Molekularni mehanizmi ekspresije i uloga biljnih PR proteina

Grgurević, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:140093

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Marija Grgurević

Molekularni mehanizmi ekspresije i uloga biljnih PR proteina

Završni rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

MOLEKULARNI MEHANIZMI EKSPRESIJE I ULOGA BILJNIH PR PROTEINA

Marija Grgurević

Rad je izrađen na: Zavod za biokemiju i ekofiziologiju voda

Mentor: dr. sc. Rosemary Vuković, doc.

Kratak sažetak rada: Razumijevanje načina kojima se biljke brane od raznih patogena esencijalan je korak u razumijevanju ne samo biljnih mehanizama, nego i razvoju gospodarski značajnih, visoko otpornih biljnih vrsta za koje se smatra da su imperativ u budućnosti. Navedeni razlozi, u znanosti potiču pokušaje što bržeg shvaćanja interakcija između biljaka i patogena kako bi se stečeno znanje moglo primijeniti na agrikulturalnu proizvodnju. Središnju ulogu mnogih istraživanja čine upravo s patogenezom povezani proteini koji nastaju kao posljedica hipersenzitivnog odgovora biljke te u konačnici dovodi do stvaranja sustavno stečene otpornosti. Takve koordinirane reakcije sprječavaju napredovanje patogena i smanjuju mogućnost ponovnih infekcija biljke u budućnosti

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: hipersenzitivni odgovor (HR), sustavno stečena otpornost (SAR), salicilna kiselina (SA), inducirana sustavna otpornost (ISR), PR proteini

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelor thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Biology

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

MOLECULAR MECHANISMS OF EXPRESSION AND ROLE OF PLANT PR PROTEINS

Marija Grgurević

Thesis performed at: Subdepartment of plant ecophysiology and biochemistry

Supervisor: Rosemary Vuković, PhD, Asst. Prof.

Short abstract: Knowing how plants defend themselves from pathogens is essential for understanding not just their mechanisms, but also development of agricultural highly resistant plants which are considered to be a burning question in future. Therefore, the scientists are giving effort to understand interactions between plants and pathogens in order to apply these principals on agriculture. The main part of these researches are pathogenesis related proteins, which are produced after hipersensitive response (HR) of a plant and as final answer they lead to systemic acquired resistance (SAR). As a result of many coordinated metabolic changes, plants are enabled to resist further pathogen attacs.

Original in: Croatian

Key words: Hipersensitive response (HR), systemic acquired resistance (SAR), salicylic acid (SA), induced systemic resistance (ISR), PR proteins

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository oft he National and University Library in Zagreb.

Sadržaj

1. UVOD…….. 5
2. BILJNI PATOGENI…….. 6
3. INDUCIRANA OTPORNOST ……..... 7
3.1. INDUCIRANA SUSTAVNA OTPORNOST ……...…… 8
3.2. HIPERSENZITIVNI ODGOVOR ……..……..... 8
3.3. SUSTAVNO STEČENA OTPORNOST …….…… 9
4. PR PROTEINI ……..... 10
4.1. INDUKCIJA I SVOJSTVA …… 10
4.2. KLASIFIKACIJA ……... 11
4.2.1. PR – 1 PROTEINI …… 12
4.2.2. PR – 2 PROTEINI …… 12
4.2.3. PR – 3, 4, 8 i 11 PROTEINI ……..... 13
4.2.4. PR – 5 PROTEINI …… 13
4.3. EKSPRESIJA ……..... 14
5. ZAKLJUČAK ……... 17
6. LITERATURA …….. 18

1. UVOD

Rastuća ljudska populacija između ostaloga zahtjeva i sve veću proizvodnju biljaka kao jednog od glavnih izvora hrane. Brojnost ljudske vrste se više nego udvostručila u posljednjih pedeset godina, a predviđa se kako će taj broj do 2050. godine premašiti 9 milijardi. S tim na umu, kao glavno međunarodno političko pitanje nameće se globalna sigurnost opskrbe hranom. Na stranu danas gorućih problema u distribuciji hrane poput siromaštva i ekonomske nestabilnosti, kao problem bliske budućnosti smatra se potreba povećanja sustavne agrikulturalne proizvodnje, posebice žitarica poput riže, pšenice i kukuruza. Iako se to čini jednostavnim, sama proizvodnja nailazi na brojne poteškoće i izazove s obzirom da promjene klimatskih uvjeta i okolišnih čimbenika koji sa sobom nose i pojavu novih sojeva patogena. Oni su najčešće otporniji te ranije učinkoviti obrambeni odgovori biljaka postaju neadekvatni prilikom infekcije genetički poboljšanim patogenom. Primjerice, 1999. godine se na području istočne Afrike pojavio novi soj crne žitne hrđe (*Puccinia graminis*), gljivice koja uzrokuje bolesti na pšenici, ali i na drugim biljkama iz porodice trava. Uzrokovala je velike štete na gospodarskim usjevima bez problema zaobilazeći obrambene odgovore pšenice. Nedugo zatim, 2000. godine, u SAD – u se pojavio još agresivniji soj žute žitne hrđe (*Puccinia striiformis*) koji se brzo proširio po srednjoj Americi. Navedeni razlozi u svijetu znanosti potiču pokušavanje što bržeg shvaćanja interakcija između biljaka i patogena kako bi se stečeno znanje moglo primijeniti na agrikulturalnu proizvodnju (Boyd 2013). Osim za prehranu, biljke se primjenjuju u brojnim drugim poljima kao što su medicina, farmacija, proizvodnja kozmetike i građevinska industrija. One se brane od napada patogena aktivirajući niz obrambenih odgovora nakon infekcije. Osiguravajući da su aktivirani potrebnom brzinom, ovi odgovori biljaka su generalno visoko učinkoviti u sprečavanju širenja patogena. S obzirom na uspješnost, znanstvenici pokazuju veliki interes kako bi razumjeli signalne puteve koji kontroliraju aktivaciju obrambenih odgovora kod biljaka (Glazebrook 2001). Dio takve inducirane obrane su i s patogenezom povezani (PR, od engl. *Pathogenesis-Related*) proteini. Izazvani infekcijom, neki djeluju antifungalno i antibakterijski napadajući molekule u staničnoj stjenci nametnika, dok drugi djeluju kao signalne molekule koje šire vijest da je infekcija u blizini. Infekcija također uzrokuje unakrsno povezivanje molekula u stanični zid i taloženje lignina, što dovodi do stvaranja lokalnih barijera koje usporavaju širenje patogena do drugih dijelova biljke. Nadalje, PR proteinima se smatraju svi oni proteini koji su nanovo sintetizirani infekcijom, ne nužno u patološkom stanju. Termin se koristi za one proteine koji

