

# Struktura i organospecyficzna ekspresja genów kodujących roślinne białka klasy PR10

Michał M. Sikorski

Jacek Biesiadka

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polska Akademia Nauk

Poznań

## 1. Reakcje obronne roślin indukowane przez stres

### 1.1. Wprowadzenie

Rośliny lądowe należą do największej grupy organizmów autotroficznych, stanowiąc źródło pożywienia dla heterotrofów. Konsekwencją tych zależności było rozwinięcie przez rośliny efektywnych mechanizmów obronnych chroniących je przed pasożytami i patogenami. Pomimo istnienia dużej liczby grzybów i bakterii rozkładających martwy materiał roślinny, tylko nieliczne organizmy patogeniczne mają zdolność kolonizowania żywych roślin. Rośliny atakowane przez patogeny rozwinęły liczne reakcje obronne, do których należą: szybka, zlokalizowana śmierć komórek gospodarza (ang. *hypersensitive response*, HR), akumulacja fitoale-

ksyn, synteza i odkładanie w ścianach komórkowych związków fenolowych i białek oraz synteza białek obronnych (1,2).

## 1.2. Definicja białek obronnych

Białka obronne (ang. *pathogenesis-related (PR) proteins*) są to białka kodowane przez genom rośliny, indukowane specyficznymi w odpowiedzi na infekcję patogenem lub w innych sytuacjach stresowych (zranienie, działanie promieniowania UV, zanieczyszczenia chemiczne środowiska, itp.) (3). Ekspresja białek obronnych jest regulowana na poziomie transkrypcji poprzez specyficzne białkowe czynniki transkrypcyjne *trans* oddziałujące z sekwencjami regulatorowymi *cis* promotorów genów białek obronnych. Transdukcja sygnałów w komórkach poddanych działaniu czynników stresowych zachodzi w sposób złożony, głównie poprzez aktywację specyficznych kinaz białkowych, fosforylujących czynniki transkrypcyjne. W przenoszeniu sygnału pomiędzy różnymi częściami rośliny prawdopodobny jest udział fitohormonów: kwasu abscysynowego ABA, kwasu jasmonowego JA, kwasu salicylowego SA, etylenu  $CH_2CH_2$ , cytokinin i oligopeptydu systeminy.

Białka obronne są elementami mechanizmów stanowiących barierę przed rozprzestrzenianiem się patogena poza miejsce infekcji lub zranienia, niektóre z nich pełnią również bardziej ogólne funkcje, związane ze zmianą stanu fizjologicznego komórki poddanej stresowi.

## 1.3. Klasyfikacja białek obronnych

Klasyfikacja białek obronnych oparta jest na ich funkcji biologicznej lub podobieństwie strukturalnym oraz właściwościach fizykochemicznych (pI, ruchliwość elektroforetyczna, krzyżowa reakcja immunologiczna), jeżeli aktywność białka nie jest znana. Na podstawie tych właściwości wyróżnia się obecnie 12 klas roślinnych białek obronnych (3-5) (tab. 1).

TABELA 1  
KLASYFIKACJA BIAŁEK OBRONNYCH (WG 3.4.5)

Klasa	Charakterystyka i funkcja białka
1	2
<b>PR-1</b>	<b>białka przeciwgrzybowe</b> zostały zidentyfikowane w liściach tytoniu infekowanego TMV. Kwaśne białka o $M_r$ ok. 15 000 zlokalizowano w przestrzeniach międzykomórkowych liści. Zasadowe białka klasy PR-1 występują w wakuolach. Aktywność nie jest znana
<b>PR-2</b>	<b>1,3-β-glukanazy</b> zidentyfikowano trzy klasy 1,3-β-glukanaz indukowanych w odpowiedzi na patogeny: zasadowe (klasa I) i kwaśne (klasa II i III). Białka klasy II i III ulegają sekrecji do przestrzeni międzykomórkowej, a białka klasy I gromadzone są w wakuoli



1	2
<b>PR-3</b>	<p style="text-align: center;"><b>chitynazy</b></p> <p>do białek PR-3 należą 4 grupy chitynaz:            klasa I — zasadowe, występujące w wakuoli,            klasa II — kwaśne, zlokalizowane pozakomórkowo,            klasa IV — podobne do klasy I (delecje w domenie katalitycznej i cysteinobogatej),            klasa V — zasadowe, wykazujące 30% podobieństwa z bakteryjnymi egzo-chitynazami</p>
<b>PR-4</b>	<p style="text-align: center;"><b>białka wiążące chitynę (ang. <i>Win-Like Proteins</i>)</b></p> <p>białka pozakomórkowe o <math>M_r</math> 13 000 – 15 000, posiadają sekwencję zbliżoną do białek <i>Win</i>, indukowanych pod wpływem zranienia. Dokładna funkcja biologiczna białek klasy PR-4 nie jest znana</p>
<b>PR-5</b>	<p style="text-align: center;"><b>osmotyny (ang. <i>Thaumatococcus-like Proteins</i>)</b></p> <p>białka indukowane pod wpływem infekcji wirusowej i grzybowej w tytoniu i innych roślinach (<math>M_r</math> 22 000 – 25 000). Wykazują 65% podobieństwa z taumatyną i 57% podobieństwa z inhibitorem trypsyny i <math>\alpha</math>-amylazy z nasion kukurydzy oraz 65% podobieństwa z osmotyną z hodowli komórkowych tytoniu. Wykazują działanie przeciwgrzybowe, jednak dokładna rola w mechanizmie obronnym nie jest znana</p>
<b>PR-6</b>	<p style="text-align: center;"><b>inhibitory proteaz (ang. <i>Pis</i>)</b></p> <p>białka wykryte w zranionych i infekowanych przez patogeny liściach pomidora i ziemniaka. Powodują inhibicję zwierzęcych proteaz, m.in. trypsyny i chymotrypsyny, endoproteinazy serynowej pochodzenia grzybowego i bakteryjnego. Białka ulegają akumulacji w wakuolach. Opisano dwie grupy białek PR-6: PI-I (<math>M_r</math> 8000) i PI-II (<math>M_r</math> 12 500). Indukcja białek PI nie ogranicza się do miejsca zranienia, lecz zachodzi systemicznie, w całej roślinie</p>
<b>PR-7</b>	<p style="text-align: center;"><b>proteiny</b></p> <p>znane są dwie alkaliczne endoproteiny indukowane w odpowiedzi na patogeny: P69 (<math>M_r</math> 69 000) i P70 z liści pomidora. Ich rola w mechanizmie obronnym nie jest znana</p>
<b>PR-8</b>	<p style="text-align: center;"><b>lizozymy/chitynazy (klasa III)</b></p> <p>indukowane lokalnie i systemicznie przez infekcje grzybowe, bakteryjne i wirusowe. Są to pozakomórkowe endochitynazy o <math>M_r</math> 28 000, wykazujące wysokie podobieństwo do dwufunkcyjnego, zasadowego lizozymu/chitynazy z <i>Parthenocissus quinquefolia</i>. Znane są dwie formy chitynaz klasy III, zasadowe o silnej aktywności lizozymu oraz kwaśne, nie hydrolizujące ścian bakteryjnych</p>
<b>PR-9</b>	<p style="text-align: center;"><b>peroksydazy</b></p> <p>peroksydazy indukowane przez stres zlokalizowano jako białka zewnątrzkomórkowe. Pełnią następujące funkcje w mechanizmie obronnym roślin: 1) katalizują rozkład <math>H_2O_2</math>, 2) uczestniczą w syntezie suberyny, 3) lignifikacji ścian komórkowych, 4) tworzeniu wiązań międzycząsteczkowych oraz 5) inaktywacji enzymów gospodarza i patogena przez utlenione związki fenolowe</p>
<b>PR-10</b>	<p style="text-align: center;"><b>wewnątrzkomórkowe białka stresu (IPRs)</b></p> <p>indukowane w liściach przez patogeny i inne czynniki stresowe (zranienie, UV, jony metali ciężkich), ulegają konstytutywnej ekspresji w korzeniach. Białka mają charakter kwaśny (<math>M_r</math> 16 000 – 18 000), ich aktywność oraz funkcja biologiczna nie są znane. Zlokalizowane są w cytoplazmie</p>

1	2
<b>PR-11</b>	<p style="text-align: center;">tioniny</p> <p>białka bogate w aminokwasy siarkowe (<math>M_r</math> 5000), posiadają zwartą strukturę trzeciorzędową stabilizowaną przez trzy lub cztery mostki dwusiarczkowe, syntetyzowane są jako prekursorzy i deponowane w wakuolach, w postaci ciał białkowych i w ścianie komórkowej</p>
<b>PR-12</b>	<p style="text-align: center;">defensyny</p> <p>białka zidentyfikowane w liściach jęczmienia poddanych działaniu patogena grzybowego <i>Erysiphe graminis</i> (<math>M_r</math> 25 000 – 27 000). Białka zlokalizowane są zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowo. Funkcja biologiczna defensyn nie jest znana</p>

## 2. Białka klasy PR10 (ang. *Intracellular Pathogenesis-Related Proteins of PR10 class*)

### 2.1. Definicja i nomenklatura białek PR10

Białka klasy PR10 występują powszechnie u roślin jedno- i dwuliścienych. Zostały po raz pierwszy zidentyfikowane jako białka wewnątrzkomórkowe, indukowane pod wpływem elicitora grzybowego w hodowlach komórkowych pietruszki (6).

Porównanie sekwencji aminokwasowych, ustalonych na podstawie sekwencji klonów genomowych i cDNA wskazuje, że białka PR10 nie posiadają peptydu sygnałowego ani helis hydrofobowych, co sugeruje ich występowanie w cytozolu (rys. 1). Stąd też pochodzi nazwa „wewnątrzkomórkowe białka związane z patogenezą” (ang. *Intracellular Pathogenesis-Related Proteins*). Ponadto białka te mają charakter kwaśny (pI 4.4-6.5), zbudowane są ze 153-163 reszt aminokwasowych ( $M_r$  16 000-18 000) i wykazują odporność na działanie proteaz. Na podstawie analizy sekwencji genomowych i cDNA białek PR10 z różnych roślin wykazano, że są one kodowane przez liczne rodziny genów.

