

WIELOFUNKCYJNE BIAŁKA GERMINY I GERMINO- -PODOBNE U ROŚLIN

MULTIFUNCTIONAL GERMIN PROTEIN AND GERMIN-LIKE PROTEINS IN PLANTS

Izabela SZUĆKO, Ewa FILIP, Renata SŁOMINSKA-WALKOWIAK,
Lidia SKUZA

Katedra Biologii Komórki, Wydział Biologii,
Uniwersytet Szczeciński

Streszczenie: Germiny i białka podobne do germin (GLPs) stanowią dużą i bardzo zróżnicowaną rodzinę wszechobecnych białek roślinnych. Należą one do nadrodziny cupin, której nazwa pochodzi od domeny o budowie β -beczułki (z łaciny *cupa*- mała beczułka). Jest to domena konserwatywna ewolucyjnie i zlokalizowana w końcu C tych białek. Składa się ona z dwóch motywów sekwencji aminokwasowych: 1 i 2 opisywanych jako "germin box". Domena cupin warunkuje wysoką termostabilność białek, która uwarunkowana jest obecnością mostków disiarczkowych i stopniem glikozylacji. Obecność domeny cupin nadaje białkom odporność na działanie proteaz. Germiny występują w dwóch izoformach, gf-2.8 i gf-3.8, kodowanych przez geny *gf-2.8* i *gf-3.8*, które są aktywne w czasie kiełkowania ziarniaków wszystkich ważnych ekonomicznie zbóż. W obu tych genach występują obszary bezintronowe kodujące 224 aminokwasy wykazujące 90% homologii. Ciekawe jest to, że w genie *gf-2.8* w obszarze 5' występują dwa motywy sekwencyjne charakterystyczne dla genów auksynowych. Wyróżniono 6 podrodzin białek germinowych o różnej aktywności enzymatycznej. Poznano wiele białek podobnych do germin zaangażowanych w reakcje obronne roślin przed patogenami i szkodnikami. Stwierdzono działanie obronne GLPs w apoplacie, gdzie ulegają ekspresji i reagują ze ścianą komórkową ułatwiając wczesną odpowiedź na atak patogena. Szczególne znaczenie mają GLPs z aktywnością oksydazy szczawianowej, gdyż obniżają poziom szczawianu, który jest czynnikiem wirulencji wytwarzanym przez kilka patogenów grzybowych. Transkrypcja genu kodującego germinę oraz aktywność oksydazy szczawianowej są stymulowane przez infekcje grzybicze oraz niektóre jony metali. Pszeniczna germina ma również ogromny potencjał dla zastosowań komercyjnych ze względu na wcześniej wspomnianą, niezwykle odporność na proteazy, wysoką stabilność i odporność na ciepło.

Słowa kluczowe: cupiny, germiny, GLPs

Summary: Germins and germin-like proteins constitute a large and very diverse family of ubiquitous plant proteins. They belong to the cupin superfamily of proteins which name comes from the domain

of β -barrel structure (from the Latin *Cupa* - small barrel). It is evolutionary conserved domain localized in C-terminal end. It consists of two amino acid sequence motifs: 1 and 2, described as the 'germin box'. Cupin domain determines the high thermal stability, which is come out of the presence of disulphide bridges and the glycosylation degree. The presence of domain cupin suitable these proteins resistance to the protease protein. Germins occur in two isoforms gf-2.8 and gf-3.8 encoded by the *gf-2.8* and *gf-3.8* genes, active during the embryos germination of all economically important crops. In both genes there are regions without introns, which encode 224 amino acids, showing 90% homology. It is interesting that in the 5' region of *gf-2.8* gene; there are two sequence motifs characteristic of auxin genes. There has been distinguished six subfamilies of germin-like proteins with different enzymatic activity. There has been recognized a lot of germin-like proteins involved in plant defense responses against pathogens and pests. Defensive activity of GLP was found in apoplast which are expressed and react with the cell wall by facilitating an early response to pathogen attack. Particularly important are GLPs with oxalate oxidase activity, because they lower levels of oxalate, which is a virulence factor produced by several fungal pathogens. Transcription of the genes encoding germins and oxalate oxidase activity is stimulated by fungal infections and some metal ions. Wheat germin also have enormous potential for commercial applications because of the previously mentioned unusual resistance to proteases, high stability and resistance to heat.