nisu toliko detektirani u zdravim tkivima, nego im je akumulacija zabilježena tijekom patoloških stanja izazvanih kombinacijom dva, pa čak i više biljnih patogena. Pojam patološko stanje u ovom slučaju se koristi kako bi se ukazalo na direktan patološki napad od strane različitih izvora, uključujući gljive, bakterije, viruse, insekte i herbivore. Ulaskom patogena u biljku, njegovo štetno djelovanje se smanjuje kao rezultat obrambenog odgovora biljke. Najučinkovitiji je hipersenzitivni odgovor (HR, od engl. *Hypersensitive Response*), tijekom kojeg u stanicama oko mjesta infekcije dolazi do nekroze. Takvom odgovoru prethodi niz koordiniranih metaboličkih promjena koje su temelj stvaranja otpornosti na patogene i smanjenja mogućnosti budućih infekcija. Dio tog stanja su i PR proteini. Oni se ne nakupljaju samo lokalno, na zaraženim listovima, nego se smatra da su povezani s razvojem sustavno stečene otpornosti (SAR, od engl. *Systemic Acquired Re*sistance) prema budućim infekcijama gljivica, bakterija i virusa (Van Loon i Van Strien 1999).

2. BILJNI PATOGENI

Biljku smatramo bolesnom kada dolazi do poremećaja njezinih biogenih procesa pod utjecajem biotičkih ili abiotičkih čimbenika, a oni se očituju u obliku anatomsko – morfoloških ili fiziološko – biokemijskih promjena. Dok u abiotičke čimbenike svrstavamo temperaturu ili pH čija promjena uzrokuje navedene reakcije biljke, češće su istraživani biotički čimbenici čiji mehanizam interakcije s biljkama i dalje nije potpuno razjašnjen. Najčešće su to gljivice, bakterije, virusi, nematode ili herbivori. Uz njihovo štetno djelovanje na gospodarske usjeve, tretiranje istih pesticidima također dovodi do smanjenja kvalitete prinosa i razvoja globalnog zagađenja okoliša. Odnos između patogena i biljke može se opisati kao antagonistički ili kompeticijski, prilikom kojega jedan od organizama ili čak oba imaju negativan ishod. Borba za nutrijente rezultira smanjenjem rasta, aktivnosti ili plodnosti organizma (Pal 2006). Nadalje, nametnici uzrokuju bolesti na biljkama otpuštajući razne enzime, toksine, regulatore rasta i druge aktivne supstance ometajući strukturni integritet i metabolizam biljnih stanica i tkiva. Hranjive tvari zatim koriste za vlastiti rast, umnažanje i širenje na druge jedinke. Neki također uzrokuju bolesti tako što se umnažaju i rastu unutar ksilema ili floema biljke, blokirajući tako protok vode i minerala u gornje dijelove biljke, a šećera prema donjim dijelovima biljke. Većinu biljnih patogena čine gljivice, uzrokuju približno 70% svih biljnih bolesti. Njih više od 10 000 vrsta od poznatih 70 000 uzrokuje zaraze na biljkama. Pojedine gljivice su obligatni paraziti (biotrofi), a ostali se svrstavaju u

skupinu neobligatnih parazita koji se mogu umnažati i rasti na uginuloj materiji (nekrotrofi) jednako kao i na živoj, ili živog domadara zahtijevaju samo za dio svog životnog ciklusa. Uspješna infekcija patogenima također ovisi i o interakciji odgovarajućih gena prisutnih u biljci i patogenu. Neki patogeni mogu zaraziti sve ili gotovo sve biljke neke vrste, roda ili nekoliko biljnih porodica, dok postoje i oni patogeni koji mogu inficirati samo jednu biljnu vrstu. Nakon gljivica, drugi najčešći uzročnik biljnih bolesti su virusi i viroidi, njih više od 2000. Iako su znatno manji i građom jednostavniji od ostalih patogena, češće uzrokuju niz simptoma na biljkama koje inficiraju. S obzirom na njihovu veličinu, u vrijeme otkrića prvih virusnih bolesti nije ih bilo moguće detektirati prema strukturi, nego prema unutarnjim amorfnim ili kristalnim inkluzijama koje stvaraju unutar citoplazme jezgre pojedinih stanica. Te inkluzije su karakteristične za pojedine rodove virusa i danas se također koriste u detekciji i identifikaciji virusa (Agrios 2009).

