

**BIAŁKA ns-LTP – FUNKCJONALNY POLIMORFIZM\***

## NS-LTP PROTEINS – FUNCTIONAL POLYMORPHISM

Agnieszka KIEŁBOWICZ-MATUK

Pracownia Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Genetyki Roślin  
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

*Streszczenie:* Niespecyficzne białka transportujące tłuszcze (ns-LTP) należą do olbrzymiej rodziny białek roślinnych, których funkcja *in vivo* wciąż pozostaje nieznana. Biorąc pod uwagę budowę, właściwości i przypuszczalnie pełnione przez nie funkcje wyodrębniono dwie klasy białek transportujących lipidy, ns-LTP1 i ns-LTP2. Cechą charakterystyczną wszystkich białek ns-LTP jest obecność czterech amfipatycznych  $\alpha$ -helis, które tworzą wewnętrzną kieszeń hydrofobową będącą miejscem wiązania cząsteczek lipidowych. W genomach roślin wyższych stwierdzono obecność wielu kopii genów dla roślinnych białek transportujących tłuszcze. Prawdopodobnie poszczególne izoformy ns-LTP należące do tej samej rodziny, ale różniące się profilem ekspresji mogą pełnić w komórce odmienne funkcje. Wykazano ich udział między innymi w tworzeniu powierzchniowej warstwy ochronnej, somatycznej embriogenezie, w sygnalizacji oraz w adaptacji roślin do różnych warunków środowiska. Ponadto, niektóre białka ns-LTP znane są jako panalergeny w żywności pochodzenia roślinnego. Ostatnie badania ujawniły, że białka transportujące lipidy mogą wiązać się do zlokalizowanych w błonie plazmatycznej miejsc, które zidentyfikowano jako receptory dla elicytyn. Wskazuje to na istotną rolę tych białek w mechanizmach obronnych roślin przeciwko patogenom.

*Słowa kluczowe:* niespecyficzne białka transportujące tłuszcze, transport lipidów, panalergeny roślinne, elicytyny.

*Summary:* Non-specific lipid transfer proteins (ns-LTPs) belong to a large family of plant proteins whose function *in vivo* remains unknown. On the basis of their structure, properties and functions two main classes of lipid transfer protein have been identified in plants, ns-LTP1 and ns-LTP2 respectively. The most interesting structural feature of the ns-LTP proteins is the presence of four amphipatic  $\alpha$ -helices which form the internal hydrophobic cavity that can bind the lipid molecules. Plants ns-LTPs are encoded by a multigenic family, therefore different isoforms may correspond to different functions. It has been implicated that plant lipid transfer proteins are involved in protecting surface layer formation, somatic embryogenesis, signaling and plant adaptation to various environmental conditions. Some of the ns-LTP proteins are also known to be panallergens of plant-derived foods. It has been recently shown that the lipid transfer proteins bind to the sites located on plasma membranes which have been identified as the elicitor receptors. It indicated important role of this proteins in plant defense mechanisms against pathogens.

*Key words:* non-specific lipid transfer proteins, lipid transfer, plant panallergens, elicitors.

\*Praca dofinansowana przez Instytut Genetyki Roślin PAN.

## WSTĘP

Z definicji lipidy (tłuszcze) są cząsteczkami biologicznymi nierozpuszczalnymi w wodzie i dobrze rozpuszczalnymi w rozpuszczalnikach organicznych. Pełnią one w organizmach roślinnych różnorodne funkcje biologiczne. W formie triglicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych są głównym źródłem węgla i energii. Jako fosfo- i glikolipidy stanowią element strukturalny błon komórkowych. Pochodne poliestrów kwasów tłuszczowych są składnikami budulcowymi warstw na powierzchni organów roślinnych (kutyny i suberyny), które chronią tkanki przed nadmierną utratą wody i szkodliwym działaniem stresowych czynników środowiska zewnętrznego. Ponadto lipidy, a zwłaszcza ich pochodne pełnią funkcję hormonów i wtórnych cząsteczek sygnalizacyjnych. Ażeby sprostać tej mnogości zadań w komórce, tempo wymiany lipidów na poziomie komórkowym, pozakomórkowym i błonowym musi podlegać precyzyjnej regulacji. Od kilku lat wiadomo, że w błonach biologicznych występują specyficzne regiony lipidowe nazywane mikrodomenami (ang. *lipid rafts*), które odgrywają istotną rolę w obrocie lipidów i w modulacji aktywności wielu białek [61, 87].