Białka PR10 wykazują podobieństwo sekwencji aminokwasowych do alergenu pyłkowego brzozy *Betv1*. Z tego względu zaliczano je pierwotnie do białek rodziny *Betv1* (3). Identyfikacja w hodowlach komórkowych żeńszenia *Panax ginseng* kolejnych homologicznych białek, PgRNS1 i PgRNS2, wykazujących aktywność rybonukleaz (7,8) była podstawą do wprowadzenia nowej nazwy dla tej klasy białek — *ribonuclease-like proteins*.



	*	20	*	40	*	60	*	80	*
L1PR10.1A	:	MGIFAFENQSSLVAPAKLYKALTKDSDEIVPKVI-EPIQNVIEVEGGNGPCTIKKIIAI-HDGHSTFVLHKLDAIDEANLTYNSIIIGG	:	88					
L1PR10.1B	:	MGVFAFEDHEHSAVAQAQLFKALTKDSDDIIPKVI-EQIQSVEIVEGGNGPQTKKIIAS-HGHTSYVLUHLKDAIDEASPEYNSYIVGG	:	88					
PsABR17	:	MGVVFDDDEYTSVAPPKLYKALAKADADEIPKVI-KEAQVEIEEGNGPPTIKKLSIL-EDCKNTYVLUHLKDAVDEANFGYNSYIVGG	:	88					
PvPR10A	:	MGVVFEDQTTSPVAPATLYKAVAKADATIFPKALPDSFKSVEIVEGGNGPCTIKKISFV-EDGETKFLVHLKIESIDEANLGSYSYIVGG	:	89					
MsPR10.1	:	MGVVFEDETTSIVAPARLYKALVTDSDNLIIPKVI-DAIQSVEIVEGGNGAGTIKKPTFV-EGGETKYDLHLKVDVDPVAFYNSYIVGG	:	88					
LaPR10	:	MGVVFEDBSTVAPAKLYKALVADANIIPKAV-EAIQSVENVEGGNGPPTIKKLTPI-EDGETKYVLUHLKIEIDEANLGYNSYIVGG	:	88					
L1PR10.2B	:	MGVVFQDDEYTSIAPAKLYKALVTDADIIPKAV-ETIQSVEIVEGGNGPPTIKKLTPI-EGGESKVLVHLKIEIDEANLGYNSYIVGG	:	88					
L1PR10.2A	:	MGVVFQDEBSTIAPARLYKALVKDADAIIPKAV-EAIQSIETVEGGNGPPTIKKLTPI-EGGETKYVLUHLKIEAVDEANLRYNSYIVGG	:	88					
MtN13	:	MGVVTSEYVSSLSAEKLYRIVEDGNIIPYKALPFIEKAETLEGGDGPPTIKKLTPI-EGGSTQKHIDVMDRENCAITYSYVEG	:	87					
BvBetv1	:	MGVVFYETTSVIPAARLFPKAFILDGNLFPKVAPOAISVENIEGGNGPPTIKKISFP-EGFPKYVKDRVDEVDFNPKFYNYSYVIEG	:	89					
MdWald1	:	MGVVFYFENFTSEIPPSRFLPKAFILDADNLIPIKTAPOAIKQAEILIEGGNGPPTIKKIFTF-EGSQYGVYKVRDSDVDEASYSYVTLIEG	:	89					
AgApig1	:	MGVQTHVLELTSVSAEKIFQGFVIDVDTLPLKAAPOAYKSVIEK-GDGGPPTIKIITLP-DGGPITMTRLDGVNKEALTFDYSVIDG	:	88					
PcPR1-1	:	MGVQKSEVTTSSVSAEKLFKGLCLDIDLTPQVLPGAISSETLEGGDGVTVKLVHLG-DASPFKTMQKVDADIKATFTYSYSIIDG	:	89					
PgRNS1	:	-GVQKTEVEATSVPAQKLYAGLLLDIDDLIPKAFPOAIKSEIIEGDPGVTVKLVTLG-EASQFNWTKQRDAIDKDALTYVYSYIIGG	:	88					
PgRNS2	:	-GVQKTEQAI SPVPAEKLFKGSFLMDMTVPKAFPEGIKSVQVLEGGNGVGTIKNVLG-DATPFNMTKTRDAIDEHAFTYVTVIIGG	:	88					
StSTH2	:	MGVTSYTHETTPPIAATRLFKALVVDSDNLIIPKULM-PPQVKNIEAEGD-GSIKMMNFV-EGSPKYLKHKHIVDVKDLVTLTKYSMIEG	:	84					
AoPR1	:	MSSGSWSHEVAVNVAAGRMFKAAALMDHNLGPKIVPFDIAGSVVSGDGSVGTIREIKINNPALPFSYVVERLDFVBDHDFEVKQTVIEG	:	90					
		100	*	120	*	140	*	160	
L1PR10.1A	:	EGLDES-LEKISYESKILPGDGGSIGKINVKFHTKGD-V-LSEITVRQAKFKGLFKRAIEGWLAHPDY-----	:	156					
L1PR10.1B	:	TGLDES-LEKIFESKLLSGDGGSIGKIKVKFHTKGD-V-LSDAVREAEKARGTGLFKAVEGYVLANPNY-----	:	156					
PsABR17	:	PGLHES-LEKVAFETIILAGSDGGSIVKISVKYHTKGDAA-LSDAVREDETKAKGTGLIKAEIGYVLANPGY-----	:	157					
PvPR10A	:	VALPET-AEKITPDSKLSDPNGGSLIKLSITVYHSGDAP-PNEDELKAGKAKSDSLFKAVEAVLLANP-----	:	156					
MsPR10.1	:	GGLPDT-VEKISFESKLSAGDGGSTAKLTVKYFTKGDAA-PSEEEIKGGKARGDGLFKALEGYVLANPDI-----	:	157					
LaPR10	:	VGLPDT-VEKITFETKLVGNGGSIKVTIKIETKGDAK-PNEQEGKAAKARGDAFFKAIETYLSAHPDYN-----	:	158					
L1PR10.2B	:	VGLPDT-IEKISFETKLVGANGGSIKVTIKIETKGDQAQ-PNEEGKAAKARGDAFFKAIESVLSAHPDYN-----	:	158					
L1PR10.2A	:	VGLPDT-IEKISFETKLVGANGGSIKVTIKIETKGDQAQ-PNEEGKAAKARGDAFFKAIENYLSAHPVYN-----	:	158					
MtN13	:	IALSQPLEKIVPEFKLIVPTPEEGIVKSTTKYTKGDIELSKDYLEAGIERFEGFTKAVESYLLANPDKNSN	:	163					
BvBetv1	:	GFIGDT-LEKISNEIKVATPDGGSILKISNKYHTKGDHE-VKAQVTKAKSEMGEFTLRAVESYLLAHSDAYN---	:	160					
MdWald1	:	DALTDT-IEKISYETKLIVAC-GSGATIKSISHYHPKGNIE-IKEEHVVKVKEKGHGLFKLIESYLVKGPDPAY-N---	:	159					
AgApig1	:	DILLGF-IESIENHVVLPADGGSICKTIAIFHTKGDVAV-VPENIKYANQNTALFKALEAYLIAN-----	:	154					
PcPR1-1	:	DILLGF-IESIENHFTAVNADGCTVKSITIFNFKGDVAV-VPENIKFANDQNLTFKAVEAYLIAN-----	:	155					
PgRNS1	:	DILLDI-IESIVNHFTIVPTPDGGSIVKNTTINYNTIGDVA-IPENIKDATEKAGLIFKAVEAVLLAN-----	:	154					
PgRNS2	:	DILLDI-IESIENHFKIVP-TDGGSTITQTTINYNTIGDVA-IPENIKDATDKSIQVLFKAVEAVYLLAN-----	:	153					
StSTH2	:	DVLGDK-LESISYDLKFEAHNGGCVCKSTEXYHTKGDYV-LKDEHNEGQKQGMELFKIVEAYVLLANPSYV-A---	:	155					
AoPR1	:	GGLGKM-FECATTHFRFEPSSNGGCLVKVTSYKILPG-VADESAKAKKEGINTMKAATEAVLLANPDTAY-V---	:	158					

Rys. 1. Porównanie sekwencji aminokwasowych białek PR10. Sekwencje aminokwasowe białek PR10 dedukowane z sekwencji kodujących białka PR10 zarejestrowanych w EMBL GeneBank. Porównanie sekwencji wykonano za pomocą programu CLUSTAL.



TABELA 2  
NOMENKLATURA GENÓW I BIAŁEK KLASY PR10 (wg 3)

Sekwencja genomowa	Sekwencja cDNA	Nazwa białka
<b>XxYpr10.1 (a)</b>	<b>Xxpr10.1 (a)</b>	<b>XxPR10.1 (A)</b>

**Xx** — pierwsze litery łacińskiej nazwy systematycznej rośliny z której pochodzi białko PR10, **1, 2, 3,...** lub **A, B, C, ...** — oznacza kolejne homologiczne białko PR10 kodowane przez tę samą rodzinę genów danej rośliny; **Y** — oznacza sekwencję genomową kodującą białko PR10, **PR** — duże litery oznaczają białko PR10; **pr** — małe litery oznaczają sekwencje nukleotydowe.

W publikacjach dotyczących białek PR10 ukazujących się do roku 1994 stosowano różne oznaczenia, wynikające najczęściej z numeracji klonów cDNA lub sekwencji genomowych. W roku 1994 van Loon (3) zaproponował jednolite nazewnictwo genów i białek PR10, przedstawione w tabeli 2. Ze względu na cytowanie publikacji sprzed roku 1994, używane są także wcześniej stosowane nazwy białek należących do klasy PR10.

## 2.2. Organospecyficzna ekspresja białek PR10

W badaniach przeprowadzonych nad ekspresją genów (analiza transkryptów genów na poziomie mRNA) i biosyntezą białek PR10 (oznaczanie poziomu produktów białkowych metodami elektroforezy i analizy immunochemicznej) oraz na podstawie porównania sekwencji aminokwasowych pokazano, że indukcja ekspresji genów *pr10* jest znacznie bardziej złożona i odnosi się nie tylko do stanów patologicznych czy stresu abiotycznego. Okazało się, że białka PR10 ulegają zróżnicowanej ekspresji w różnych organach i tkankach, a poziom ekspresji jest regulowany w trakcie rozwoju rośliny. Wskazuje to na uniwersalną funkcję białek PR10 w różnych stanach fizjologicznych roślin. Biorąc pod uwagę podobieństwo sekwencji, właściwości fizykochemiczne białek oraz organospecyficzną ekspresję genów, można wyróżnić kilka grup białek klasy PR10.