3. INDUCIRANA OTPORNOST

Biljke su, kao i ljudi, konstantno okružene raznim mikroorganizmima te su morale razviti mehanizme kojima bi se od njih prema potrebi branili. Tijekom evolucijskog razvoja one su prilagođavale mehanizme koji ostaju inaktivirani ili utišani sve dok ne dođe do njihove aktivacije tijekom izlaganja ili kontakta s inducirajućim agensima. Jasmonska kiselina (JA od engl. *jasmonic acid*) je biljni hormon koji nastaje kao produkt oktadekanoidnog puta, jednog od najbolje poznatih mehanizama u obrani biljke tijekom razdoblja stresa. .)JA predstavlja signalnu molekulu čija prisutnost u biljci označava nepovoljno stanje i dovodi do stvaranja inducirane sustavne otpornosti (ISR, od engl. *induced systemic resistance*). S druge strane, prilikom infekcija patogenom dolazi do dramatičnih promjena u aktivnosti stanica u blizini ulaska patogena u biljku. Taj tip inducirane otpornosti naziva se hipersenzitivni odgovor (HR, od engl. *hypersensitive response*) te unatoč tome što je i taj mehanizam obrane poznat dulji niz godina, nije jasno je li on posljedica signalnih mehanizama koji dovode do suzbijanja djelovanja patogena i ima li stanična smrt direktnu ulogu u stvaranju otpornosti. Iako detaljniji mehanizmi i povezanost nisu jasni, zna se da HR prethodi indukciji PR proteina te u konačnici stvaranja sustavno stečene otpornosti (SAR, od engl. *systemic acquired resistance*) (Oliveira i sur. 2016). Pri tome, SAR označava poboljšanu mogućnost obrambenog odgovora biljke protiv mnogih, ali ne svih patogena koja je uzrokovana stvaranjem lokalnog nekrotičnog tkiva od strane istog (Maleck 1999).

3.1. INDUCIRANA SUSTAVNA OTPORNOST

Za razliku od SAR-a koji je povezan s akumulacijom salicilne kiseline i sinteze PR proteina, ISR ovisi etilenu i jasmonskoj kiselini i ne dovodi do sinteze PR proteina. Do pojave ovog oblika otpornosti također mogu dovesti nepatogene rizosferne bakterije. Ipak, ova dva oblika otpornosti podudaraju se na molekularnoj razini, što je pokazano na primjeru talijinog uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) gdje su obje otpornosti uvjetovane prisutnošću regulatornog proteinaNPR1, čiju ekspresiju potiče povećana koncentracija salicilne kiseline (Van Loon 1997). ISR je fenotipski sličan SAR-u, jer se također ispoljava nespecifično prema taksonomski različitim patogenima (Van Loon 1997). Dok se SAR može razviti u velikom broju dikotiledonih i monokotiledonih biljaka, ISR je ograničena na nekoliko biljnih porodica. Također je zanimljivo da ISR nije zabilježena kod monokotiledonih biljaka (Pieterse i sur. 1998). Nadalje, do pojave ISR dolazi samo kada populacija bakterija pređe određeni prag koncentracije, koja na primjer u slučaju bakterije *Pseudomonas fluorescens* sojeva WCS375 i WCS417 iznosi 105 CFU/g korijena. Pri nižim koncentracijama ne dolazi do pojave ISR-a. Nasuprot SAR-u, čije je djelovanje vidljivo prema stvaranju nekrotičnog tkiva, rizosferne bakterije ne izazivaju vidljive simptome na biljkama u čijem okruženju žive (Kloepper i sur. 1980).

3. 2. HIPERSENZITIVNI ODGOVOR

HR induciran na napad patogena smatra se izrazito jakim odgovorom u biljci. Uzrokovan je fenomenom gen-za-gen komplementarnosti između biljke i patogena. U prisutnosti odgovarajućeg dominantnog alela za virulenciju patogena i biljnog gena za obranu od infekcije, nastupa prepoznavanje i biljka odgovara na infekciju HR-om. Formiraju se nekrotične lezije oko početnog mjesta ulaska, odnosno penetracije patogena. Kao rezultat, patogen je ograničen na zonu stanica okruženih nekrotičnim lezijama, zbog izrazito jakog obrambenog odgovora induciranom u tom krugu stanica. U slučaju HR-a duhana na virus mozaične bolesti duhana (TMV), područja odgovora mogu se lako detektirati UV svjetlošću. Nekrotične lezije akumuliraju derivate fenil-propanoida, od kojih su neki fluorescentni te omogućavaju otkrivanje obrambenih stanica. Druge komponente s manjom molekulskom masom također se dobro akumuliraju u ovim stanicama. One imaju antimikrobno djelovanje i nazivaju se fitoaleksinima. No, također dolazi i do brojnih promjena unutar same stanice.

Na primjer, stanični zid se ojačava premještanjem brojnih makromolekula kao što su ugljikohidrati (kaloza), proteini i hidroksiprolinom bogati glikoproteini, aromatični polimeri poput lignina, ligninu sličnih komponenti, te brojnih još nedefiniranih fenolnih komponenti. Još jedna važna promjena, detektirana u fluorescentnim stanicama, jest pojava PR proteina koji nakon nekoliko dana od inokulacije mogu činiti i do 10% sadržaja lista u proteinima. Neki od ovih proteina se javljaju samo lokalno, na području infekcije, dok se neki mogu detektirati i u neinficiranim dijelovima biljke. Nakon HR-a, koja je izrazito snažan odgovor biljke na infekciju, slijedi SAR kao sustavni obrambeni odgovor biljke (Stintzi 1993).