Ze względu na hydrofobowy charakter cząsteczki, transport lipidów w komórce na duże odległości odbywa się za pomocą rozpuszczalnych makrocząsteczek bądź struktur wielocząsteczkowych. Należą do nich białka transportujące tłuszcze i pęcherzyki lipoproteinowe [64].

## 1. ROŚLINNE BIAŁKA TRANSPORTUJĄCE TŁUSZCZE

Białka transportujące tłuszcze (ang. *Lipid Transfer Protein, LTP*) stanowią rodzinę białek o bardzo zachowawczej strukturze. Występują one powszechnie w świecie organizmów żywych. Dotychczas wykryto je w komórkach ssaków, roślin, drożdży, grzybów i niektórych bakterii [49, 51]. W przeciwieństwie do roślinnych LTP, białka transportujące tłuszcze u innych organizmów charakteryzują się wysoką masą cząsteczkową w granicach od 15 kDa do 30 kDa oraz brakiem podobieństwa sekwencji pomiędzy poszczególnymi izoformami [81, 97].

Z powodu szerokiej specyficzności substratowej roślinne białka transportujące tłuszcze określa się terminem ns-LTP (ang. *non-specific Lipid Transfer Protein*) [51]. Dotychczas wyizolowano geny dla ns-LTP z marchwi (*Daucus carota*) [86], pomidora (*Lycopersicon pennellii*) [78, 90], moreli (*Prunus armeniaca*) [17], kukurydzy (*Zea mays*) [41], ryżu (*Oryza sativa*) [80], jęczmienia (*Hordeum vulgare*) [35], rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) [2], papryki (*Capsicum annuum*) [50, 69], kapusty (*Brassica napus*) [43] i wilczomlecza (*Euphorbia lagascae*) [27].

## 2. STRUKTURA ROŚLINNYCH BIAŁEK TRANSPORTUJĄCYCH TŁUSZCZE

Pod względem budowy i przypuszczalnie pełnionych przez nie funkcji roślinne białka transportujące tłuszcze stanowią bardzo zróżnicowaną grupę białek. Na podstawie powyższych kryteriów podzielono je na dwie klasy: ns-LTP1 (o masie cząsteczkowej około 9 kDa) i ns-LTP2 (o masie cząsteczkowej około 7 kDa) [1, 14, 22, 51, 58]. Najwięcej danych wskazujących na właściwości fizykochemiczne białek transportujących tłuszcze oraz ich subkomórkową lokalizację dotyczy grupy ns-LTP1. Charakteryzuje ją wysoki punkt izoelektryczny oraz obecność ośmiu zachowawczych reszt cysteiny połączonych czterema wiązaniami dwusiarczkowymi. Dodatkowo, przy końcu aminowym łańcucha polipeptydowego występuje sekwencja sygnałowa, która prawdopodobnie kieruje białko do retikulum endoplazmatycznego. Badania z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego dostarczyły wielu istotnych informacji o strukturze przestrzennej białek ns-LTP u różnych organizmów roślinnych. Dotychczas udało się określić strukturę trzeciorzędową dla ns-LTP1 z jęczmienia (*Hordeum vulgare*) [42], ryżu (*Oryza sativa*) [75], pszenicy (*Triticum aestivum*) [23], kukurydzy (*Zea mays*) [41], chińskiej fasoli (*Phaseolus mungo*) [55] i tytoniu (*Nicotiana tabacum*) [19]. Ponadto, dużym osiągnięciem w ostatnich latach było poznanie przestrzennej struktury białek klasy ns-LTP2 z ryżu (*Oryza sativa*) [58, 80] i pszenicy (*Triticum aestivum*) [46]. Interesującą cechą białek transportujących tłuszcze jest obecność w cząsteczce czterech amfipatycznych  $\alpha$ -helis stabilizowanych mostkami dwusiarczkowymi oraz zlokalizowanego przy końcu karboksylowym łańcucha długiego ramienia z licznymi zwrotami  $\beta$  (ang.  $\beta$ -turns). Ściśle upakowane  $\alpha$ -helisy tworzą olbrzymią, wewnętrzną kieszeń hydrofobową (tunel hydrofobowy), która jest miejscem wiązania mono- i diacylowanych cząsteczek lipidów włączając: kwasy tłuszczowe [24, 40], acylo CoA [53], lizo-fosfatydylocholinę [15] i fosfatydyloglicerol [82]. Porównując strukturę ns-LTP1 u różnych organizmów zaobserwowano, że hydrofobowa kieszeń charakteryzuje się dużą plastycznością, a poszczególne izoformy białek mogą różnić się jej rozmiarem [26, 88]. Badania wykazały, że w wyniku związania cząsteczki kwasu tłuszczowego przez białko ns-LTP1, objętość tunelu zwiększa się z  $\sim 400 \text{ \AA}^3$  do  $\sim 547\text{--}620 \text{ \AA}^3$  [40].