### 2.2.1. Alergeny pyłkowe drzew

Pyłki drzew są jednym z głównych czynników wywołujących symptomy alergiczne u ludzi. Uczulenie wiąże się z utworzeniem kompleksu frakcji IgE surowicy krwi z alergenem — białkiem klasy PR10 (alergia Typu II). Najlepiej poznanym alergenem pyłkowym jest białko Betv1 brzozy białej *Betula verrucosa* ( $M_r$  17 500, 160AA) (9-11). W przeprowadzonych badaniach immunochemicznych wykazano, że IgE ponad 95% uczulonych pacjentów dawało pozytywną reakcję immunochemiczną z białkiem Betv1 (12). Alergeny izolowane z pyłków innych drzew należących do rodziny *Fagales*, Alng1 (*Alnus glutinosa*) (13), Cora1 (*Corylus avellana*) (14) i Carb1 (*Carpinus betulus*) (13), wykazują krzyżową reakcję immunochemiczną z frakcją IgE surowicy pacjentów uczulonych na alergen Betv1 brzozy. Określenie struktury trzeciorzę-



dowej białka Betv1 (15) stanowi duży postęp w kierunku poznania funkcji biologicznej alergenów i homologicznych białek klasy PR10.

### 2.2.2. Alergeny pokarmowe warzyw i owoców

Oddzielną grupę białek klasy PR10 stanowią alergeny zidentyfikowane w korzeniach warzyw: selera *Apium graveolens* — Apig1 (Mr 16 200, 153AA, 40% identyczności z Betv1) (16), marchwi *Daucus carota* — CR16 (154AA) (17) oraz w owocach drzew: jabłoni *Malus domestica* — Mald1 (Mr 17 700, 159AA, 64,5% identyczności z Betv1) (18,19) i wiśni *Prunus avium* — Prual (Mr 17 700, 160AA, 59,1% identyczności z Betv1) (20). Alergeny warzyw i owoców wykazują krzyżową reakcję immunochemiczną z surowicą anti-Betv1 oraz z surowicą ludzi uczulonych na te produkty żywieniowe oraz na pyłki brzozy. Poznanie struktury i molekularnego mechanizmu oddziaływania alergenów białkowych klasy PR10 z układem immunologicznym człowieka jest niezbędne dla opracowywania testów diagnostycznych oraz dla celów terapeutycznych. Znaczna część populacji (15-20%) uprzemysłowionych krajów półkuli północnej klimatu umiarkowanego jest uczulona na alergeny pyłkowe i pokarmowe, wywołujące objawy alergii Typu I (ang. *Type I IgE — mediated allergy*).

### 2.2.3. Białka PR10 regulowane rozwojowo, indukowane przez hormony roślinne

Stwierdzono, że białka PR10 mogą być indukowane w różnych procesach rozwojowych przez hormony roślinne: kwas abscysynowy, cytokininę i etylen.

#### Kwas abscysynowy (ABA)

Zidentyfikowano dwa białka PR10 grochu (*Pisum sativum*) ABR17 i ABR18, będące głównymi składnikami syntetyzowanymi podczas desykcji nasion (21,22). Oba białka ulegają zróżnicowanej ekspresji: białko ABR18 występuje w znacznej ilości w okrywie nasiennej we wczesnych etapach rozwoju nasion, natomiast w czasie desykcji jest syntetyzowane w zarodku. Nie jest wykrywalne tuż po skielkowaniu, ale dodanie ABA indukuje jego syntezę. ABR17 nie jest wykrywalne w okrywie nasiennej, natomiast pojawia się w zarodku przed osiągnięciem jego największej masy. Synteza ABR17 zachodzi podczas kiełkowania i występuje także w nie stresowanych liściach. Silne wysuszenie liści jest związane z 30-krotnym wzrostem poziomu ABA i znacznym wzrostem poziomu mRNA dla białka ABR17, podczas gdy ABR18 jest niewykrywalne. Wykazano, że poziom mRNA dla białka ABR17 jest modulowany przez ABA i ekspresja nie jest tkankospecyficzna. Ekspresja genu ABR18 jest natomiast ograniczona do określonych tkanek. Występowanie białka ABR18 w okrywie nasiennej we wczesnym etapie rozwoju nasiona oraz obu białek w dojrzałym zarodku może świadczyć o ich roli w mechanizmie obronnym.

W rozwijających się nasionach ciecierzycy *Cicer arietinum* wykryto transkrypt genu *CaYpr10a* (23). Analiza poziomu transkrypcji metodą Northern



wskazuje na ekspresję genu *CaYpr10a* w czasie desykcji nasion. Wysoki poziom mRNA obserwowano w suchych nasionach i w początkowej fazie kiełkowania, natomiast po 96 godzinach następował gwałtowny spadek. W kiełkujących nasionach, po dodaniu egzogenego ABA, obserwowano kilkukrotny wzrost poziomu transkryptu *CaYpr10a*. Jednoczesne traktowanie kiełkujących nasion ABA i etylenem znosiło efekt indukcji przez ABA.

### Cytokinina (zeatina)

W 2-tygodniowych tkankach kalusa barwinka (*Cathartanthus roseus*) hodowanych na pożywce zawierającej 5  $\mu$ M zeatynę wykrywano wysoki poziom transkryptu oraz białka T1 ( $M_r$  16 805, 155AA, pI 6.55) (24), homologicznego do opisanego wcześniej białka ABR17. W hodowlach nie traktowanych hormonem obserwowano bardzo niski poziom zarówno transkryptu T1 jak i produktu białkowego. Białko T1 wykazuje 40,4% identyczności sekwencji aminokwasowej z alergenem brzozy Betv1. Nie stwierdzono reaktywności immunochemicznej białka T1 z przeciwciałem monoklonalnym Bip1 oraz z czterema innymi monoklonalnymi przeciwciałami (nr 14-18) alergenu Betv1, a także z frakcją IgE surowicy pacjentów uczulonych na pyłki brzozy. Funkcja białka T1 w tkankach kalusa barwinka nie jest znana, jakkolwiek jego akumulacja związana jest z podwyższonym poziomem alkaloidów, indukowanych przez cytokiny. Duża homologia sekwencji aminokwasowej białka T1 do białek PR10 indukowanych przez patogena lub zranienie może sugerować jego udział w mechanizmie obronnym.

Wiele reakcji obronnych roślin związanych jest z jednoczesnym wzrostem poziomu wtórnych metabolitów i aktywacją genów kodujących białka stresu. Są także doświadczone dowody, że odpowiedzi na stres są właściwością normalnego rozwoju rośliny (25). Ekspresja genów soi: SAM22 (*Glycine max* cv. Mandarin) i H4 (*Glycine max* cv. Williams) jest wykrywalna w korzeniach oraz w starzejących się liścieniach i liściach. Transkrypcja genu SAM22 była indukowana w młodych liściach przez zranienie, kwas salicylowy, elicytor grzybowy (metyl viologen), nadtlenuk wodoru lub fosforan sodu pH 6,9. Geny te są indukowane nie tylko przez czynniki stresowe, ale uczestniczą także w procesie rozwojowym rośliny. Akumulacja białek PR10 w korzeniach i starzejących się tkankach jest zgodna z ich rolą w fizjologii stresu — korzeń ulega zranieniu podczas penetracji korzeni bocznych przez korę i epidermę korzenia głównego (typowy proces rozwojowy). W korzeniach i starzejących się liściach łubinów żółtego *L. luteus* również stwierdzono wysoki poziom białek LIPR10.1A i LIPR10.1B (Sikorski i wsp., praca w przygotowaniu).

Białko RH2 grochu (26), homologiczne do białek klasy PR10 ulega ekspresji specyficznemu w komórkach epidermy korzenia w trakcie rozwoju postembrionalnego, kiedy rozpoczyna się elongacja i wakuolizacja (na etapie poprzedzającym tworzenie się włóśniaków korzeniowych). Ekspresja genu *rh2* jest skorelowana z przekształceniem się protodermy w epidermę. W ten sposób gen *rh2* jest indukowany w specyficznym stadium rozwoju epidermy korzenia i może być uważany za gen regulowany i kontrolowany przez pro-



cesy rozwojowe. Przypuszcza się również, że białko RH2 jest zaangażowane w tworzenie konstytutywnego mechanizmu obronnego, będącego częścią programu rozwojowego epidermy korzenia, narażonego na działanie czynników stresowych środowiska.

Stwierdzono, że gen kodujący białko PR10A z *Lilium longiflorum* ulega tkankospecyficznej ekspresji tylko w tapetum, w fazie rozwoju mikrosporów, kiedy komórki tapetum stają się spolaryzowane, silnie sekrecyjne, a ich ściany komórkowe ulegają degradacji (27). Najwyższy poziom transkrypcji genu *pr10a* obserwowano w chwili największej zdolności sekrecyjnej. Nie obserwowano natomiast transkrypcji tego genu w innych organach rośliny. Ekspresję tego genu wykrywano w rozwijających się pylnikach, nie poddawanych działaniu czynników stresowych. Białko PR10A z *L. longiflorum* zbudowane jest z 157 AA ( $M_r$  16 200, pI 5,2) i wykazuje 37% identyczności sekwencji aminokwasowej z alergenem brzozy Betv1 i 54% identyczności z białkiem asparagusa AoPR1. Funkcja białka w rozwoju kwiatu *L. longiflorum* nie jest znana.

Dwa geny łubinu żółtego *LlYpr10.1a* i *LlYpr10.1b* kodujące homologiczne białka klasy PR10 — LIPR10.1A i LIPR10.1B ( $M_r$  16 859 i 16 655, 156 AA każde) ulegają tkankospecyficznej ekspresji, regulowanej w czasie rozwoju rośliny (28). Transkrypcja genów PR10 łubinu żółtego zachodzi w trakcie pęcznienia nasion i utrzymuje się na stałym poziomie w czasie rozwoju korzenia. Obserwowano również wysoki poziom produktów białkowych, skorelowany z pojawianiem się transkryptów mRNA. W ogonku liścia, liściu i pyłkach kwiatowych stwierdzono obecność tylko białka LIPR10.1B. W roślinie infekowanej bakteriami symbiotycznymi *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) widoczny jest spadek poziomu obu białek w dojrzałej brodawce, natomiast w starzejącej się — poziom białek PR10 znacznie wzrasta. Ekspresja zlokalizowana jest w korze korzenia i brodawki. Nie wykrywano nigdy białek PR10 w tkance bakteroidowej (Sikorski i wsp. — praca w przygotowaniu).