3. 3. SUSTAVNO STEČENA OTPORNOST

PR proteini prvi puta su detektirani 1970-ih godina u listovima duhana (*Nicotiana tabacum*) uzrokujući HR na TMV (Van Loon i sur. 1999). To je biološki sustav po kojem mnoštvo znanstvenika i danas radi te prema kojemu su otkriveni i okarakterizirani brojni novi PR proteini (Stintzi 1993). A. F. Ross je izučavao otpornost na biljci zaraženoj spomenutim virusom, te je tada prvi put upotrijebio izraz „sustavno stečene otpornosti“ kako bi opisao induciranu otpornost otkrivenu u distalnim, netretiranim listovima duhana (Ross 1961). SAR predstavlja poboljšanu otpornost koju biljka pokazuje prema većini, ali ne i prema svim patogenima. Pokrenuta je lokalnim nekrozama uzrokovanim prisutnošću patogena, odnosno HR-om koji je rezultat kompatibilne reakcije i prepoznavanja patogena od strane biljke. Već nakon nekoliko sati od stvaranja lokalnog nekrotičnog tkiva, biljka počinje eksprimirati PR proteine lokalno, na mjestu infekcije, i sustavno kroz cijelu biljku. Proteini uključeni u SAR imaju antimikrobno djelovanje, no nije svima jasna točna funkcija. Pojava SAR-a u neinficiranim dijelovima biljke povezuje se s povećanom sposobnošću odgovora na izvor zaraze. Nadalje, u mnogim biljkama kao što su duhan i uročnjak, ključnu ulogu u stvaranju SAR-a ima koncentracija salicilne kiseline (Maleck 1999). Iako je ovaj „sustavni“ odgovor slabiji od lokalnog, on i dalje predstavlja snažnu obrambenu reakciju prilikom odgovora cijele biljke. Ako je dio biljke već reagirao hipersenzitivno na patogena, nezaraženi dijelovi te biljke razvijaju stanje povećane otpornosti koje je vidljivo po razvitku manjih lezija i boljeg odgovora na infekciju, inokulira li se isti ili neki drugi nepovezani patogen koji uzrokuje nekroze. Sama indukcija PR proteina odvija se paralelno s pojavom SAR-a. Oni također predstavljaju zanimljiv i osjetljiv marker za istraživanje signala koji se kreću od primarnih nekrotičnih dijelova biljke do udaljenih dijelova gdje su istodobno inducirani SAR i PR proteini (Stintzi 1993).

4. PR PROTEINI

4.1. INDUKCIJA I SVOJSTVA

Od otkrića prvih PR proteina u duhanu, mnogi su drugi proteini sa sličnim fizikalno kemijskim svojstvima bili izolirani kako iz duhana tako i iz drugih biljnih vrsta, uključujući i jednosupnice i dvosupnice. PR proteini se stvaraju tijekom odgovora biljaka na infekciju virusima, viroidima, bakterijama ili gljivama. Članovi su različitih porodica PR proteina, inducirani tijekom tretiranja kemikalijama kao što su poliakrilna kiselina, derivati aminokiselina, soli teških metala, acetil salicilna i salicilna kiselina (SA) i zagađivači zraka. Uz to, neki su inducirani i djelovanjem fitohormona, osmotskog stresa i povećane razine soli. Fitohormon etilen se, kao stresni hormon, također smatra induktivnim čimbenikom za stvaranje PR proteina. Osim toga, pokazalo se da su PR proteini prisutni i u zdravom biljnom tkivu, u većim količinama u korijenu i starijim listovima, te tijekom cvjetanja biljke. S obzirom na to da su PR proteini također inducirani brojnim drugim čimbenicima, često se postavlja pitanje je li naziv „s patogenezom povezani“ proteini uistinu prikladan. No, budući da je najveći raspon spomenutih proteina induciran patogenima, naziv je ipak zadržan. Tijekom nekrotične infekcije, metabolički odgovor biljke uključuje izlučivanje etilena i abscisinske kiseline, sintezu i migraciju salicilne kiseline kao pobuđivača PR proteina, te promjene u balansu između auksina i citokinina. Stoga, ne začuđuje kako se tijekom obrambenog odgovora inducira širok spektar PR proteina.

PR proteine karakteriziraju specifična fizikalno-kemijska svojstva, čije poznavanje pomaže tijekom izolacije i prepoznavanja pojedinog proteina:

1. Ostaju stabilni i pri vrlo niskom pH
2. Relativno su otporni na djelovanje proteolitičkih enzima
3. Monomeri su, uz nekoliko izuzetaka, vrlo male molekularne mase (8-50 kDa)
4. Lokalizirani su u dijelovima stanice poput vakuole, stanične stjenke i apoplasta

Vidljiva je povezanost pojedinih osobina, odnosno stabilnost pri niskoj vrijednosti pH i otpornost prema djelovanju proteolitičkih enzima omogućava im opstanak u negostoljubivim dijelovima stanice u kojima prevladavaju (Stintzi 1993).

4.2. KLASIFIKACIJA

PR proteini su podijeljeni u devetnaest porodica, ovisno o strukturnoj kompatibilnosti, načinu djelovanja tijekom obrambenog odgovora ili brzini kretanja kroz u poliakrilamidnom gelu tijekom elektroforeze (Tablica 1). Također, prilikom svrstavanja proteina u podgrupe, kao važan parametar razvrstavanja PR proteina uzima se njihova izoelektrična točka. Sedamnaest porodica je poredano kako su i otkrivene, pri čemu se kao prvi član porodice najčešće se uzima onaj protein koji je najzastupljeniji, a ostali se nižu prema morfološkoj podudarnosti (Sudisha i sur. 2012).