Ciekawym odkryciem było stwierdzenie, że białka ns-LTP nie mogą wiązać steroli i innych cząsteczek o sztywnym rdzeniu. Świadczy to o tym, że zarówno plastyczność tunelu, jak i elastyczność hydrofobowych cząsteczek lipidowych są niezbędne dla utworzenia kompleksu ‘białko ns-LTP - lipid’ [12, 23, 24, 63]. Co istotne, stwierdzono, że wiązanie lipidów wewnątrz tunelu jest dodatkowo kontrolowane przez ciśnienie błony powierzchniowej (np. zależy od stopnia upakowania jej składników). Zatem wydaje się słuszne, że w normalnym stanie fizjologicznym białka ns-LTP nie powinny wiązać i przenosić lipidów wchodzących w skład błony.

Poznanie przestrzennej struktury białek transportujących tłuszcze pozwoliło również ustalić, w jaki sposób białka te oddziałują z cząsteczkami lipidów. Obecnie znana jest struktura krystalograficzna kompleksów białek transportujących tłuszcze z 9 różnymi

cząsteczkami kwasów tłuszczowych [41]. Co więcej, określono przestrzenną strukturę kompleksów białek klasy ns-LTP1 z palmitynianem i 1-palmitylo-2-lizo-fosfatydylocholiną u kukurydzy (*Zea mays*) [37], z palmitylo-CoA u jęczmienia (*Hordeum vulgare*) [53] i z 1,2-dwumirystylofosfatydylo-glicerolem u pszenicy (*Triticum aestivum*) [82].

### 3. SUBKOMÓRKOWA I ORGANOWA LOKALIZACJA BIAŁEK ns-LTP

W genomach roślin wyższych wykazano obecność wielu kopii genów dla roślinnych białek transportujących tłuszcze [9, 47, 70, 90]. Dotychczas zidentyfikowano ponad 40 genów dla ns-LTP w genomie u *A. thaliana* [5]. Prawdopodobnie geny dla ns-LTP są zorganizowane w małe rodziny [2, 31, 72, 90]. Wykazano, że ekspresja genów dla różnych izoform białkowych należących do tej samej rodziny jest tkankowo i organowo specyficzna [16]. Dodatkowo, w obrębie różnych organów rośliny podlega ona rozwojowej i „środowiskowej” regulacji [38]. Sugeruje się, że białka ns-LTP, należące do tej samej rodziny, ale różniące się profilem ekspresji, mogą pełnić w komórce odmienne funkcje [31, 90].

Pierwotnie białka ns-LTP1 zostały wykryte w nadziemnych organach roślin, takich jak: owoce, rozwijające się kwiaty, szczytowe części pędów i liście, podczas gdy białka ns-LTP2 zlokalizowano wyłącznie w korzeniach [84]. Obecnie wiadomo, że intensywna synteza obu grup białek zachodzi również w nasionach [21, 48, 59].

Wielu autorów wskazuje, że ekspresja genów kodujących ns-LTP jest wyższa na wczesnych etapach rozwoju rośliny. Tym niemniej, obecność białek transportujących tłuszcze stwierdzono również w młodych tkankach roślin dojrzałych [90]. Analiza ekspresji genu kodującego białko transportujące tłuszcze EP2 z marchwi (*Daucus carota*) wykazała, że najsilniejsza ekspresja ma miejsce w merystemie wierzchołkowym pędu, w zawiązkach liściowych i w rozwijających się kwiatach [86]. Interesujące wyniki uzyskano również na podstawie analizy poziomu transkryptów trzech genów dla ns-LTP wyizolowanych z wilczomlecza (*Euphorbia lagascae*), (*EILTP1*, *EILTP2* i *EILTP3*). Stwierdzono, że w przypadku genów *EILTP1* i *EILTP3* maksymalna akumulacja mRNA miała miejsce w komórkach bielma i liścieniach, a ekspresja genu *EILTP2* zachodziła wyłącznie w komórkach bielma [28].