Ostatnio wyizolowano z biblioteki cDNA korzeni łubinu infekowanych *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) dwa kolejne klony zawierające sekwencje kodujące białka PR10 (Hands Schuh i Sikorski, dane nie publikowane). Porównanie sekwencji aminokwasowych ustalonych na podstawie sekwencji cDNA wskazuje na 57-59% identyczności z białkami LIPR10.1A i LIPR10.1B łubinu. Tworzą one nową podklasę białek — PR10.2. Oba białka złożone są ze 158 reszt aminokwasowych. Stosując konsekwentnie proponowaną nomenklaturę, nazwano je odpowiednio LIPR10.2A i LIPR10.2B. Identyczność sekwencji aminokwasowych tych białek wynosi 91% (rys. 2 i 4). Obecność sekwencji kodujących białek PR10.2 w bibliotece ekspresyjnej roślin infekowanych bakteriami symbiotycznymi nasuwa pytanie czy geny *pr10.2* ulegają transkrypcyjnej aktywacji w trakcie oddziaływań symbiotycznych. Wyjaśnienie organospecyficznej ekspresji genów *pr10.2a* i *pr10.2b* jest aktualnie przedmiotem badań w naszej pracowni.

### Etylen (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)

Etylen uczestniczy w regulacji licznych procesów rozwojowych zachodzących w roślinach, związanych ze wzrostem, rozwojem i starzeniem się tkanek,



dojrzewaniem owoców, a także w odpowiedzi roślin na działanie czynników stresowych. Indukcja etylenu zachodzi w roślinie w wyniku mechanicznego uszkodzenia tkanek, stresu temperaturowego, stresu wodnego (zatonienie, odwodnienie), działania zanieczyszczeń środowiska (jony metali ciężkich, ozon, SO<sub>2</sub>), w wyniku infekcji wirusowej, patogenem grzybowym lub bakteryjnym. Ze względu na bardzo wysokie stężenie etylenu w tkankach poddanych stresowi, określa się go mianem „etylenu stresowego”. Stwierdzono, że etefon, związek uwalniający etylen, silnie indukuje ekspresję genu i akumulację białka TsPR10A w korzeniu i naziemnych częściach koniczyny *Trifolium subterraneum* (29). Po 24 godzinach działania etefonu poziom transkryptu genu *TsYpr10a* wzrasta 6,6-krotnie w korzeniu i 21-krotnie w tkankach naziemnych części rośliny.

#### 2.2.4. Białka PR10 indukowane w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego

Najwięcej informacji o ekspresji genów, identyfikacji sekwencji cDNA i sekwencji genomowych oraz analizy funkcjonalnej promotorów dotyczy grupy białek PR10, indukowanych pod wpływem działania różnych czynników stresowych (infekcja patogenami, zranienie, oddziaływanie zanieczyszczeń środowiska, promieniowanie UV). Najwcześniej poznanymi białkami PR10 były homologiczne białka PcPR1-1, PcPR1-2 i PcPR1-3 (każde złożone ze 155 aminokwasów) indukowane w hodowlach komórkowych pietruszki *Petroselinum crispum* pod wpływem elicitora grzybowego (Pep25) (30). Stwierdzono również obecność transkryptów genów PR1 *in vitro* w liściach pietruszki inokulowanych zawiesiną sporów *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* (31). Technika hybrydyzacji *in situ* z sondą antysens wykazano wysoki poziom transkryptu mRNA białek PR1 wokół miejsca infekcji już po 4 godzinach działania patogena. Dalsze badania nad strukturą i ekspresją genów *pr10* pietruszki doprowadziły do identyfikacji fragmentów regulatorowych W1, W2 i W3 rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne WRKY1, WRKY2 i WRKY3 (32, 33). Zidentyfikowano ich sekwencje kodujące i wykonano analizę poziomu transkryptów w trakcie działania stresu. Szybki wzrost transkryptów mRNA genów WRKY w odpowiedzi na działanie elicitora Pep25 sugeruje, że białka WRKY1,2 i 3 pełnią podstawową rolę w transdukcji sygnałów prowadzących od percepcji elicitora do aktywacji genów PR1 pietruszki. Jest to obecnie jeden z najlepiej scharakteryzowanych układów roślina-patogen opisujący mechanizm regulacji ekspresji genów białek PR10 w odpowiedzi na stres.

Stosunkowo dobrze scharakteryzowano ekspresję białek PR10 w oddziaływaniu *S. tuberosum* z patogenem *Phytophthora infestans* (34-39). Zidentyfikowano dwie sekwencje cDNA (pSTH-2 i pSTH-21), odpowiadające transkryptom genów kodujących białka StPR10A i StPR10B, które ulegają akumulacji w bulwach ziemniaka w odpowiedzi na zranienie i działanie elicitora grzybowego (34-36). W liściach poddanych zranieniu i infekcji *P. infestans* wykrywano jedynie transkrypt STH-2. W przeprowadzonej analizie roślin transgenicznych transformowanych chimerycznym genem: promotor *StYpr10a*-β-



-glukuronidaza (GUS) wykazano, że ekspresja genu zachodzi organospecyficznie (37). Wysoką ekspresję wykrywano w bulwach, rozłogach, łodygach i ogonkach liści infekowanych *P. infestans*. W zranionych liściach obserwowano niski poziom ekspresji  $\beta$ -glukuronidazy, osiągający wartość mierzalną dopiero pod wpływem elicitora. Ekspresję białka StPR10A lokalizowano głównie w wiązce przewodzącej zranionej łodygi i ogonka liścia, natomiast w niestresowanych roślinach białko StPR10A akumuluje się w znamieniu słupka kwiatu. Wykazano specyficzną i rozwojowo regulowaną ekspresję tego białka w znamieniu kwiatów, występującą na znacznie wyższym poziomie w kwiatkach otwartych niż w zamkniętych. Ekspresja białka PR10A w różnych warstwach komórek znamienia jest zróżnicowana. Na podstawie analizy delecyjnej promotora genu StYpr10a wykazano, że sekwencja regulatorowa odpowiedzialna za wiązanie czynników transkrypcyjnych PBF1 i PBF2 (ang. **PR10 Binding Factors**) do sekwencji ERE promotora (ang. **Elicitor-Responsive Element**) znajduje się we fragmencie promotora -135/-105, a ich aktywacja zachodzi poprzez fosforylację (38). Później wykazano, że za fosforylację czynników transkrypcyjnych odpowiedzialna jest kinaza białkowa C (ang. **PKC — protein kinase C**) (39).

Transkrypty dwóch genów kodujących homologiczne białka PvPR1 i PvPR2 fasoli *Phaseolus vulgaris* (89% identyczności) wyodrębniono z biblioteki cDNA skonstruowanej z mRNA zawiesiny komórkowej traktowanej elicitorem grzybowym z *Colletotrichum lindemuthianum* (40). Białka PR10 fasoli kodowane są przez polimorficzną rodzinę co najmniej 20 genów. Wyizolowano i oznaczono strukturę nukleotydową tylko jednej sekwencji genomowej *PvYpr10\*c* (41). Na podstawie analizy transkryptów stwierdzono, że rodzina genów PR10 ulega wysokiej ekspresji w korzeniu fasoli. W młodych i dojrzałych liściach ekspresja jest bardzo niska, ale obserwuje się wzrost transkryptów w liściach starzejących się i zainfekowanych patogenem. Stwierdzono także indukcję genów PR10 w roślinach hodowanych w ciemności. W przeprowadzonej analizie aktywności genu chimerycznego: promotor *Pvpr10\*c* — GUS w transgenicznym tytoniu wykazano aktywność promotora w korzeniu, w czasie rozwoju floemu i ksylemu łodygi oraz w blaszkach starzejących się liści. Najbardziej widoczną cechą ekspresji regulowanej rozwojowo była specyficzna lokalizacja aktywności GUS w kanałach przewodzących znamienia kwiatów w czasie pylenia. Infekcja młodych liści patogenem również powodowała indukcję aktywności GUS.

Korelacja tkankowospecyficznej i rozwojowo regulowanej ekspresji genów białek PR10 z genami kodującymi rybonukleazy potwierdza hipotezę o aktywności rybonukleazowej białek PR10. Nie ma jednak szczegółowych danych o roli cytozolowych rybonukleaz w reakcjach obronnych roślin. Jest to zaskakujące, ponieważ cytozol jest głównym miejscem, gdzie zachodzi degradacja mRNA (42). Podwyższony poziom trzech biologicznie różnych rybonukleaz obserwowano w procesie starzenia liści pszenicy. Aktywność dwóch rybonukleaz wzrastała w wyniku stresu świetlnego. Ponowne przeniesienie roślin do normalnych warunków oświetlenia powodowało obniżenie aktywności rybonukleaz (43). Wspomniano już, że w starzejących się liściach soi



obserwowano również ekspresję genów białek klasy PR10 (25). Dalsze odkrycie S-glikoprotein — rybonukleaz zaangażowanych w mechanizm samoniezgodności gametofitowej (44), ich roli w niedopuszczaniu do samozapylenia i zbieżność ze specyficzną ekspresją białek PR10 w pyłkach sugeruje, że również białka PR10 mogą pełnić funkcję rybonukleaz.

Programowana śmierć komórek, w której uczestniczą rybonukleazy o  $M_r$  17 000, zachodzi m.in. podczas tworzenia się wiązek przewodzących i ksylogenezy (45). Na podstawie porównania danych dotyczących pomiaru aktywności promotora genu *pr10* fasoli w tkankach przewodzących liści, łodygi i korzeni transgenicznego tytoniu z obserwacją aktywności rybonukleaz u innych roślin można postawić hipotezę, że białka klasy PR10 mogą wykazywać aktywność rybonukleazową w procesach rozwojowych roślin. Przypuszczalna rola białek PR10 może być związana z ich udziałem w mechanizmie kontroli ekspresji genów w komórce poprzez degradację mRNA. Przypuszcza się, że fizjologiczna funkcja rybonukleaz cytozolowych podczas inwazji patogena może być związana z selektywną lub regulowaną degradacją populacji występującego w komórce mRNA, w konsekwencji prowadzącą do śmierci komórek. Ewolucyjna zachowawczość i rozwojowo regulowana ekspresja genów białek PR10 w różnych organach i tkankach roślin wskazuje na ich udział nie tylko w reakcjach obronnych przeciwko rozprzestrzenianiu się patogena, ale również w metabolizmie roślin.