Tablica 1. Ostale porodice PR proteina, njihova obrambena svojstva i simboli gena (Preuzeto i modificirano iz Van Loon 2006).

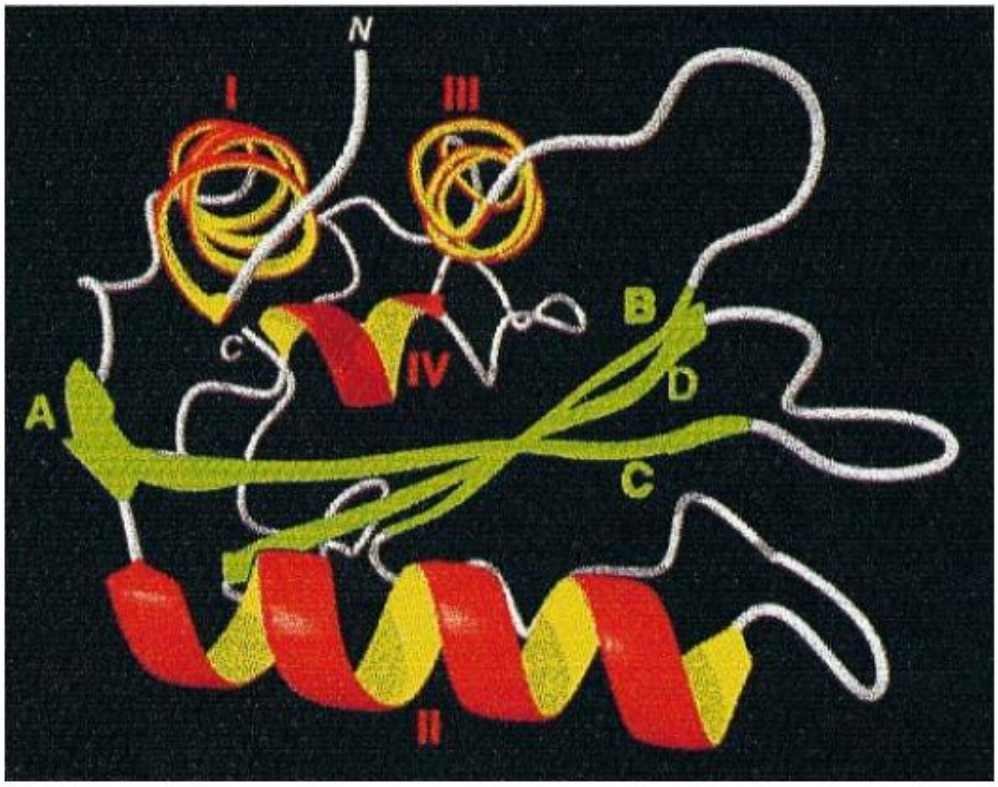
PORODICA	SVOJSTVA	SIMBOL GENA
PR – 1	Nepoznato	*Ypr1*
PR – 2	β-1,3-glukanaze	*Ypr2, [Gns2 ('Glb')]*
PR – 3	Hitinaze	*Ypr3, Chia*
PR – 4	Hitinaze	*Ypr4, Chid*
PR – 5	Taumatinima slični	*Ypr5*
PR – 6	Inhibitori proteinaza	*Ypr6, Pis ('Pin')*
PR – 7	Endoproteinaze	*Ypr7*
PR – 8	Hitinaze	*Ypr8, Chib*
PR – 9	Peroksidaze	*Ypr9, Prx*
PR – 10	Ribonukleazama slični	*Ypr10*
PR – 11	Hitinaze	*Ypr11, Chic*
PR – 12	Obrana	*Ypr12*
PR - 13	Tionin	*Ypr13, Thi*
PR – 14	Lipid - transferni	*Ypr14, Ltp*
PR – 15	Oksalat oksidaze	*Ypr15*
PR – 16	Oksalat oksidazama slični	*Ypr16*
PR 17	Nepoznato	*Ypr17*

4.2.1. PR-1 PROTEINI

PR-1 je porodica strogo konzerviranih proteina koji se pojavljuju u svim biljnim vrstama, međutim njihovo je djelovanje najmanje poznato. Svi proteini te porodice dijele vrlo sličnu strukturu, čija je podudarnost od 35 do više od 90%. Morfološki gledano, imaju četiri α-heliksa i četiri β-lanca te dijele jednak broj izrazito konzerviranih ostataka, od kojih je šest cisteinskih (Slika 1) (Van Loon 2006). Topljivi su u kiselim puferima i izrazito su male molekulske mase (14 – 16 kDa), a raspoređeni su u dva razreda, kiseli i bazični, ovisno o njihovoj izoelektričnoj točki. Do sada je identificirano 16 PR-1 proteina, među kojima su i tri kisela (1a, 1b, 1c) i jedan bazični (1g) protein različitih svojstava, ranije otkriveni prilikom infekcije duhana TMV-om. S druge strane, homolozi kiselih 1a, 1b i 1c proteina u rajčici su bazični, što ukazuje da strukturno slični proteini iste porodice mogu imati različita svojstva i uloge. Smatra se da imaju antifungalno djelovanje, međutim molekularni mehanizam još uvijek nije potpuno jasan (Sudisha i sur. 2012). Proučavanje proteina u drugim organizmima otkrilo je proteine homologne PR-1 porodici te bi njihovi mehanizmi djelovanja mogli ujedno rasvijetliti i djelovanje ove biljne porodice proteina. Jedan takav je kod sisavaca cisteinom bogat CRISP protein (Kitajima i Sato 1999).