Key words: cupins, germins, GLPs

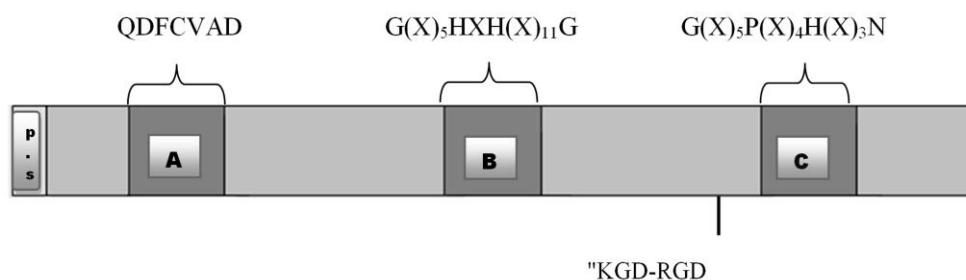
WSTĘP

Białka germiny i ich germino-podobne (GLPs - ang. *germin-like proteins*) należą do nadrodziny cupin. Cupiny są białkami zróżnicowanymi funkcjonalnie, są termostabilne i odporne na proteazy. Wszystkie cupiny posiadają domenę β -beczułki, stąd ich nazwa pochodząca od łacińskiego słowa „cupa”, co oznacza beczułka. Do tej nadrodziny należą enzymy, chaperony i inne nieenzymatyczne białka, które mogą mieć jedną lub dwie domeny cupin. Mogą one funkcjonować jako izomeraza i epimeraza, które są zaangażowane w modyfikowanie węglowodanów ściany komórkowej u bakterii. Do cupin należą też białka zapasowe w nasionach roślin oraz czynniki transkrypcyjne sprzężone z wrodzonym łysieniem u ssaków [17, 18, 19]. Cupiny zostały zidentyfikowane i opisane po odkryciu germin, niezwykle termostabilnych białek wytwarzanych we wczesnej fazie kiełkowania zarodków pszenicy (*Triticum aestivum* L.) [13]. U roślin dwuliściennych opisano także wiele białek podobnych do germin, wśród nich są białka zapasowe w nasionach oraz wicyliny i leguminy, białka obecne w nasionach i sporach o dużej tolerancji na wysychanie.

Germiny i GLPs są zaangażowane przede wszystkim w rozwój roślin oraz ich odpowiedź obronną. Pełnią funkcję zarówno białek enzymatycznych, strukturalnych, jak i receptorowych [16, 17, 18].

STRUKTURA I FUNKCJONALNA RÓŻNORODNOŚĆ NADRODZINY CUPIN

Jak wcześniej wspomniano charakterystyczną cechą tych białek jest obecność specyficznej domeny „cupin”. Domena ta składa się z dwóch konserwatywnych motywów – 1 i 2, każdy z nich odpowiada dwóm β -niciom rozdzielonym przez mniej konserwatywny obszar złożony z dwóch innych β -nici z pośrednią pętlą o zmiennej długości, wahającej się w szerokim zakresie – od 15 aminokwasów w niektórych enzymach bakteryjnych, np. w izomerazie fosfomannozy do ponad 50 w białkach zapasowych i eukariotycznych czynnikach transkrypcyjnych [18]. Zmienną liczbę reszt w regionie położonym pomiędzy motywami wykorzystano do zdefiniowania przynajmniej 18 podklas cupin u Archea, Bacteria i Eucariota. Pierwszy $(G(X)5HXH-(X)3, 4E(X)6G)$ i drugi $(G(X)5PXG(X)2H(X)3N)$ motyw cupin opisywane są jako „germin box” (ryc.1). W pierwszym motywie dwie reszty histydynowe (His) i reszta kwasu glutaminowego (Glu) łącznie z resztą His w motywie drugim, działają jak ligandy wiążące jony magnezu w archetypowych miejscach aktywnych „cupin”.



RYCINA. 1 Schemat przedstawiający typową organizację germin i GLPs. (opracowanie własne w oparciu o [5, 45]). Wszystkie polipeptydy germin i GLPs składają się z około 220 aminokwasów, w tym domniemanego peptydu sygnałowego. Dojrzałe białko składa się z trzech wysoce konserwatywnych oligopeptydów (pola A, B i C). Jeden hyperzmienny region graniczy z dwoma cysteinami i z wieloma pozostałymi, konserwatywnymi aminokwasami, które są umiarkowanie rozproszone. Pola B i C zawierają trzy histydyny i glutaminian, pozostałości które były zaangażowane w wiązanie metali. Inną ważną cechą, rzekomo zaobserwowaną u ponad połowy z GLPs, ale nie w germinach, jest obecność tripeptydu RGD lub, częściej, peptydów KGD (lub czasem KGE). Jasno szarym kolorem oznaczono sekwencje konserwatywne natomiast ciemno szarym wysoce konserwatywne. Literami A, B, C oznaczono "germin box", X oznacza każdy aminokwas, ps- peptyd sygnałowy

FIGURE 1. Schematic representation of the typical organization of germins and GLPs (own description on the basis of [5, 45]). All germin and GLPs polypeptides consist of approximately 220 amino acids, including putative signal peptide. Mature protein consists of three highly conserved oligopeptides (A, B and C boxes). One hypervariable region adjoin two cysteines and many others, conserved amino acids, which are moderately dispersed. Boxes B and C contains three histidine and a glutamate involved in metal binding. Another important feature that has been supposedly observed

in more than half of the GLPs, but not in germins, is the presence of a RGD tripeptide or, more often, KGD (or sometimes KGE) peptides. Light grey indicates sequence conservation while dark grey indicates very high sequence conservation. Letters A,B,C indicates "germin box", X, any amino acid, ps, signal peptide

Dodatkowo podklasy cupin mogą być podzielone na dwie grupy, monocupiny i bicupiny. Monocupiny mają jedną domenę cupin. Do nich należy bakteryjna izomeraza fosfomannozowa (PMIs), bakteryjne regulatory transkrypcyjne AraC, roślinne oksydazy szczawianowe i roślinne germiny. Natomiast bicupiny mają dwie domeny cupin wśród których znajdują się roślinne białka zapasowe nasion i roślinne dekarboksylazy szczawianowe [6, 24, 29, 35, 45]