Jak już wspomniano, jedną z charakterystycznych cech roślinnych białek transportujących tłuszcze jest występowanie peptydu sygnałowego przy końcu aminowym cząsteczki. Dlatego też sugeruje się, że ns-LTP ulegają sekrecji w warunkach *in vivo*. Przykładem są wyniki badań immunolokalizacyjnych nad białkami ns-LTP: Parj1 i Parj2 u *Parietaria judaica*. Wykazano, że zawartość białek transportujących tłuszcze w ziarnie pyłku u parietarii zmienia się podczas hydratacji [94]. Pierwotnie białka ns-LTP są obecne w cytoplazmie komórki i w ciałach tłuszczowych. Okres magazynowania ns-LTP jest jednak bardzo krótki, po czym białka są kierowane na szlak sekrecyjny [89].

Aktualne dane wskazują na pozakomórkową lokalizację białek ns-LTP. Przypuszczalnie docelowym miejscem ich funkcjonowania są ściany komórek epidermalnych i epikutikularna warstwa woskowa [51].

Istnieją doniesienia wskazujące, że białka transportujące tłuszcze charakteryzują się wysoką stabilnością termiczną i proteolityczną [56]. Autorzy sugerują, że najprawdopodobniej ma to związek z występowaniem tych białek w warunkach stresowych. Dla niektórych białek transportujących tłuszcze wykazano wzrost poziomu akumulacji transkryptu w odpowiedzi na działanie czynników stresowych, takich jak: patogeny [5, 33, 62], zranienie [83], światło [10] i jony metali ciężkich [35]. Wiele danych wskazuje, że geny dla ns-LTP mogą być również aktywowane pod wpływem chłodu, suszy i zasolenia [52, 72, 79, 90, 98]. Interesującym przykładem jest gen *CALTP1* z papryki (*Capsicum annuum*), dla którego silny wzrost poziomu transkryptu zaobserwowano w liściach pod wpływem suszy i wysokiego zasolenia. Świadczy to o potencjalnej roli *CALTP1* w nabywaniu tolerancji roślin na stresi środowiskowe [50]. Ekspresja innego genu *BG-14* kodującego białko transportujące tłuszcze z stokłosa bezostnej (*Bromus inermis*) jest indukowana w odpowiedzi na suszę, zasolenie, anizomycynę i sfingozynę [98], podczas gdy silny wzrost akumulacji białka transportującego lipidy, Ha-AP10 ze słonecznika (*Helianthus annuus*) odnotowano pod wpływem stresu solnego i infekcji grzybowej [34, 77].

Ostatnie badania ujawniły również obecność w promotorach wielu genów dla białek transportujących tłuszcze, takich jak: *LpLtp1* i *LpLtp2* z pomidora (*Lycopersicon pennellii*), *Ltp2*, *3*, *4*, *6* z jęczmienia (*Hordeum vulgare*) i *Fxaltp* z truskawki (*Fragaria ananasa*) obecność *cis*-regulatorowych sekwencji niezbędnych do aktywacji ekspresji genów pod wpływem ABA [31, 90, 99].

#### 4. RÓŻNORODNOŚĆ FUNKCJONALNA ROŚLINNYCH BIAŁEK ns-LTP

Precyzyjna rola białek ns-LTP nie jest jeszcze dokładnie poznana. Dostępne dane pozwalają przypuszczać, że skutki ich aktywności mogą być dla komórek bardzo różnorodne (tab. 1). Pierwotne dane wskazują na rolę białek ns-LTP w transporcie wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym. Wykazano, że białka ns-LTP w warunkach *in vitro* uczestniczą w wewnątrzłonowej wymianie fosfolipidów, na przykład w transporcie fosfatydylocholinoz liposomów do mitochondriów. W związku z tym sugerowano ich udział w przebudowie i odnowie błon tych organelli. Jakkolwiek, brak jest bezpośrednich dowodów potwierdzających funkcję ns-LTP w warunkach *in vivo* [2].