4.2.2. PR-2 PROTEINI

PR-2 je porodica proteina poznata po svojoj β-1,3 glukanaznoj aktivnosti. Oni kataliziraju hidrolitičko cijepanje 1,3 β-D-glukozidnih lanaca u β-1,3 glukane. Kao i ostali PR proteini, uglavnom su monomeri molekulske mase 25-35 kDa. Široko su rasprostranjeni u biljnim vrstama, a povezuju se sa stvaranjem kaloze, te dlaka na listovima i stabljikama. Najčešće su lokalizirani u epidermi prizemnih listova i korijenu biljke. β-1,3 glukanaze su prisutne kao izoformni oblici koji se razlikuju u veličini, izoelektričnoj točki, primarnoj strukturi i obliku regulacije. Pronađeni su u rajčici, žitu, ječmu, prosu, slanutku, kukuruzu i riži. Podijeljeni su u četiri razreda na osnovi razlika u aminokiselinskim sljedovima (Sudisha i sur. 2012). Iako ovi proteini mogu razarati komponente stanične stijenke patogena, njihova povezanost je dokazana samo kod malog broja članova (Elmorsi 2015).



Slika 1. Trodimenzionalni prikaz građe proteina PR-1b rajčice. α - heliksi su brojevima I do IV prikazani crvenom i žutom bojom, a četiri β-lanca su slovima A do D označeni zelenom bojom. Ostale polipeptidne sekvence označene su slovima N i C te sivom bojom. Preuzeto iz Van Loon 1999.

4.2.3. PR – 3, 4, 8 i 11 PROTEINI

Ova porodica pripada hitinazama, koje kao i glukanaze liziraju stjenku patogena. One hidroliziraju β-1,4 veze između N-acetilglukozaminskih ostataka hitina. Iz tog razloga se još nazivaju i endo β-1,4 glukozaminidazama. Razredi ovih porodica odijeljeni su prema strukturnoj sličnosti i prisutnosti ili odsutnosti hitin vezujuće domene (CBD). CBD je α-heliks koji sadrži katalitičku domenu s dva glutamata (Sudisha i sur. 2012).

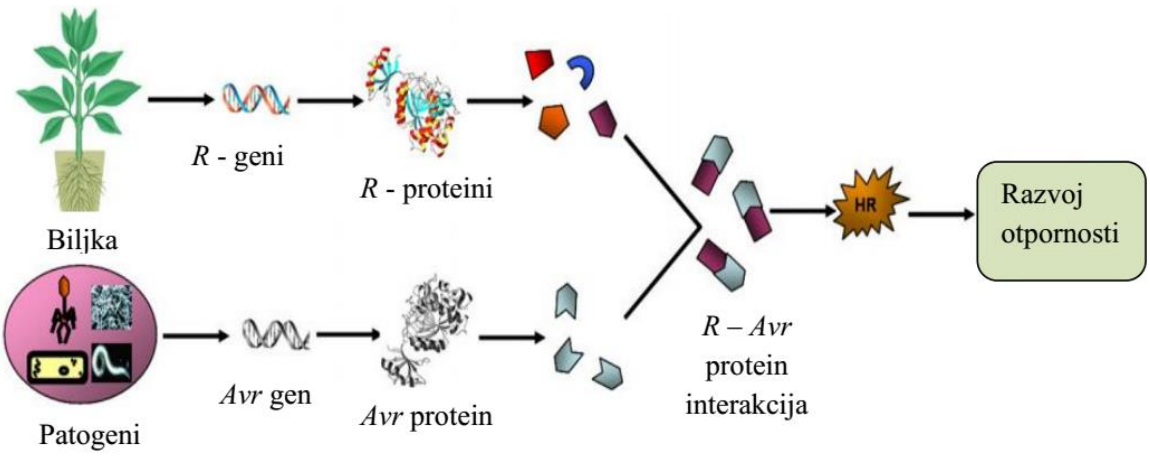
4.2.4. PR – 5 PROTEINI

Ovi proteini se nazivaju još i taumatinu sličnim proteinima jer su njihovi aminokiselinski sljedovi visoke sličnosti onima kod taumatina, proteina izoliranog iz vrste katemfa (*Thaumatococcus danielli*). Ovoj porodici se priključuje i osmotin, bazični protein