Domena cupin warunkuje wysoką termostabilność białek, co może być związane z działaniem zarówno czynników wewnętrznych (m.in.: oddziaływania hydrofobowe, wiązania wodorowe, efektywne upakowanie) jak i zewnętrznych (m.in.: obecność jonów, kofaktorów). Istotnym czynnikiem warunkującym termostabilność cupin jest obecność mostków disiarczkowych cysteina-cysteina, a także stopień ich glikozylacji. Funkcjonalną konsekwencją termostabilności jest przewaga selekcyjna tych białek w czasie i miejscu, w których wystąpi wysoka temperatura. Przykładami tego są następujące cupiny: i) sferulina indukowana w stadium cysty u *Physarum polycephalum* [29, 32], ii) izomerazy fosfomannozowe (PMIs) odpowiedzialne za produkcję kwasu alginowego, obecne u *Pseudomonas* rosnących w warunkach wysychania oraz u *Azotobacter vinelandii*, w czasie różnicowania cyst odpornych na wysychanie iii) syntaza ektoiny, która katalizuje syntezę bakteryjnego osmoprotektanta - ektoiny (kwas karboksylowy 1,4,5,6-tetrahydro-2-metyl-4-pyrimidyny). Najbardziej interesującym przykładem eukariotycznych termostabilnych cupin są białka globuliny oraz białka zapasowe wicyliny i leguminy. Inną cechą cupin jest odporność na działanie proteaz, szczególnie ważna dla białek aktywnych na powierzchni komórki lub w przestrzeni pozakomórkowej, gdzie tych enzymów jest najwięcej. U eukariontów taką cechę mają białka germiny i germino-podobne (GLPs). Ze względu na tę właściwość, germiny mogą być izolowane poprzez traktowanie zhomogenizowanej tkanki pepsyną. Ciekawy wydaje się fakt, że u globulin, białek zapasowych nasion, powierzchnia pętli germin, która musi być degradowana w czasie kiełkowania nasion w celu dostarczenia aminokwasów dla rozwijającego się zarodka, jest znacznie powiększona [17]. Najważniejszą cechą trzeciorzędowej struktury domeny cupin, biorąc pod uwagę biochemiczny aspekt funkcjonalności, jest prawdopodobnie elastyczność jej centrum aktywnego leżącego w obrębie β -beczułki. Wynika to częściowo z tego, że różne metale są wiązane przez ligandy w motywach 1 i 2, w konsekwencji tego wewnątrz centrum aktywnego zachodzą różne reakcje i powstają różne typy wiązań chemicznych. Przykładem jest dwufunkcyjna germina, która ma aktywność dysmutazy nadtlenkowej oraz oksydazy szczawianowej. Inną ważną dla rozwoju roślin funkcją cupin jest ich zaangażowanie w modyfikację ściany komórkowej. W tym procesie główną rolę

odgrywają germiny, które dostarczają nadtlarki dla krzyżowych połączeń komponentów ściany komórkowej i kontrolują jej rozciąganie się [45].

GENETYCZNA DETERMINACJA STRUKTURY GERMIN

Termin „germina” określa białka specyficzne dla kiełkowania zarodków pszenicznych. Pszeniczna germina jest homopentameryczną glikoproteiną rozpuszczalną w wodzie, o masie 125 kDa, zlokalizowaną głównie w ścianie komórkowej. Białka germiny zidentyfikowano w wielu roślinach jednoliściennych i dwuliściennych [16, 32, 39]. Inne nazwy tych białek to „właściwe germiny” (ang. *true germins*), „Oxox” (ang. *germin-like oxalate oxidase*), germiny o aktywności oksydazy szczawianowej, białka podobne do germin (ang. *germins-like proteins*) lub białka podobne do oksydazy szczawianowej (ang. *oxalate oxidase-like proteins*). To nazewnictwo odzwierciedla różnorodne funkcje tych białek. Natomiast w wyniku analizy filogenetycznej wyodrębniono tzw. „prawdziwe germiny” („*true germins*”) i białka germino – podobne (ang. *germin-like proteins*). Białka zaliczane do pierwszej grupy charakteryzują się stosunkowo wysokim podobieństwem sekwencji aminokwasowych (ponad 90%), natomiast te zaliczane do drugiej grupy (GLPs), dużo liczniejszej, wykazują znaczną ich rozbieżność [4, 5, 8, 10, 13, 24, 32, 33].