Białko AoPR1 z *Asparagus officinalis* jest jedynym dotąd poznanym białkiem klasy PR10 z roślin jednoliściennych. Po raz pierwszy stwierdzono obecność transkryptu genu w zawieszinie komórek mezofilu (46). W przeprowadzonej analizie hybrydyzacyjnej Northern wykazano obecność transkryptu wokół miejsca zranienia w zmiążdżonych siewkach. Identyczność sekwencji aminokwasowej białka AoPR1 z białkami PR10 roślin dwuliściennych wynosi 25-32%. Histochemiczna lokalizacja aktywności GUS w transgenicznym tytoniu wskazuje na obecność produktu ekspresji genu chimerycznego wokół miejsca zranienia i inwazji patogena grzybowego *Botrytis cinerea*. Aktywność GUS obserwowano także w ziarnach pyłku (47). Dalsza analiza transkryptu genu *AoYpr1* i aktywności promotora w transgenicznym tytoniu potwierdziła wcześniejsze wyniki wskazujące na rozwojowo regulowaną ekspresję genu *AoYpr1* (48). Stwierdzono, że ekspresja *AoYpr1* zachodzi we wszystkich typach komórek, w których akumulują się różne klasy pochodnych fenylopropanoidów. Obserwowano m.in. akumulację antocyjaninów, skorelowaną z aktywnością promotora *AoYpr1* w płatkach kwiatowych. Wysoki poziom ekspresji wykazano również we wtórnym ksylemie łodygi tytoniu w czasie lignifikacji, a także w okrywie nasiennej, przed pojawieniem się antocyjaninów. Promotor *AoYpr1* ulega ponadto indukcji w liściach tytoniu pod wpływem egzogenego kwasu salicylowego. Podobnie, indukcję AoPR1 obserwowano w siewkach asparagusa, ale na stosunkowo niskim poziomie w porównaniu z indukcją przez zranienie, w czasie lignifikacji łodygi, czy w trakcie rozwoju nasion.

Akumulację trzech białek klasy PR10 ( $M_r$  16 500) wykazano w liściach łubinu białego *Lupinus albus* infekcyjnych przez patogena grzybowego *Colletotrichum gloeosporioides*, po traktowaniu kwasem salicylowym, pod wpły-



wem promieniowania UV (49) oraz po infekcji wirusem mozaiki ogórka. Autorzy nie biorą pod uwagę obecności homologicznego białka PR10, które ulega konstytutywnej ekspresji w korzeniu rośliny nie infekowanej. Ekstrakt białek korzeniowych łubinu białego wykazuje krzyżową reakcję immunochemiczną z surowicą dla białek PR10 łubinu żółtego *L. luteus* (Sikorski, dane nie publikowane) wskazując na wysokie podobieństwo strukturalne białek PR10 obu gatunków łubinu.

Infekcja liści łubinu żółtego bakteriami patogenicznymi *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* indukuje ekspresję genu *Llypr10.1a* oraz akumulację białka LIPR10.1A (50). Wysoki poziom transkryptu obserwuje się po 3 godzinach infiltracji zawiesiny bakterii do liści (analiza hybrydyzacyjna Northern), natomiast akumulacja białka LIPR10.1A widoczna jest po 16 godzinach trwania stresu (analiza immunochemiczna *Western blotting*). Homologiczne białko LIPR10.1B, które ulega w liściu konstytutywnej ekspresji, pozostaje na nie zmienionym poziomie w czasie działania stresu. Poziom transkryptów genów białek PR10 w liściu po zranieniu wskazuje na przejściową indukcję genu *Llypr10.1a*; nie wykrywa się produktu białkowego metodą immunochemiczną. Białko LIPR10.1A nie jest syntetyzowane w odpowiedzi na stres mechaniczny.

W nie infekowanych korzeniach lucerny *Medicago sativa* wykryto konstytutywną ekspresję genu białka MsPR10. Nie obserwowano obecności transkryptu w innych organach nie infekowanej rośliny. Infekcja liści *P. syringae* pv. *pisi* wywoływała indukcję genu *Ypr10.1* i akumulację białka wokół miejsca infekcji (51). Hybrydyzacja Northern wskazywała na obecność transkryptu także w liściach traktowanych kwasem salicylowym. Hybrydyzacja *in situ* w liściach infekowanych patogenem lokalizuje transkrypt *Mspr10.1* w wiążkach przewodzących liścia wokół miejsca infekcji.

Ekspresję genu PR10 wykryto także w liściach brzozy białej *Betula verrucosa*, wykazującej tolerancję na Cu/Zn (52). Traktowanie korzeni klonu 142A brzozy jonami  $\text{Cu}^{++}$  powodowało 5-krotny wzrost poziomu białka PR10 (Betv1- -Sc3) w korzeniu (30-krotny wzrost zawartości  $\text{Cu}^{++}$  w korzeniu) i 50-krotny wzrost poziomu białka PR10 w liściu. Jony  $\text{Cu}^{++}$  wywołują stres oksydacyjny, który uruchamia mechanizmy obronne rośliny. Podwyższony poziom białka PR10 jest wynikiem odpowiedzi na działanie czynnika stresu.

#### 2.2.5. Białka indukowane w oddziaływaniach symbiotycznych (noduliny)

Brodawkospecyficzne białko klasy PR10 — MtN13 zidentyfikowano w oddziaływaniach symbiotycznych *Medicago truncatula* — *Rhizobium meliloti*, we wczesnych stadiach infekcji (53). Transkrypt genu MtN13 zlokalizowano poprzez hybrydyzację Northern 4 dni po inokulacji. Nie wykrywano natomiast transkryptu w korzeniu nie infekowanym. Nie obserwowano również ekspresji w liściach zarówno nie infekowanych jak i infekowanych patogenem. Ekspresja genu MtN13 jest związana z procesem zasiedlania korzenia przez bakterie symbiotyczne i rozwojem brodawki korzeniowej. Hybrydyzacja *in situ* wskazuje na lokalizację transkryptu MtN13 w korze bro-



dawki. Ekspresja zachodzi na wczesnym etapie rozwoju symbiozy, kiedy brodawka jest otoczona korą korzenia lub zaczyna oddzielać się od powierzchni korzenia. W brodawkach wiążących azot najwyższy poziom transkrypcji obserwuje się w komórkach kory, otaczających merystem wierzchołkowy. Zauważalny spadek ekspresji był obserwowany w warstwach kory sąsiadujących z brzegami brodawki. Białko MtN13 wykazuje 41% identyczności sekwencji z indukowanym pod wpływem patogenezycji białkiem MtPR10.

### 2.2.6. Białka PR10 wykazujące aktywność rybonukleaz

W hodowlach komórkowych żeń-szenia *Panax ginseng* zidentyfikowano dwa homologiczne białka PgRNS1 i PgRNS2, należące do klasy PR10 (Mr 18 000), wykazujące aktywność rybonukleazową (7,8). Identyczność sekwencji aminokwasowych obu białek wynosi 72%. Porównanie sekwencji z pozostałymi białkami klasy PR10 wskazuje na 31-70% identyczności. Białka PgRNS1 i PgRNS2 wykazują endonukleolityczną aktywność wobec RNA, hydrolizując wiązanie 3'-fosfodwuestrowe we wszystkich nukleotydach z wyjątkiem cytydyny. Produktami hydrolizy są nukleozyd i 3'-fosforany oligonukleotydów, powstające poprzez tworzące się przejściowo pochodne cykliczne. Duże podobieństwo sekwencji rybonukleaz żeń-szenia do białek PR10 z innych roślin sugeruje, że funkcja biologiczna pozostałych białek PR10 jest również związana ze zdolnością do hydrolizy RNA. Zbieżność organospecyficznej i rozwojowo-regulowanej ekspresji genów *pr10* i rybonukleaz potwierdza tę hipotezę (41). Istnieją nieliczne doniesienia literaturowe o cytotoksycznej funkcji cytozolowych rybonukleaz w metabolizmie komórkowym i proliferacji (54,55). Znanych jest zaledwie kilka rybonukleaz syntetyzowanych w cytoplazmie. Jednym ze znanych eukariotycznych enzymów jest 2',5'-zależna rybonukleaza L (56). Wykazano również aktywność rybonukleazową alergenu brzozy Betv1 (57,58). Analiza białek pyłków z pojedynczych drzew wskazuje na obecność charakterystycznych grup izomorficznych alergenów (charakterystycznych dla poszczególnych osobników). Może to odzwierciedlać funkcję w rozpoznaniu i samoniezdgodności podczas zapylenia. Samoniezdgodność u roślin związana jest bowiem z aktywnością cytotoksycznych rybonukleaz.

Poznanie struktury trzeciorzędowej alergenu brzozy Betv1 pozwoliło postawić hipotezę o lokalizacji miejsca aktywnego w strukturze białka. Wprawdzie nie ma podobieństwa struktury trzeciorzędowej do innych znanych rybonukleaz, które na podstawie położenia reszt histydynowych mogłoby wskazywać na lokalizację centrum aktywnego białek PR10, jednak porównanie sekwencji wskazuje na obecność w białkach klasy PR10 konserwatywnych aminokwasów, mających udział w tworzeniu struktury trzeciorzędowej (53).

### 2.3. Struktura genów *pr10* i regulacja ekspresji

Badania sekwencji genomowych kilkunastu genów *pr10* wykazały obecność pojedynczego intronu o konserwatywnym położeniu w sekwencji (około 60 aminokwasu) i zmiennej długości (od 89 do 797 nt.) (29,31,32,36,41,47,60-



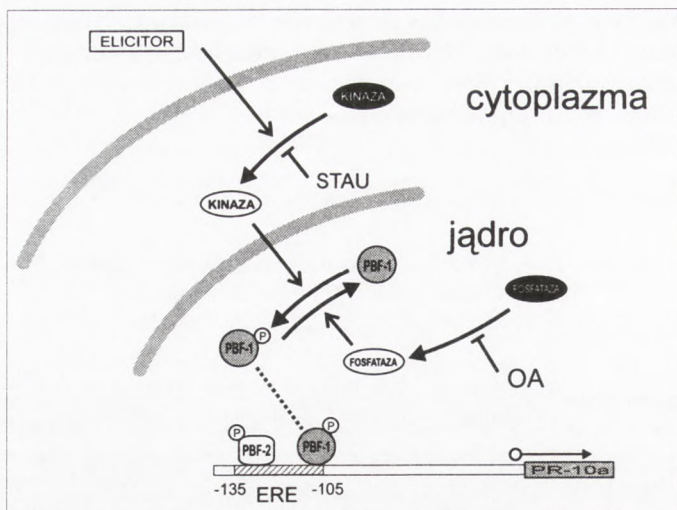
-63) (tab. 3). Wykryto również kilka genów nie posiadających intronu (w brzozie i w jabłoni) (60). Obecność intronów i ich zwiększona długość skorelowana jest z obniżeniem poziomu ekspresji genów *pr10*, co sugeruje udział sekwencji intronowych w regulacji ekspresji.