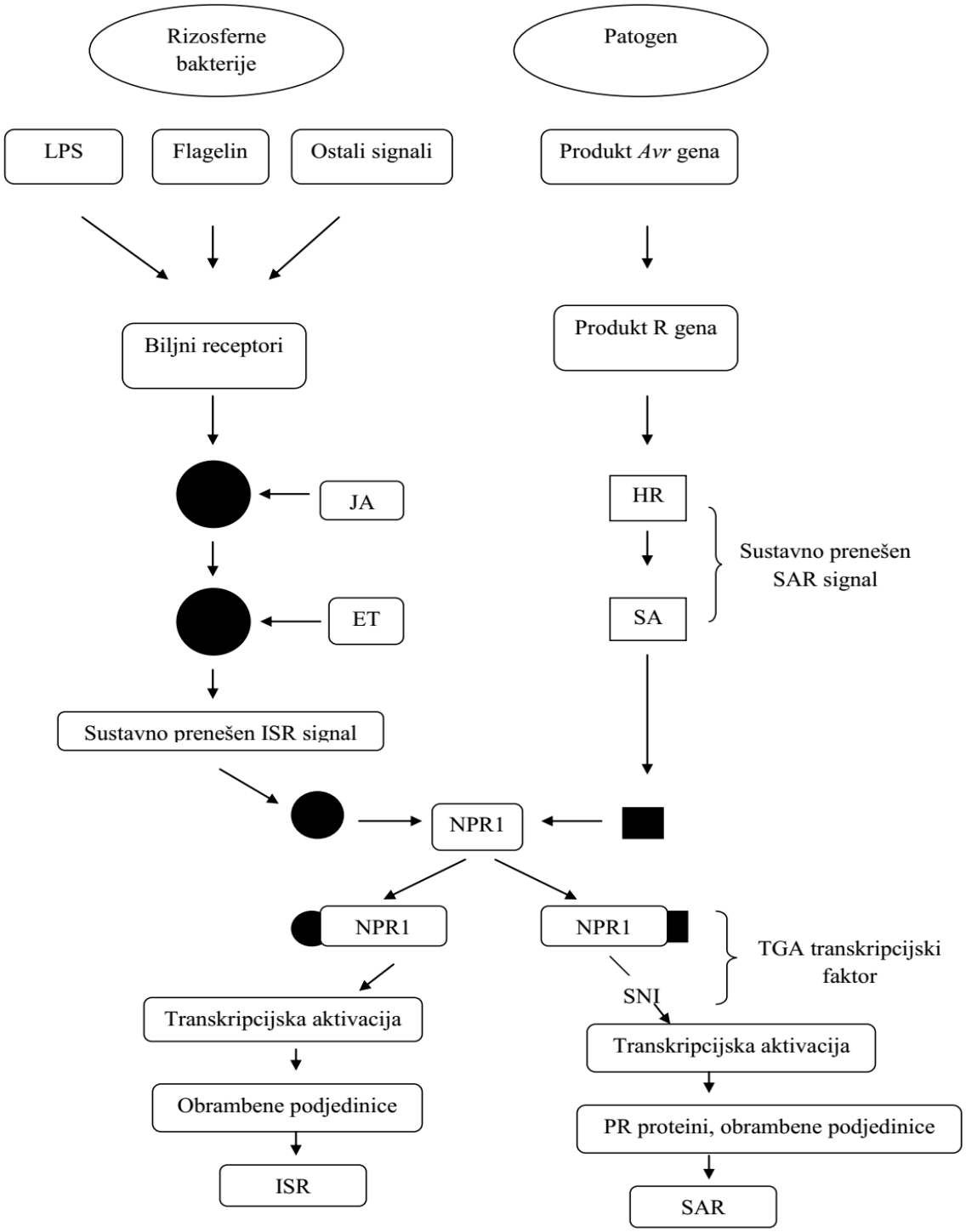
do čije ekspresije dolazi prilikom tretiranja biljke etilenom (Kitajama i Sato 1998). Detektirani su uglavnom u mladim listovima biljaka

4.3. EKSPRESIJA

Fitopatogeni proizvode molekule, takozvane efektore, koje kodiraju avirulentni geni *Avr*. Oni se izlučuju u stanice biljke već u početnim stadijima kolonizacije. Prepoznavanje prisutnosti tih proteina u biljci regulirano je prisutnošću gena *R* povezanih s otpornosti biljaka na patogene. Interakcijom poteina R i Avr i prepoznavanjem dolazi do HR-a u biljci (Slika 2) (Gururani 2012). Povećanje broja patogena unutar biljke rezultira proizvodnjom reaktivnih kisikovih tvari (ROS), SA, etilena i jasmonata. SA ima važnu ulogu u reakciji odgovora biljaka na patogene, aktivirajući obrambene odgovore. Metil salicilat, ester salicilne kiseline, mobilni je signal koji putem floema dolazi do sekundarnih tkiva u biljci gdje se veže za salicilat-vezujući-protein 2 (SABP2) koji ga prevodi u salicilat. Povećanje koncentracije salicilata biljci signalizira stanje stresa povećanjem ROS-a i reaktivnih dušikovih tvari unutar stanice, mijenjajući njezino redoks stanje. Salicilati u konačnici dovode do redukcije proteina NPR1, pri čemu oni postaju monomerni, i kao takvi se translociraju u jezgru i predstavlja njegov aktivirani oblik. Aktivnost jezgrenog proteina NPR1 regulirana je fosforilacijom. Proteini NPR1 u interakciji s transkripcijskim faktorima TGA potiču transkripciju gena koji odgovaraju na salicilat, kao što su geni *PR-1*. Aktivacija PR proteina posljedično uzrokuje i stvaranje SAR-a (Slika 3). Nakon izvršavanja funkcije, monomer NPR1 se prenosi natrag u citoplazmu gdje se nitrozilira natrag u oligomer i više nema mogućnost povratka unutar jezgre (Derksen 2013). Nasuprot PR proteinima i SAR-u, ISR ne ovisi o SA i aktivaciji gena PR, nego o jasmonskoj kiselini (JA) i etilenu. Oni su signal za stvaranje proteina NPR1 u ovom signalnom putu, dovodeći do stvaranja ISR-a (Sudisha i sur. 2012). Međutim, ova dva puta otpornosti nisu potpuno odvojena i neovisna (Slika 3). Ta pojava naziva se još i antagonističkim djelovanjem. Ranija istraživanja pokazala su da se egzogenim djelovanjem SA može spriječiti ekspresija gena uzrokovana stvaranjem rane na rajčici, tako što se inhibira biosinteza JA (Derksen 2013).