Germiny występują w dwóch spokrewnionych izoformach (gf-2.8 i gf-3.8) kodowanych przez geny *gf-2.8* i *gf-3.8* w czasie kiełkowania ziarniaków wszystkich ważnych ekonomicznie zbóż: pszenicy, jęczmienia, żyta, owsa, kukurydzy i ryżu. Wykazują one okresową ekspresję i możliwe, że istotna część zmian jaka występuje w czasie kiełkowania nasion jest skierowana na ekspresję genów kodujących germiny. Uzyskano całkowitą długość cDNA germin i na tej podstawie określono ich sekwencję polinukleotydową [30]. W badaniach z zastosowaniem tego cDNA jako sondy wykazano, że germina jest kodowana przez wielogenową rodzinę, która mapuje się przede wszystkim na chromosomach: 4A~5 kopii, 4B~3 kopie i 4D~9 kopii w pszenicy heksaploidalnej. W genach *gf-2.8* i *gf-3.8* bezintronowe obszary kodujące 224 aminokwasy wykazują 90% homologię. W obszarze flankującym 5' obu genów, za wyjątkiem niektórych miejsc rozrzuconych działających jako cis-elementy regulacyjne, nie ma podobieństwa w sekwencji nukleotydów. W obszarach kodujących strukturę dojrzałych białek (201 aminokwasów) występuje dość stałe podobieństwo (92%), a centralna część białka (rdzeń) licząca 91 aminokwasów jest w pełni konserwatywna. Istnieje również duże podobieństwo między tymi genami w obszarze 5' i 3' UTR oraz między bezintronową sekwencją kodującą peptyd sygnałny i sekwencjami kodującymi dojrzałe białko. W pobliżu „rdzenia” germin znajduje się rzadka deka-peptydowa sekwencja PH(I/T)HPRATEI, która jest obecna także w sferulinach. To podobieństwo germin do sferuliny sugeruje, że ich

aktywność biochemiczna jest zaangażowana w odpowiedź komórkową lub odpowiedź ściany komórkowej na desykcję, nawodnienie i stres osmotyczny. Godne uwagi jest to, że w genie *gf-2.8* obecne są dwie sekwencje w obszarze 5' charakterystyczne dla genów auksynowych: ¹⁶¹²GCACATGCA¹⁶²⁰ i ¹⁶³²GCTCCATGCA¹⁶⁴⁰ [31]. Wyróżniono 6 podrodzin białek germinowych (GER1-6), które wykazują różną aktywność enzymatyczną np. aktywność OXO u prawdziwych germin - GER1, aktywność SOD u GER2, GER4 i GER5 [2, 16]. Okazało się, że GER1 jest ważna w kiełkowaniu nasion i we wczesnym rozwoju roślin [23]. Analiza krystalograficzna germin jęczmiennych potwierdziła, że sześć białek germin, z których każde ma przyłączony jeden jon manganu, tworzy ekstremalnie stabilną strukturę heksameryczną [45]. Każdy białkowy monomer germiny łączy się z innym monomerem i powstaje dimer, następnie trzy takie dimery łączą się ze sobą i powstaje heksamer. Jony manganu w germinie są połączone przez ligandy podobnie jak jony manganu w dysmutazie nadtlenkowej (SOD), którą to aktywność enzymatyczną mają germiny i białka podobne do germin [8]. Każdy monomer germiny składa się z wydłużonego nieregularnego końca N, domeny β-beczulki i domeny C z sekwencją tworzącą 3 α-helisy. Ten nieregularny N koniec jest konserwatywny w wielu GLPs. Ogólnie heksamer zbudowany jest z 1200 aminokwasów o masie około 130 kDa. Jednak nie wszystkie GLPs mają taką budowę, bowiem z ryżu wyizolowano GLPs o aktywności SOD w formie dimerycznej [2]. Prawdziwe germiny – "true germins" mają aktywność OXO i są obecne prawie wyłącznie w zbożowych gatunkach roślin. Natomiast heterogeniczne białka GLP mają znacznie szerszy zasięg występowania, wśród nich są białka z motywem germin ale bez aktywności OXO, nie posiadające funkcji enzymatycznych [17]. Do tej pory najlepiej opisaną germiną jest jęczmienna Oxox używana w handlu do oznaczania szczawianu w próbkach biologicznych [9]. Natomiast wiele prac badawczych ukazuje rolę GLP w reakcjach obronnych roślin i w odpowiedzi na czynniki stresowe.

ROLA BIAŁEK PODOBNYCH DO GERMIN W REAKCJI OBRONNEJ ROŚLIN I CHARAKTERYSTYKA KODUJĄCYCH JE GENÓW

Analizy sekwencji genomów wielu roślin uprawnych i gatunków modelowych przyczyniły się do poznania organizacji genomowej oraz cech funkcjonalnych specyficznych genów i rodzin genowych, kodujących cechy ważne z punktu widzenia rolniczego. Szczególnie ważnymi genami, które poznano dzięki tym badaniom, są geny zaangażowane w reakcje obronne roślin. Między innymi poznano geny kodujące białka podobne do germin. Jakościowa odporność na patogeny jest warunkowana przez pojedynczy gen odporności *R*, którego produkt rozpoznaje patogeny [6, 28, 48]. Geny kodujące receptory odporności na choroby, takie jak geny *R* i geny receptorów rozpoznających wzór gospodarza (HPRR-host

