Craik D., Anderon M., (2001), *PNAS.*, 98, 10614-10619.
56. Saether O., Craik D. J., Campbell J. D., Sletten K., Juul J., Norman D. G., (1995), *Biochemistry*, 34, 4147-4158.
57. Gao A. G., Hakimi S. M., Mittanck C. A., Wu Y., Woerner B. M., Stark D. M., Shah D. M., Liang J. H., Rommens C. M. T., (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18, 1307-1310.
58. Wang Y., Nowak G., Culley D., Hadwiger L. A., Fristensky B., (1999), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 12, 410-418.
59. Kanzaki H., Nirasawa S., Saitoh H., Ito M., Nishihara M., Terauchi R., Nakamura I., (2002), *Theor. Appl. Genet.*, 105, 809-814.
60. Sachetto-Martins G., Franco L. O., DeOliveira D. E., (2000), *Biochim. Biophys. Acta*, 1492, 1-14.
61. Ryan C. A., Pearce G., (2003), *PNAS*, 100, 14577-14580.