Slika 2. Interakcija efektora (*Avr* gena) i *R* gena dovodi do hipersenzitivne reakcije u biljci i razvoja otpornosti na patogena. (Preuzeto i modificirano prema Gururani 2012)



Slika 3. Prikaz prijenosa signala uključenih u stvaranje ISR i SAR izazvanih patogenim sojem u uročnjaku. LPS – lipopolisaharidi, PR - proteini povezani s patogenezom, Avr – produkt gena *Avr*, R – produkt gena *R*, HR - hipersenzitivni odgovor, SA – salicilna kiselina, JA – jasmonska kiselina, ET -etilen, NPR1 – regulatorni protein uključen u signalizaciju kod SAR i ISR, SNI – transkripcijski represor gena SAR, TGA – transkripcijski faktori koji su u interakciji sa SA - induciranim NPR1 genima (Preuzeto i modificirano prema Walters i Heil 2007).

5. ZAKLJUČAK

Biljni patogeni su najčešće mikroorganizmi poput virusa, gljivica, bakterija, nematoda i slično. Oni napadaju biljke preuzimajući kontrolu nad nutrijentima, pri tome uzrokujući bolesti ili smrt domadara prilikom ispuštanja enzima, toksina i drugih aktivnih supstanci narušavajući strukturni integritet i metabolizam istog. Prisutnost patogena kod biljaka uzrokuje štete na usjevima i na kvaliteti samih prinosa što predstavlja veliki problem, posebice u prehrambenoj industriji. Posljedično, znanstvenici ulažu velike napore kako bi shvatili mehanizme odgovora biljaka na patogene i stvaranja otpornosti na buduće infekcije. Razjašnjeno je kako prilikom ulaska patogena, prvi odgovor biljke nakon pozitivne reakcije proteina R patogena i proteina Avr biljke jest HR. HR predstavlja lokalni odgovor biljke na stres stvaranjem barijera, najčešće u obliku nekrotičnih lezija. Ona dovodi do sinteze PR proteina koji mogu biti sintetizirani i lokalno i sustavno po cijeloj biljci. Iako su detektirani PR proteini proučavani i jasno je da su dio obrambenog odgovora biljaka te daljnjeg stvaranja SAR-a, još uvijek nisu potpuno jasni mehanizmi aktivacije i funkcija svih porodica. Konačno stvaranje SAR-a omogućuje biljci adekvatniju borbu prilikom budućih infekcija patogenom. Detaljnije razumijevanje pojedinih koraka unutar navedenih mehanizama smatra se važnim korakom za čitavu ljudsku populaciju jer upravo biljke predstavljaju jedan od glavnih izvora hrane. Također, jedan su od najvažnijih čimbenika u stvaranju stabilne globalne klime. S tim na umu, jasno je da je dobro poznavanje biljnih mehanizama, kao i očuvanje biljaka, goruće pitanje budućnosti s obzirom da ljudi, ako ne u potpunosti, onda velikim dijelom ovise o njima.

6. LITERATURA

Agrios G. N. Plant pathogens and disease:general introduction. U: Agrios G. N. (ur.) Plant pathology, Elsevier Inc, Amsterdam, str. 1 – 34.

Breen S., Williams J. S., Outram M., Kobe B., Solomon S. P. (2017) Emerging Insights into the Functions of PathogenesisRelated Protein 1. Trends in Plant Science 22: 871-879.

Derksen H. , Rampitsch C., Daayf F. (2013) Signaling cross-talk in plant disease resistance. Plant Science 207: 79–87.

Glazebrook J. (2001) Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis - 2001 status. Curr. Opin. Plant. Biol. 4: 301-8.

Gururani M. A., Nookaraju A., Pandey S. K., Upadhyaya C. P., Venkatesh J., Park S. W. (2012) Plant disease resistence genes: Current status and future directions. Physiological and Molecular Plant Pathology 78:51-65.

Hong J. K., Lee S. C., Hwang B. K. (2005) Activation of pepper basic PR-1 gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. Gene356: 169 – 180.

Kitajima S., Sato F. (1999) Plant Pathogenesis-Related Proteins: Molecular Mechanisms of GeneExpression and Protein Function. J. Biochem. 125: 1 - 8.

Maleck K., Lawton K. (1998) Plant strategies for resistance to pathogens. Current Opinion in Biotechnology 9: 208-213.

Maleck K., Dietrich R. A. (1999) Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies?. Trends in Plant Science 4: 2015 – 219.

Oliveira M., Varanda C.M.R., Félix M.R. (2016) Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. Phytochemistry Letters 15:152-158.

Pal K.K. and Gardener M. (2006) Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor.

Sels J., Mathys J., De Coninck B. M. A., Cammue B. P. A., De Bolle M. F. C. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry. 46:941 – 950.

Stintzi A., Heitza T., Prasadb V., Wiedemann M. S., Kauffmanna S., Geoffroya P., Legranda M., Fritiga B. (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. Biochemie 75: 687 – 706.

Sudisha J., Sharathchandra R. G., Amruthesh K. N., Kumar A., Shetty H. S. (2012) Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response. U: Merillon J. M., Ramawat K. G. (ur.) Plant Defence: Biological Control, Progress in Biological Control, Springer, str. 379 – 403.

Van Loon L.C., Van Strien E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, Physiol. Mol. Plant Pathol. 55:85–97.

Van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J. (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. Annual Review Phytopathology 44: 135–62.

Derksen H. , Rampitsch C., Daayf F. (2013) Signaling cross-talk in plant disease resistance. Plant Science 207: 79–87.

Walters, D. and Heil, M. (2007) Costs and trade-offs associated with induced resistance. Physiological and Molecular Plant Pathology 71: 3-17.