pattern recognition receptor), produkują takie białka jak: kinazy receptorowe (u ryżu *Xa21* i jęczmienia *Rpg1*) i białka bogate w powtórki leucynowe z miejscem wiązania nukleotydów (NBS-LRR). Białka te mają wysoce zmienne domeny LRR, które posiadają zdolność rozpoznawania patogenów [6, 7, 12]. Oprócz aktywności genów kodujących receptory, na atak patogenu mogą odpowiadać produkty innych genów związanych z obronnością poprzez potranslacyjne modyfikacje białek i zmiany w ich ekspresji [3, 22, 31]. Te ewolucyjnie konserwatywne geny wraz z HPRR stanowią locus QTL odporności na choroby [28]. Działanie obronne GLPs zostało stwierdzone w apopląście, gdzie ulegają one ekspresji i reagują ze ścianą komórkową ułatwiając wczesną odpowiedź na atak patogenu [13]. Po infekcji ich ekspresja w komórce wzrasta i dochodzi do produkcji ROS (ang. *reactive oxygen species*) w formie H_2O_2 w sposób „wybuchowy” [1]. H_2O_2 jest także zaangażowany w sygnalizację komórkową w apopląście. GLP z aktywnością oksydazy szczawianowej odgrywa znaczącą rolę w odporności na choroby, gdyż obniża poziom szczawianu – czynnika wirulencji wytwarzanego przez kilka patogenów grzybowych [24]. Oprócz degradacji szczawianu, dzięki aktywności oksydazy szczawianowej, generowany jest nadtlenek wodoru, który zaangażowany jest w reakcje obronne roślin. H_2O_2 może w tkankach roślin osiągnąć stężenie toksyczne dla bakterii i zwierząt roślinożernych [40], może także przyczynić się do wzmocnienia konstrukcji roślinnych ścian komórkowych, utlenienia lipidów, kwasu salicylowego i syntezy etylenu [34, 43]. Generowany przez OXO nadtlenek wodoru może również działać jako wtórny przekaźnik w aktywacji szlaku biosyntezy fitoaleksyn, odpowiedzi na stres (HR) w systemie nabytej odporności oraz ekspresji genów PR (ang. *pathogen resistance*) w roślinach – w procesach związanych z odpornością na choroby [24]. Aktywność OXO została zlokalizowana w epidermie i pochwie korzenia, nigdy nie była ona związana z regionami merystematycznymi. Wynika to z tego, że oprócz pierwotnie proponowanej funkcji germin w inicjowaniu rozwoju komórek, oksydaza szczawianowa służy również do zapewnienia obecności nadtlenu wodoru, który bierze udział w kowalencyjnym sieciowaniu składników ściany komórkowej. Wykazano, że ekspresja germin w zarodku pszenicznym była zawsze związana z otaczającą go tkanką oraz z różnicowaniem tkanek naczyniowych, co sugeruje rolę w programowanej śmierci komórki. Transkrypcja genu kodującego germinę i aktywność OXO są stymulowane przez infekcje grzybicze oraz niektóre jony metali. Jest ona również regulowana poprzez auksyny i putrescynę. W badaniach nad transgenicznym burakiem cukrowym stwierdzono, że ekspresja *BvGLP-1* wpływa na ekspresję innych białek związanych z odpornością w dwojaki sposób, aktywując ekspresję jednych, a obniżając innych [30]. W genomach zbóż geny kodujące GLP występują w zbiorach. Prowadzone były badania aktywności genów GLP u jęczmienia w odpowiedzi na atak takich patogenów jak *Blumeria graminis f. sp. hordei* i *Magnaporthe oryzae*, jak również *Rhizoctonia solani* u ryżu. U jęczmienia wykazano szeroki zakres ekspresji GLPs. Wyciszono geny

z zastosowaniem RNAi i okazało się, że przejściowe wyciszenie GER3 i GER5 oraz przejściowa nadekspresja GER4 i GER5, zabezpieczały komórki epidermy przed atakiem mączniaka. Natomiast wyciszenie GER4 prowadziło do wysokiej podatności na atak patogenu [6, 21, 48]. Podobne wyniki otrzymano u ryżu [37]. Inne badania nad ekspresją genów w transgenicznej soi [15] oraz wyciszeniem genów w komórkach epidermy z *Nicotiana attenuata* [34], wykazują ekspresję genów kodujących GLP w regionach proksymalnych ściany komórkowej związanych z atakiem patogenów lub miejscem zranienia [6]. Dodatkowo, PsGER1, u grochu wykazuje podobieństwo do sekwencji N-terminalnej receptora roślin adhezyny wykrytej na powierzchni komórek u *Rhizobium* [25]. Takie "rhicadhesin receptor-like GLPs" okazały się być silnie indukowane w korzeniach i kulturach korzeni *Medicago truncatula* skolonizowanych przez mikoryzę arbuskularną (AM). Innym przykładem jest nektaryna I, białko prekursorowe, które znajduje się w miodnikach kwiatów tytoniu, gdzie wykazuje aktywność dysmutazy ponadtlenkowej generującej wysoki poziom nadtlenku wodoru w nektarze, a zatem mogącej wykazywać funkcję obronną. Inne GLPs odgrywają również rolę w różnych interakcjach roślinnych na drobnoustroje. W przeciągu ostatnich kilku lat pojawiły się doniesienia, że GLPs (Cit s1) mandarynki jest odpowiedzialna za reakcje alergiczne u niektórych pacjentów [20]. Dodatkowe funkcje GLPs to aktywność inhibitora proteazy seryny [42], aktywność pirofosfotazy nukleotydów cukru (AGPPase) lub fosfodiesterazy oraz katalizowanie hydrolizy ADP-glukozy do glukozo-1-fosforanu i AMP [41]. Badania genów kodujących GLP wielu roślin (*Brachypodium distachyon*, ryżu, kukurydzy, sorga i pszenicy) wykazały, że występują one w zbiorach, co definiowane jest jako grupa trzech lub większej liczby genów w jednym chromosomie nieoddalonych powyżej 100 tysięcy par zasad [37]. W czterech genomach (*Brachypodium distachyon*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* i *Zea mays*) zidentyfikowano sześć zbiorów, zawierających 56 z 65 genów należących do rodziny GLP [6] i wykazano, że pięć zbiorów jest ulokowanych w ancestralnym segmencie genomu [37]. Wszystkie 65 badanych genów GLP należało do podrodzin GER3 i GER4 [16, 48], a poszczególne geny w zbiorze mogły ulegać wielokrotnej duplikacji. Duplikacja członków podrodziny GER4 w chromosomie 8 ryżu w genach QTL (geny *OsGLP8-1* do *OsGLP8-12*), została potwierdzona badaniami Davidsona i in. (2010) w oparciu o bliskość ich położenia, podobieństwo w sekwencjach nukleotydowych oraz domniemanych sekwencjach regulatorowych. Ekspresja podrodzin GER3 i GER4 warunkowała odporność na mączniaka u pszenicy, jęczmienia i ryżu [11, 37, 48]. Występowanie genów GLPs w zbiorach sugeruje nadmiar białek GLPs. Jest to jedyne możliwe wytłumaczenie dla klasterów genów GLP w genomach zbóż. Uzyskiwanie nowych funkcji poprzez duplikacje genów zostało stwierdzone u ryżu, gdzie zbiór GLPs na 8 chromosomie przyczyniał się w większym stopniu do odporności, niż ich mniejszy zbiór na chromosomie 12, który liczył tylko cztery geny [37].