TABELA 3  
STRUKTURA GENÓW KODUJĄCYCH BIAŁKA KLASY PR10

Rodzina	Nazwa genu	Nazwa białka	Pozycja intronu	Długość intronu	Liczba AA w białku	Nr identyfikacyjny w EMBL GeneBank	Literatura
<b>Betulaceae</b>	bvgc11	BVGC11	—	—	160	Z72429	(60)
	bvgc181	BVGC181	—	—	160	Z72437	
	bvgc31	BVGC31	—	—	160	Z72432	
	bvgc63	BVGC63	—	—	160	Z72435	
	bvgc21	BVGC21	62 (Gly)	92	160	Z72430	
	bvgc25	BVGC25	62 (Gly)	101	160	Z72431	
	bvgc45	BVGC45	62 (Gly)	101	160	Z72434	
	bvgc70	BVGC70	62 (Gly)	89	160	Z72436	
	bvgc681	BVGC681	62 (Gly)	92	160	Z72438	
bvgc34	BVGC34	62 (Gly)	153	160	Z72433		
<b>Rosaceae</b>	mdgc10	MDGC10	—	—	159	Z72425	(60)
	mdgc11	MDGC32	62(Gly)	111	160	Z72426	
	mdgc32	MDGC36	62(Gly)	111	160	Z72427	
	mdgc36	MDGC38	62 (Gly)	111	160	Z72428	
<b>Corylaceae</b>	cagc10	CAGC10	62 Gly	81	160	Z72439	(60)
	cagc11	CAGC11	62 (Gly)	94	160	Z72440	
<b>Apiaceae</b>	PcYpr1-1	PcPR1-1	62 (Ala)	164	155	U48862	(31)
	PcYpr1-2	PcPR1-2	62 (Val)	195	158	X55736	(32)
<b>Fabaceae</b>	PsDRRG49c	PsDRRG49c	61 (Asp)	88	158	JO3680	(61)
	PsDRRG49a	PsDRRG49a	61 (Asp)	76	158	U31669	(62)
	PvYpr10c	PvPR10	61 (Asp)	103	156	X96999	(41)
	LlYpr10.1a	LlPR10.1A	61 (Asp)	457	156	AF002277	(63)
	LlYpr10.1b	LlPR10.1B	61 (Gly)	797	156	AF002278	(63)
	TsYpr10a	TsPR10A	60/61 (Glu/Asp)*	410	157	—	(29)
<b>Solanaceae</b>	StYpr10a	StPR10A	57 (Gly)	359	155	M29041	(36)
	StYpr10b	StPR10B	57 (Gly)	347	155	M29042	(36)
<b>Liliaceae</b>	AoYpr1	AoPR1	63 (Ala)	348	158	X64452	(47)

\*Introny w genach białek PR10 znajdują się między pierwszą i drugą literą odpowiednich kodonów wszystkich analizowanych genów z wyjątkiem genu *TsYpr10a T. subterraneum* (intron między 60 i 61 kodonem). *Bv* — *Betula verrucosa*, *Md* — *Malus domestica*, *Ca* — *Corylus avellana*, *Pc* — *Petroselinum crispum*, *Ps* — *Pisum sativum*, *Pv* — *Phaseolus vulgaris*, *Ll* — *Lupinus luteus*, *St* — *Solanum tuberosum*, *Ao* — *Asparagus officinalis*.





Rys. 2. Uproszczony schemat regulacji ekspresji genu *Solanum tuberosum StYpr10a* z udziałem kinaz i fosfataz białkowych modyfikujących czynniki transkrypcyjne PBF-1 i PBF-2 wiążące się do sekwencji regulatorowych promotora ERE. Aktywacja kinaz białkowych zachodzi pod wpływem elicytora — kwasu arachidonowego (wg 38,39).

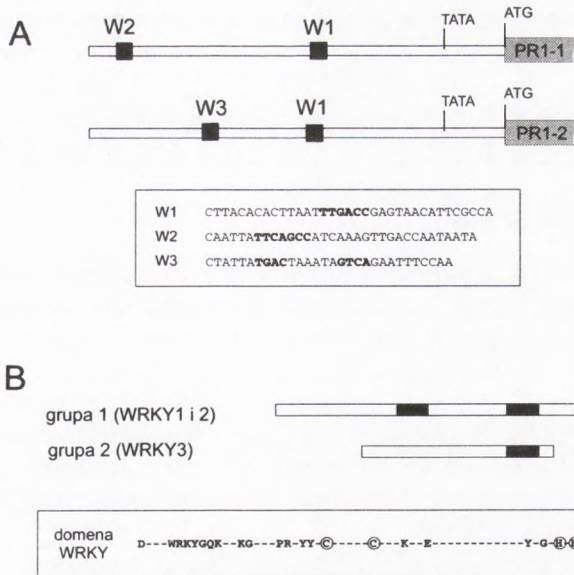
ERE — sekwencja regulatorowa genu (ang. *Elicitor Responsive Element*), STAU — staurosporyna, OA — kwas okadainowy.

Dokładne badania nad regulacją ekspresji przeprowadzono dla genu ziemniaka *StYpr10a* (38,39). Analiza promotora wykazała obecność elementów modulujących poziom ekspresji w sekwencji -1015/-155 nt oraz elementów odpowiedzialnych za indukcję kwasem arachidonowym w rejonie -135/-105 nt i przez zranienie (powyżej -27). Z fragmentem -135/-105 nt promotora oddziałują kompleksy białkowe czynników transkrypcyjnych PBF-1 i PBF-2 (rys. 2).

Oddziaływanie czynnika PBF-1 z DNA uzależnione jest od jego fosforylacji: wykazano, że forma niefosforylowana jest nieaktywna. Sugeruje to udział kaskady fosforylacji w przekazywaniu sygnału od elicytora do jądra komórkowego. Potwierdzają to obserwacje wykazujące zmniejszenie akumulacji białek PR10 pod wpływem inhibitorów kinaz białkowych (64), jak również zjawisko zwiększania ekspresji białek PR pod wpływem kwasu okadainowego będącego inhibitorem fosfataz białkowych, które mogą uczestniczyć w niezależnym szlaku inhibicji białek PR. Wiązanie czynnika PBF-2 do promotora zależne jest od aktywności kinazy białkowej typu C (PKC, homolog zwierzęcych kinaz typu C) i ma wpływ na poziom ekspresji białek PR10, co wykazano w badaniach z użyciem specyficznych inhibitorów i aktywatorów kinazy C.

W regulację ekspresji genów *pr10* zaangażowane są również białka z grupy WRKY, rodziny roślinnych czynników transkrypcyjnych, odpowiedzialnych za różne procesy regulacji ekspresji genów, m.in. regulację hormonalną (65) i zależną od węglowodanów (66). Posiadają one domeny tworzące struktury





Rys. 3. **A.** Struktura promotorów *PcYpr1-1* i *PcYpr1-2* genów kodujących białka *P. crispum* PR10. W1, W2 i W3 oznaczają sekwencje regulatorowe genów (zawierające motyw TGAC) z którymi oddziałują białkowe czynniki transkrypcyjne WRKY1, 2 i 3 (33). **B.** Konserwatywna domena białek WRKY zawierająca reszty cysteiny i histydyny tworzące palce cynkowe (33). Rozróżnia się dwie grupy białek WRKY: 1 — białka posiadające dwa motywy i 2 — jeden motyw WRKY.

palców cynkowych z konserwatywnym motywem WRKY i charakterystycznymi dla tego typu struktur zachowawczymi resztami cysteiny i histydyny (rys. 3). Działanie elicitora Pep25 powoduje gwałtowne zmiany w poziomie białek WRKY 1, 2 i 3, skorelowane ze zmianami w ekspresji genów *pr10* pietruszki *Petroselinum crispum* (32). Po 15 minutach od podania Pep25 poziom mRNA dla białek WRKY1 i 3 osiąga 50% wartości maksymalnej, a po godzinie — maksimum. Ekspresja jest przejściowa i gwałtownie maleje po upływie 60 minut, po 4 godzinach osiąga poziom 12%. Gen białka WRKY2, ulegający ekspresji w nie stresowanych roślinach, pod wpływem elicitora podlega represji. Zmniejszenie jego poziomu zachodzi już po 15 minutach, a po 3 godzinach poziom transkryptu osiąga minimum. Poziom transkryptu białka PcPR-1 zaczyna rosnąć po 15 minutach od indukcji, osiąga wartość maksymalną po 3 godzinach i utrzymuje się na wysokim poziomie przez następne 8 godzin. Maksimum ekspresji białek WRKY1 i 3 wyprzedza zatem o 2 godziny maksimum ekspresji białka PR10. W promotorach genów *pr10* pietruszki (*pr1-1* i *pr1-2*) zidentyfikowano trzy elementy oddziałujące z czynnikiem WRKY: W1, W2 i W3, posiadające wspólny motyw (T)TGAC(C). Mutacje w obrębie tych sekwencji, powodujące osłabienie wiązania białek WRKY do elementów W, równocześnie wywołują obniżenie poziomu ekspresji promotorów *pr10* w roślinach transgenicznym. W przeprowadzonych eksperymentach



z promotorami zawierającymi zwielokrotnione sekwencje W1 połączone z minimalnym promotorem 35S (CaMV) wykazano, że obecność sekwencji W1 jest wystarczająca do wywołania wysokiej odpowiedzi na elitor. Podobne sekwencje zidentyfikowano również w kilku innych roślinach, m.in. w ziemniaku *Solanum tuberosum* (38) i kukurydzy *Zea mays* (67).