Jednym z dobrze poznanych zjawisk zachodzących podczas dostosowywania się roślin do niskich temperatur jest utrzymanie płynnej struktury błon. Temperatura krzepnięcia błon komórkowych jest związana z obecnością nienasyconych kwasów tłuszczowych w fosfo- i galaktolipidach oraz z udziałem lipidów zawierających duże grupy polarne. Próby wprowadzenia do roślin enzymów biorących udział w tworzeniu

TABELA 1. Przykłady białek ns-LTP u różnych gatunków roślin, ich lokalizacja i główne funkcje w komórce

Typ LTP	Gatunek rośliny	Lokalizacja	Potencjalna funkcja	Auto-rzy
E2P	<i>Daucus carota</i>	merystem wierzchołkowy pędu, zawiązki liściowe, rozwijające się kwiaty	– somatyczna embriogeneza – transport monomerów kutyny	[86]
PvLTP	<i>Phaseolus vulgaris</i>	warstwa korowa korzenia	– transport monomerów suberyny	[84]
EILTP1,2	<i>Euphorbia lagascae</i>	komórki bielma, liścienie	– udział w obrocie lipidów w komórkach bielma – inhibitory proteaz	[28]
ns-LTP2	<i>Oryza sativa</i>	nasiona	– transport lipidów – składnik systemu obronnego roślin	[58]
CALTP1	<i>Capsicum annuum</i>	komórki floemu, epiderma liści	– nabywanie tolerancji roślin na stresy środowiskowe, tj. wysokie zasolenie, suszę, atak patogenów	[50]
BG-14	<i>Bromus inermis</i>	siewki	– adaptacja roślin do warunków stresowych	[98]
Ha-AP10	<i>Helianthus annuus</i>	kiełkujące nasiona	– udział w reakcjach obronnych roślin na stres solny i atak patogenów	[34]
Fxaltp	<i>Fragaria ananasa</i>	komórki bielma, epiderma liści	– udział w odpowiedzi roślin na stres chłodu, zranienie i ABA	[99]
Vrltp 1	<i>Figna radiata</i>	nasiona, łodygi, młode liście	– udział w odpowiedzi roślin na stres dehydracyjny i zasolenie	[59]
WAX9	<i>Brassica oleraceae</i>	młode liście	– ochrona tylakoidów chloroplastów przed uszkodzeniem w temp. zamarzania (krioprotekcja)	[43, 44]
EARL11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	błona komórkowa lub ściana komórkowa	– stabilizacja błon i ściany komórkowej pod wpływem niskiej temperatury	[10]
Parj1 Parj2	<i>Parietaria judaica</i>	pierwotnie cytoplazma i ciała tłuszczowe ziarna pyłku, następnie kierowane na szlak sekrecyjny	– panalergeny roślinne – udział w procesie zapylecia i zapłodnienia	[89, 94]
ns-LTP1 (CaMBP)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	liście	– wiązanie kalmoduliny i udział w procesach przez nią stymulowanych	[96]
ns-LTP (rodzina białek R-14)	<i>Hordeum vulgare</i>	ziarna	– zdolność wiązania jonów metali ciężkich, tj. $Pb^{+2}$ , $Co^{+2}$ , $Hg^{+2}$ i $Ni^{+2}$ – hamowanie procesu fermentacji drożdży piwowarskich, wpływ na tworzenie i stabilność piany	[35, 36]
ns-LTP	<i>Zea mays</i>	–	– inicjacja transdukcji sygnału apoptotycznego w mitochondriach w wątrobie u myszy	[18, 20]
ns-LTP1	<i>Hordeum vulgare</i>	dojrzałe nasiona	– inhibitor proteiny cysteinowej	[48]
ns-LTP1	Castor bean	liścienie	– regulacja $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych w glioksysomach	[91]
LTP1	<i>Triticum aestivum</i>	–	– pośredniczy w transporcie leków	[71]