W ostatnim czasie, na podstawie GLP u jęczmienia, przedstawiono interesujący scenariusz cyklu genu "narodziny i śmierć", będący alternatywą dla

pseudogenizacji do której dochodzi na skutek wielokrotnej duplikacji genu w pojedynczych loci [26]. W myśl tego nowego scenariusza, mutacje w elementach regulatorowych zwiększają poziom transkryptu i wzmacniają funkcjonowanie genu na skutek aktywacji promotora przez czynnik patogeniczny. Także zakonserwowane elementy regulatorowe w obszarze sekwencji promotorowych GLP reagują na czynniki stresowe środowiska i czynniki wzrostu [36]. U kukurydzy w chromosomie 4 synteniczny zbiór genów GLPs zawiera różne QTLs dla odporności na wiele chorób kukurydzy. Podobną sytuację zaobserwowano u ryżu [13, 44, 46].

PODSUMOWANIE

W tej krótkiej charakterystyce białek z rodziny cupin – germin i germino-podobnych, dokonanej na podstawie danych literaturowych wynika, że wspólnym szkieletem tych białek jest obecność domeny β -beczułki – cupiny, wewnątrz której mogą istnieć zróżnicowania nadające odpowiednie właściwości białkom. Analizy porównawcze doprowadziły do zidentyfikowania białek mających różne aktywności: enzymatyczne i nie enzymatyczne, należące do tej rodziny. Białka te odznaczają się niezwykłą termostabilnością i odpornością na proteazy. Pierwsza germina, odkryta w czasie procesu kiełkowania zarodków pszenicy, związana jest z modyfikacją ściany komórkowej i uważana jest za marker kiełkowania. Występuje ona w tej fazie rozwojowej u wszystkich ważnych, z punktu ekonomicznego, zbóż. Wiele badań poświęcono roli germin i GLPs w reakcjach obronnych roślin na choroby i szkodniki, w których wykazano ich znaczący udział. GLPs są glikoproteinami ECM utrzymywanymi w miejscu przez słabe siły jonowe. Większość z nich występuje jako bardzo stabilne oligomery i równie prawdopodobne jest, że większość, jeśli nie wszystkie z nich wiążą jony metali, głównie manganu. Ekspresja genów członków kompleksu rodziny GLP jest ściśle regulowana. Prawdopodobnie, co najmniej jeden z GLPs jest obecny na każdym etapie rozwojowym, we wszystkich organach rośliny. Niektóre z GLPs są również zaangażowane w reakcję na stres. Wydaje się, że GLPs są zazwyczaj zlokalizowane w tkankach powierzchni komórek epidermy i kory subepidermalnej. Germiny i GLPs prawdopodobnie uczestniczą w ważnych aspektach przebudowy ściany komórkowej, którym towarzyszy odpowiedź na rozwój i stres. Pszeniczna germina/Oxox ma również ogromny potencjał dla zastosowań komercyjnych, ze względu na wcześniej wspomnianą niezwykłą odporność na proteazy, wysoką stabilność i odporność na ciepło. Ekspresja germiny pszenicznej w transgenicznym tytoniu [47] i *Pichia pastoris* [38] wykazała przydatności Oxox na dużą skalę produkcji do zastosowań biomedycznych [27].