#### 2.4. Ewolucja białek PR10

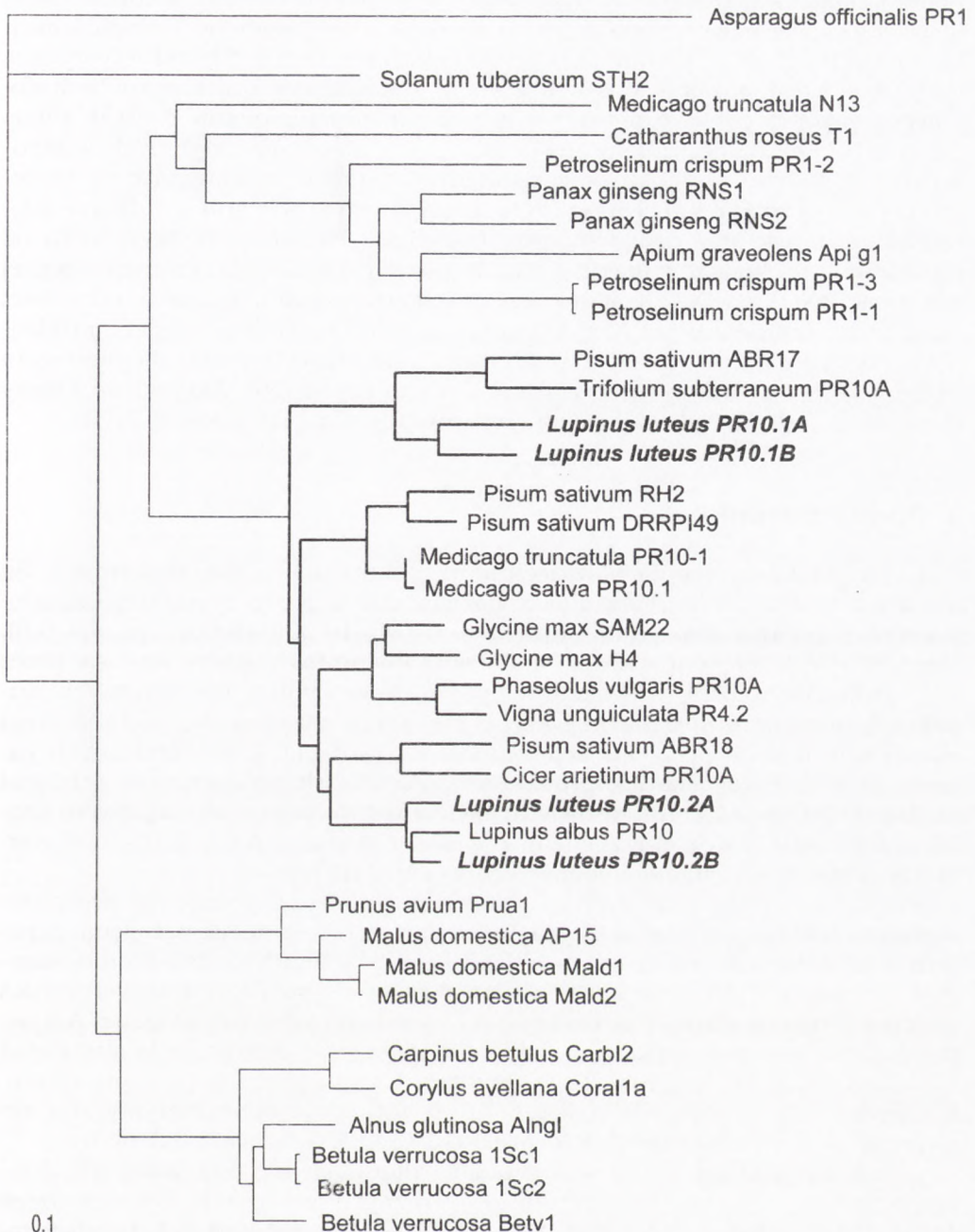
Białka PR10 zostały wykryte u wielu gatunków roślin, należących do jedno- i dwuliściennych i, jak się wydaje, występują powszechnie w królestwie roślin. Brak jest homologów genów *pr10* u innych organizmów; nie znaleziono ich w genomach *E. coli* i *S. cerevisiae*, jak również u zwierząt. Obecnie znanych jest ponad 50 pełnych sekwencji białek PR10, z których najbardziej odległe posiadają 25% identyczności na poziomie aminokwasowym, co wskazuje na ich jednakową strukturę drugorzędową i wspólne pochodzenie ich genów. Drzewo filogenetyczne oparte na sekwencjach aminokwasowych przedstawiono na rysunku 4.

Główny podział drzewa przebiega pomiędzy roślinami dwuliściennymi a jednoliściennymi (AoPR1). Wyraźnie wyodrębnione są grupy sekwencji z roślin należących do podrodzin *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Betulaceae* i *Apiaceae*, lecz podział na rodziny *Asteridae* i *Rosidae* nie jest zachowany. Wynika to z braku zdecydowanej informacji o grupowaniu się rodzin w sekwencjach białek PR10, o czym świadczą niskie wartości poparcia procentowego dla tych gałęzi (30-50% przy progu istotności wynoszącym 75%). Nietypową lokalizację sekwencji z ziemniaka (StSTH2) można wyjaśnić duplikacją genu *pr10* u wspólnego przodka roślin dwuliściennych. Duplikacje genowe mają decydujące znaczenie dla topologii drzewa PR10 w obrębie podrodzin. Duża liczba bardzo podobnych sekwencji u brzozy (grupa Betv1) i leszczyny (grupa Coral) świadczy o istnieniu liczebnych rodzin genowych, w których prawdopodobne jest występowanie zgrupowań genów sąsiadujących ze sobą na chromosomie, podlegających przez to ewolucji zespołowej (ang. *concerted evolution*). U motylkowatych można wyróżnić przynajmniej 5 grup białek PR10, będących wzajemnie paralogicznymi, powstałych w wyniku kolejnych duplikacji genu. Najwcześniejsza duplikacja doprowadziła do wyodrębnienia się homologu MtN13, który przyjął funkcję brodawkospecyficzną w lucernie *M. truncatula* (podczas gdy np. homologii łubinu żółtego LIPR10.1A i LIPR10.1B, ulegają w brodawkach represji), drugi homolog ulegał duplikacjom przynajmniej trzykrotnie, doprowadzając do powstania kolejnych czterech grup białek PR10.

#### 2.5. Struktura trzeciorzędowa białka Betv1

Struktura przestrzenna została określona dla białka Betv1, alergenu z pyłku brzozy *Betula verrucosa*, jednego z najlepiej scharakteryzowanych przedstawicieli białek klasy PR10 (15). Podstawą struktury jest siedem antyrównoległych łańcuchów  $\beta$ , częściowo obejmujących długą, 25-aminokwasową





Rys. 4. Drzewo filogenetyczne białek PR10.

Analizę sekwencji i drzewo filogenetyczne wykonano metodą *neighbor-joining* z sekwencji aminokwasowych przy użyciu programów z pakietu PHYLIP i TreeView.



helisę C-końcową. Dodatkowe dwie helisy występują w pobliżu N-końca. Struktura wykazuje pewne podobieństwo do C-końcowej domeny fosfoglukomutazy z mięśni królika, pomimo braku homologii sekwencji. Charakterystyczną cechą jest występowanie dość obszernej, rozgałęzionej przestrzeni hydrofobowej wewnątrz cząsteczki, pomiędzy helisami a łańcuchami  $\beta$ . Brak informacji o funkcji białka uniemożliwia lokalizację obszarów aktywnych w strukturze. Porównanie struktury z rozkładem rejonów zachowawczych w sekwencjach wykazuje największą konserwatywność w obszarach o dobrze zdefiniowanej strukturze drugorzędowej ( $\alpha$ -helisy i łańcuchy  $\beta$ ). Wyjątkiem od tej reguły jest konserwatywna pętla w pozycji 47-52, o sekwencji bogatej w glicynę GXGXXGXXK, sąsiadująca z zachowawczymi lizynami w odległości kilkunastu aminokwasów. Motyw ten przypomina sekwencje wiążące nukleotydy, występujące w kinazach białkowych, w których pętla glicynobogata wiąże rybozę, a fosforan jest związany z resztą lizyny (59). Aktywność kinazy nie została jednak wykazana eksperymentalnie dla białek klasy PR10.

### 3. Podsumowanie

Białka PR10 występują powszechnie u roślin jedno- i dwuliściennych. Są to rozpuszczalne białka cytozolowe, pozbawione peptydu sygnałnego zbudowane ze 153-163 reszt aminokwasowych ( $M_r$  16 000-18 000, pI 4,4-6,5). Charakteryzują się odpornością na działanie proteaz. Kodowane są przez geny tworzące rodziny wielogenowe, powstałe w wyniku wielokrotnych duplikacji. Geny *pr10* ulegają transkrypcyjnej aktywacji nie tylko pod wpływem stresu wywołanego przez infekcję patogena, zranienia, czy chemicznych zanieczyszczeń środowiska lub promieniowania UV. Ekspresja genów *pr10* jest organospecyficzna i regulowana w trakcie rozwoju roślin pod wpływem fitohormonów (ABA, cytokininy, etylen). U większości analizowanych roślin stwierdzono obecność wielu homologicznych białek PR10.

Funkcja obronna białek PR10, jak się przypuszcza, polega na tworzeniu mechanicznej bariery uniemożliwiającej rozprzestrzenianie się patogena. Strukturalne podobieństwo do rybonukleaz PgrNS1 i PgrNS2 sugeruje, że białka PR10 posiadają aktywność rybonukleaz degradujących mRNA podczas programowanej śmierci komórki wywołanej infekcją patogena. Aktywność rybonukleazową wykazano jedynie dla alergenu pyłkowego brzozy Betv1 i białka LIPR10.1B łubinu żółtego (Sikorski i wsp., praca w przygotowaniu). We wszystkich poznanych białkach PR10 występuje charakterystyczna sekwencja glicynobogata (ang. *P-loop*) **GXGGXGXXK** wiążąca nukleotydy.

Akumulacja białek PR10 w organach i tkankach nie poddawanych działaniu stresu wskazuje na ich udział w różnych procesach fizjologicznych roślin (zapobieganie somozapyleniu, udział w tworzeniu wiązek przewodzących i ksylogenezie, desykcja nasion, oddziaływania roślin — mikrosymbiont).