LITERATURA

- [1] AVERYANOV A. Oxidative burst and plant disease resistance, *Front Biosci (Elite Ed)* 2009; **1**: 142-152
- [2] BANERJEE J, MAITI MK. Functional role of rice germin-like protein1 in regulation of plant height and disease resistance, *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **394**: 178–183
- [3] BENSCHOP J, MOHAMMED S, O'FLAHERTY M, HECK A, SLIJPER M, MENKE F. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. *Mol Cell Proteomics* 2007; **6(7)**: 1198-1214
- [4] BERNA A, BERNIER F. Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, an H₂O₂ producing enzyme. *Plant Mol. Biol.* 1999; **39**: 539-54.
- [5] BERNIER F, BERNA A. Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly?, *Plant Physiol. Biochem* 2001; **39**: 545-55
- [6] BREEN J, BELLGARD M. Germin-like proteins (GLPs) in cereal genomes: gene clustering and dynamics roles in plant defence, *Funct. Integr. Genomics* 2010; **10**: 463-476
- [7] CAPLAN J, PADMANBHAN M, DINESH-KUMAR S. Plant nr-lrr immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host Microbe* 2008; **3(3)**: 126-135
- [8] CARTER C, THOMBUR RW. Germin-Like Proteins: Structure, Phylogeny, and Function, *J Plant Biol* 1999; **42(2)**: 97-108
- [9] CHANDRAN P., THAKUR M., PUNDIR CS. Improved determination of urinary oxalate with alkylamine glass bound barley oxalate oxidase. *J Biotechnol* 2001; **85(1)**: 1511-1519
- [10] CHEN X, WANG ML, HOLBROOK C, CULBREATH A, LIANG X, BRENNEMAN T, GUO B. Identification and characterization of multigene family encoding germin-like proteins in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Plant Mol. Biol Rep* 2010; **29(2)**: 389-403
- [11] CHRISTENSEN AB, THORDAL-CHRISTENSEN H, ZIMMERMANN G, GJETTING T, LYNKJÆR MF, DUDLER R, SCHWEIZER P. The germin like protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is important component of quantitative resistance in wheat and barley, *Mol Plant Microbe Interact Society* 2009; **17 (1)**: 109–117
- [12] CLOUTIER S., MCCALLUM B., LOUTRE C., BANKS T., WICKER T., FEUILLET C., KELLER B., JORDAN M. Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large *psr567* gene family, *Plant Mol Biol* 2007; **65(1-2)**: 93-106
- [13] DAVIDSON RM, REEVES P, MANOSALVA PM, LEACH J. Germins: a diverse protein family important for crop improvement, *Plant. Sci.* 2009; **3(1)**: 43-55,
- [14] DAVIDSON RM, MANOSALVA PM, SNELLING J, BRUCE M, LEUNG H. Rice germin-like proteins: allelic diversity and relationships to early stress responses, *Rice* 2010; 43–55
- [15] DONALDSON P, ANDERSON T, LANE B, DAVIDSON A, SIMMONDS D. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2001; **59(6)**: 297–30
- [16] DRUKA A, KUDRNA D, KANNANGARA CG, VON WETTSTEIN D, KLEINHOF A. Physical and genetic mapping of barley (*Hordeum vulgare*) germin-like cDNAs, *PNAS* 2002; **99**: 850–855
- [17] DUNWELL J, GIBBINGS J, MAHMOOD T, NAQVI SS. Germin and germin-like proteins: evolution, structure and function. *Crit Rev Plant* 2008; **27**: 342-375
- [18] DUNWELL JM, PURVIS A, KHURI S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* 2004; **65**: 7-17
- [19] DUNWELL JM, CULHAM A, CARTER CE, SOSA-AQUIRRE CR, GOODENOUGH PW. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends Biochem Sci* 2001; **26(2)**: 740-746
- [20] EBO DG, AHRAZEM O, LOPEZ-TORREJON G, BRIDTS CH, SALCEDO G, STEVENS WJ. Anaphylaxis from Mandarin (*Citrus reticulata*): Identification of Potential Responsible Allergens, *Int Arch Allergy Immunol* 2007; **144**: 39-43
- [21] EL-SHARKAWY. MILA I, BOUZAYEN M, JAYASANKAR S. Regulation of two germin-like protein genes during plum fruit development, *J Exp Bot* 2010; **61(6)**: 1761-1770
- [22] EULGEM T. Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome, *Trends Plant Sci.* 2005; **10(2)**: 71-77
- [23] FEDERICO ML., INIGUEZ-LUY FL., SKADSEN RW., KAEPLER HF. Spatial and temporal divergence of expression in duplicated barley germin-like protein-encoding genes, *Genetics* 2006; **174(1)**: 179-190

- [24] GAY M, CARRILLO C, GOODWIN PH, LEACH JE, LEUNG H, CASIANA M, CRUZ V. Phylogenomic relationships of rice oxalate oxidases to the cupin superfamily and their association with disease resistance QTL, *Rice* 2009; **2**: 67-69
- [25] GUCCIARDO S, WISNIEWSKI JP, BREWIN NJ, BORNEMANN S. A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor. *J Exp Bot* 2007, **58**: 1161-1171
- [26] HIMMELBACH A., LIU L., ZIEROLD U., ALTSCHMIED L., MAYCHER H., BEIER F., MÜLLER D, HENSEL G, HEISE A, SCHÜTZENDÜBEL A, KUMLEHN J, SCHWEIZER P. Promoters of the barley germin-like ger4 gene cluster enable strong transgene expression in response to pathogen attack, *The Plant Cell* 2010; **22**: 937-952
- [27] HOODA V. Physiochemical, Functional and Structural Characterization of Wheat Germin Using In silico Methods, *J Bioll Sci* 2011; **3(1)**: 35-41,
- [28] JONES J, DANGL J. The plant immune system, *Nature* 2006; **444(7177)**: 323-329
- [29] KHURI S, BAKER FT, DUNWELL JM. Phylogeny, Function and evolution of the cupins a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. *Mol. Biol. Evol.*, 2001; **18(4)**: 593-605.
- [30] KNECHT K, SEYFFARTH M, DESEL CH, THURAU T, SHERAMETI I, LOU B, OELMÜLLER R, CAI D. Expression of *BvGLP-1* encoding a germin-like protein from sugar beet in *Arabidopsis thaliana* leads to resistance against phytopathogenic fungi, *Mol Plant Microbe Interact* 2010; **4**: 446-457
- [31] KOU Y, WANG S. Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance, *Curr Opin Plant Biol* 2010, **13(2)**: 181-185
- [32] LANE BG. Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos, *Faseb J* 1991; **5(14)**: 2893-2901
- [33] LANE BG. Oxalate, Germins, and Higher-Plant Pathogens, *IUBMB Life* 2002; **53**: 67-75
- [34] LOU Y, BALDWIN I T. Silencing of a Germin-Like Gene in *Nicotiana attenuata* Improves Performance of Native Herbivores, *Plant Physiology* 2006; **140**: 1126-1136
- [35] LU M., HAN Y-P., GAO J-G., WANG X-J., LI W-B. Identification and analysis of the germin-like gene family in soybean, *BMC Genomics* 2010; **11**: 620
- [36] MAHMOOD T, NAZAR N, ABBASI B. Comparative analysis of regulatory elements in different germin-like protein gene promoters. *Afr.J. Biotechnol* 2010; **9(13)**: 1871-1881
- [37] MANOSALVA P, DAVIDSON R, LIU B, ZHU X, HULBERT S, LEUNG H, LEACH J.. A germin-like protein gene family functions as a complex qtl conferring broad-spectrum disease resistance in rice. *Plant Physiol* 2008; **149(1)**: 286-296
- [38] PAN H-Y, WHITTAKER MN, BOUVERETB R, BERNAB A, BERNIERB F, WHITTAKER JW. Characterization of wheat germin (oxalate oxidase) expressed by *Pichia pastoris*, *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; **356(4)**: 925-929.
- [39] PARK CH-J, AN J-M, SHIN Y-CH, KIM K-J, LEE B-J, PAEK K-H. Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection, *Planta* 2004; **219**: 797-806
- [40] RAMPUTH A I, ARNASON JT, CASS LJ, SIMMONDS A. Reduced herbivory of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) on corn transformed with germin, a wheat oxalate oxidase gene. *Plant Science* 2002; **162(3)**: 431-440
- [41] RODRIGUEZ-LÓPEZ M, BAROJA-FERNÁNDEZ E, ZANDUETA-CRIADO A, MORENO-BRUNA B, MUÑOZ FJ, AKAZAWA T, POZUETA-ROMERO J. Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) are distinct oligomers of HvGLP1, a germin like protein, *FEBS Letters* 2001; **490**: 44-48
- [42] SEGARA C, CLAUDIA A, PINEDO ML, RONCHI V, CONDE RD. A germin-like protein of wheat leaf apoplast inhibits serine proteases, *J Exp Bot* 2003; **54(386)**: 1335-1341,
- [43] VAN BREUSEGEM F, VRANOVA E, DAT JF, INZE D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* 2001; **161**: 405-414
- [44] WISSER R, BALINT-KURTI P, NELSON R. The genetic architecture of disease resistance in maize: A synthesis of published studies, *Phytopathology* 2006; **96(2)**: 120-129
- [45] WOO E-J, DUNWELL JM, GOODENOUGH PW, MARVIER AC, PICKERSGILL RW. Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. *Nature America, nature structural biology* 2000; **7(11)**: 1036-1040

- [46] WU J-L, SINHA PK, VARIAR M, ZHENG K-L, LEACH JE, COURTOIS B, LEUNG H. Association between molecular markers and blast resistance in an advanced backcross population of rice. *Theor Appl Genet* 2004; **108(6)**:1024–1032
- [47] YIHONG H., ZHENFEI G. Purification and characterization of oxalate oxidase from wheat seedlings, *Acta Physiol Plant* 2009; **31**:229–235
- [48] ZIMMERMANN G, BÄUMLEIN H, MOCK HP, HIMMELBACH A, SCHWEIZER P. The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in basil host resistance. *Plant Physiology* 2006; **42**:181-192

Redaktor prowadzący – A.K. Kononowicz

Otrzymano: 22.10.2011

Przyjęto: 12.04.2012

Izabela Szućko

Katedra Biologii Komórki, Wydział Nauk Przyrodniczych

Uniwersytet Szczeciński

ul. Wąska 13, 71-415 Szczecin

tel.: 91 444 16 41

e-mail: izabela.szucko@univ.szczecin.pl