## Literatura

1. Dixon R. A., Harrison M. J., (1990), *Adv. Genet.*, 28, 165-234.
2. Kombrink E., Somssich I. E., (1995), *Advances in botanical research*, Eds. Andrews J. H., Tommerup I. C., 21, 1-34, Academic Press, London.
3. van Loon L. C., Pierpoint W. S., Boller T., Conejero V., (1994), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 20, 513-527.
4. Kombrink E., Somssich I. E., (1997), *The Mycota*, V Part A, *Plant Relationships*, Eds. Carroll/Tudzynski, 6, 107-128, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
5. van Loon L. C., (1998), 5<sup>th</sup> Inter. Workshop Pathogenesis-Related Proteins in Plants, Aussois, Francja, Abstr. p.L1.
6. Somssich I. E., Schmelzer E., Bollmann J., Hahlbrock K., (1986), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, 83, 2427-2430.
7. Moiseyev G. P., Beintema J. J., Fedoreyeva L. I., Yakovlev G. I., (1994), *Planta*, 193, 470-472.
8. Moiseyev G. P., Fedoreyeva L. I., Zhuravlev Y. N., Yasnetskaya E., Jekel P. A., Yakovlev G. I., Beintema J. J., (1997), *FEBS Lett.*, 407, 207-210.
9. Belin L., (1972), *Int. Arch. Allergy*, 42, 329-342.
10. Viander M., Fraki J., Djupsund B. M., Laine S., (1979), *Allergy*, 34, 289-302.
11. Apold J., Florvaag E., Elsayed S., (1981), *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 64, 439-447.
12. Ipsen H., Lovenstein H., (1983), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 72, 150-159.
13. Ipsen H., Hansen O. C., (1991), *Mol. Immunol.*, 28, 1279-1288.
14. Ipsen H., Wihl J.-A., Nüchel Petersen B., Lovenstein H., (1992), *Clin. Exp. Allergy*, 22, 391-399.
15. Gajhede M., Osmark P., Poulsen F. M., Ipsen H., Larsen J. N., Loost van Neersen R. J., Schou C., Lovenstein H., Spangfort M. D., (1996), *Nature Str. Biol.*, 3, 1040-1065.
16. Breiteneder H., Hoffmann-Sommergruber K., O'Riordain G., Susani M., Ahorn H., Ebner C., Kraft D., Scheiner O., (1995), *Eur. J. Biochem.*, 233, 484-489.
17. Yamamoto M., Torikai S., Oeda K., (1997), *Plant Cell Physiol.*, 38, 1080-1086.
18. Vieths S., Janek K., Aulepp H., Petersen A., (1995), *Allergy*, 50, 421-430.
19. Vanek-Krebitz M., Hoffmann-Sommergruber K., Laimer da Camara Machado M., Susani M., Ebner C., Kraft D., Scheiner O., Breiteneder H., (1995), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214, 538-551.
20. Scheurer S., Metzner K., Haustein D., Vieths S., (1997), *Mol. Immunol.*, 34, 619-629.
21. Barrat D. H. P., Clark J. A., (1991), *Planta*, 184, 14-23.
22. Iturriaga E. A., Leech M. J., Barrat D. H. P., Wang T. L., (1994), *Plant Mol. Biol.*, (1994), 24, 235-240.
23. Cervantes E., Nicolas C., Gonzalez B., Iturriaga E. A., (1995), (PGR95-115), *Plant Physiol.*, 110, 335.
24. Carpin S., Laffer S., Schoentgen F., Valenta R., Chenieux J.-C., Rideau M., Hamdi S., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 36, 791-798.
25. Crowell D. N., John M. E., Russell D., Amasino R., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 18, 459-466.
26. Mylona P., Moerman M., Yang W.-C., van de Kerckhove J., van Kammen A., Bisseling T., Franssen H. J., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 26, 39-50.
27. Huang J.-C., Chang F.-C., Wang C.-S., (1997), *Plant Mol. Biol.*, 34, 681-886.
28. Sikorski M. M., Szlagowska A., Legocki A. B., (1996), (PGR95-114), *Plant Physiol.*, 110, 335.
29. Broderick K., Pittock C., Arioli T., Creaser E. H., Weinman Rolfe B. G., (1997), *Austr. J. Plant Physiol.*, 24, 819-829.
30. Somssich I. E., Schmelzer E., Bollmann J., Hahlbrock K., (1986), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, 83, 2427-2430.
31. Somssich I. E., Schmelzer E., Kawalleck P., Hahlbrock K., (1988), *Mol. Gen. Genet.*, 213, 93-98.
32. van de Locht U., Meier I., Hahlbrock K., Somssich I. E., (1990), *EMBO J.*, 9, 2945-2950.
33. Rushton P. J., Torres J. T., Parniske M., Wernert P., Hahlbrock K., (1996), *EMBO J.*, 15, 5690-5700.



34. Matton D. P., Brisson N., (1989), *Mol. Plant Microbe-Interac.*, 2, 325-331.
35. Matton D. P., Bell B., Brisson N., (1990), *Plant Mol. Biol.*, 14, 863-865.
36. Matton D. P., Prescott G., Bertrand C., Camirand A., Brisson N., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 22, 279-291.
37. Constabel C. P., Brisson N., (1995), *Mol. Plant Microbe-Interac.*, 8, 104-113.
38. Deprés C., Subramaniam R., Matton D. P., Brisson N., (1995), *Plant Cell*, 7, 589-598.
39. Subramaniam R., Deprés C., Brisson N., (1997), *Plant Cell*, 9, 653-664.
40. Walter M. H., Liu J.-W., Grand C., Lamb C. J., Hess D., (1990), *Mol. Gen. Genet.*, 222, 353-360.
41. Walter M. H., Liu J.-W., Wunn J., Hess D., (1996), *Eur. J. Biochem.*, 239, 281-293.
42. Green P. J., (1994), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, 45, 421-425.
43. Blank A., McKeon T. A., (1991), *Plant Physiol.*, (Bethesda), 97, 1409-1413.
44. Huang S., Lee H. S., Karunanandaa B., Kao T. H., (1994), *Plant Cell*, 6, 1021-1028.
45. Thelen M. P., Northcote D. H., (1989), *Planta (Heidelb.)*, 179, 181-195.
46. Warner S. A. J., Scott R., Draper J., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 19, 555-561.
47. Warner S. A. J., Scott R., Draper J., (1993), *Plant J.*, 3, 191-201.
48. Warner S. A. J., Gill A., Draper J., (1994), *Plant J.*, 6, 31-43.
49. Pinto M. P., Ricardo C., (1995), *Plant Physiol.*, 109, 1345-1351.
50. Sikorski M. M., Buffard D., Breda C., Biesiadka J., Legocki A. B., Esnault R., Kondorosi A., (1998), 5<sup>th</sup> Inter. Workshop Pathogenesis-Related Proteins in Plants, Aussois, Francia, Abstr., P-24.
51. Breda C., Sallaud C., El-turk J., Buffard D., de Kozak I., Esnault R., Kondorosi A., (1996), *Mol. Plant-Microbe Interac.*, 9, 713-719.
52. Utraiainen M., Kokko H., Auriola S., Sarrazin O., Karenlampi S., (1998), 5<sup>th</sup> Inter. Workshop Pathogenesis-Related Proteins in Plants, Aussois, Francia, Abstr., P-13.
53. Gamas P., de Carvalho Niebel F., Lescure N., Cullimore J. V., (1996), *Mol. Plant-Microbe Interac.*, 9, 233-242.
54. D'Alesio G., (1993), *Trends Cell Biol.*, 3, 106-109.
55. Youle R. J., Newton D., Wu Y.-N., Gadino M., Rybak S. M., (1993), *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 10, 1-28.
56. Zhou A., Hassel B. A., Silverman R. H., (1993), *Cell*, 72, 753-765.
57. Swoboda I., Hoffmann-Sommergruber K., O'Riordáin G., Scheiner O., Heberle-Bors E., Vicente O., (1996), *Physiol. Plantarum*, 96, 433-438.
58. Bufe A., Spangfort M. D., Kahlert H., Schlaak M., Becker W.-M., (1996), *Planta*, 199, 413-415.
59. Saraste M., Sibbald P. R., Wittinghofer A., (1990), *Trends Biochem Sci.*, 15, 430-434.
60. Hoffmann-Sommergruber K., Vanek-Krebitz M., Radauer C., Wen J., Ferreira F., Scheiner O., Breiteneder H., (1997), *Gene*, 197, 91-100.
61. Chiang C. C., Hadwiger L. A., (1990), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 3, 78-85.
62. Culley D. E., Brown S. M., Parsons A., Hadwiger L. A., Fristensky B. W., (1995), (PGR075-70), *Plant Physiol.*, 109, 722.
63. Sikorski M. M., Szałowska A. E., Legocki A. B., (1998), (PGR98-045), *Plant Physiol.*, 116, 1192.
64. Grosskopf D. G., Felix G., Boller T., (1990), *Febs Lett.*, 275, 177-180.
65. Ruston P. J., Macdonald H., Huttly A. K., Lazarus C. M., Hooley R., (1995), *Plant Mol. Biol.*, 29, 691-702.
66. Ishiguro S., Nakamura K., (1994), *Mol. Gen. Genet.*, (1994), 244, 563-571.
67. Raventos D., Jensen A. B., Rask M.-B., Casacuberta J. M., Mundy J., San Segundo B., (1995), *Plant J.*, 7, 147-155.



## Structure and organ-specific expression of plant genes encoding proteins of PR10 class

### Summary

Intracellular Pathogenesis-Related (IPR) Proteins of PR10 class are ubiquitous in the plant kingdom. Their homologues were found in both monocotyledonous and dicotyledonous plants. PR10 proteins are small polypeptides of  $M_r$  16 000 – 18 000, slightly acidic and resistant to proteases. The absence of an apparent signal peptide and their structural properties indicate that they are cytosolic. PR10 proteins are encoded by small multigene families. They accumulate around sites of pathogen invasion, wounding and are induced by other environmental stress, suggesting their involvement in a general defence mechanism. The physiological function and any contribution of PR10 proteins to a defence mechanism remains unknown. However, high amino acid sequence homology and the similarity of the expression pattern with that of ginseng ribonuclease suggest that an RNase activity associated with these proteins may be involved in the defence reaction.

There are also suggestions that PR10 proteins play an important role in the plant development, since they have been identified in dry seeds, developed roots, stems, various parts of flowers and senescent leaves. Some PR10 protein homologues appeared to be induced by plant hormones (abscisic acid, cytokinin and ethylene) and show organ-specific expression, what indicates their involvement in different physiological processes of non stressed plant.

### Key words:

gene expression, pathogenesis-related proteins, pathogenesis, symbiosis.

### *Adres do korespondencji:*

Michał M. Sikorski, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, e-mail: mmsik@ibch.poznan.pl