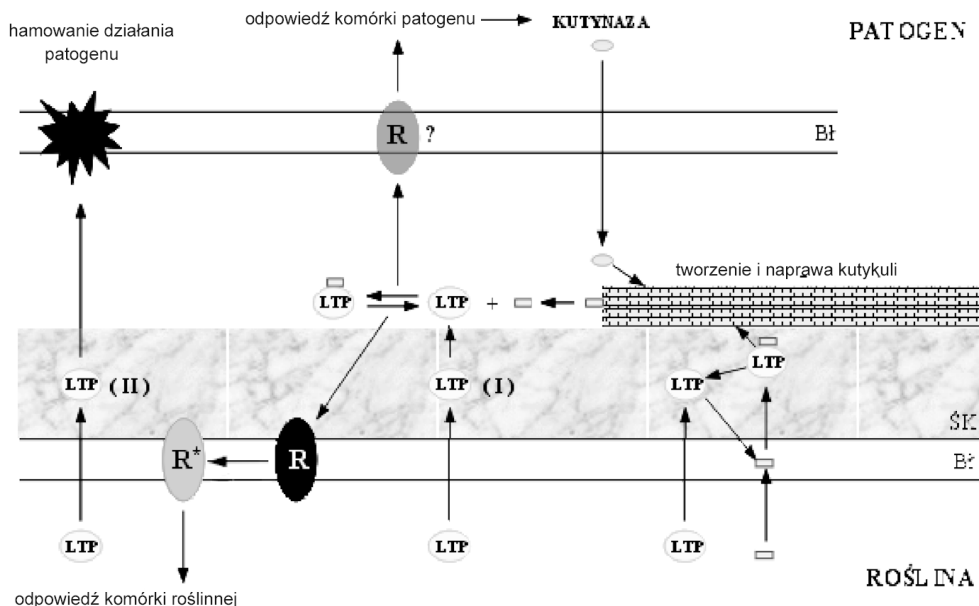
podwójnych wiązań w nasyconych lub jednonienasyconych kwasach tłuszczowych, doprowadziły do uzyskania roślin o zwiększonej tolerancji na chłód. Wykazano, że rośliny takie jak: szpinak (*Spinacea oleracea*) i rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*), które zawierają dużo nienasyconych kwasów tłuszczowych są bardziej odporne na niską temperaturę [39]. Ponieważ zmiany w składzie lipidów błonowych są istotne w nabywaniu tolerancji roślin na chłód, sugeruje się, że niektóre ns-LTP pełnią rolę w modyfikowaniu błon plazmatycznych.

Istnieją także dowody na udział niektórych roślinnych białek transportujących tłuszcze w stabilizacji membran komórkowych podczas zamarzania [43, 44, 85]. Od dawna wiadomo, że strukturą najbardziej wrażliwą na działanie niskiej temperatury są błony tylakoidów. Z aklimatyzującej się do chłodu kapusty (*Brassica oleracea*) wyizolowano białko WAX9, które wiąże się z tylakoidami chloroplastów i zapobiega ich uszkodzeniu w temperaturach zamarzania. Jak stwierdzono, pełniące funkcję krioprotekcyjną białko WAX9 należy do rodziny ns-LTP1 [85].

Inspirujące i ciekawe było odkrycie, że białka transportujące tłuszcze mogą brać udział w tworzeniu ochronnej, woskowej warstwy hydrofobowej na powierzchni tkanek okrywających [13, 25, 90]. Pomimo że precyzyjna rola tych białek w powstawaniu warstwy kutykularnej nie jest znana wykazano, że białka klasy ns-LTP1 są zaangażowane w transport monomerów kutyny, podczas gdy białka klasy ns-LTP2 transportują monomery suberyny [25, 86].

W ostatnich latach wyizolowano i zidentyfikowano wiele roślinnych białek związanych z mechanizmem ogólnej reakcji komórek na infekcje bakteryjne i grzybowe. Charakteryzuje je obecność dużej liczby reszt cysteinowych. Obok  $\beta$ -1,3-glukanaz i cystatyn, do białek defenzyno-podobnych zalicza się również białka transportujące tłuszcze. O roli ns-LTP w obronie roślin przed infekcją bakteryjną i grzybową, wnioskuje się na podstawie ich lokalizacji w ścianach komórek epidermalnych oraz zwiększonego poziomu tych białek w komórkach w odpowiedzi na atak patogenu (ryc. 1) [32, 95]. Dane wielu autorów dowodzą, że białka ns-LTP wykazują wysoką homologię sekwencji do białek zasadowych o masie cząsteczkowej około 9 kDa, których udział stwierdzono podczas interakcji roślina-mikroorganizm [6]. Dowiedziono, że białka ns-LTP stanowią istotny składnik systemu obrony komórek przed patogenami, gdyż hamują działanie pewnych fitopatogenów, takich jak: *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Fusarium solani*, *Rizoctonia solani*, *Trichoderma viride* i *Cercospora beticola* [5, 33, 38, 50, 62].

Od kilku lat wiadomo, że niektórzy przedstawiciele białek ns-LTP mogą brać udział w wiązaniu jonów metali ciężkich. Przykładem jest białko ns-LTP z jęczmienia (*Hordeum vulgare*), które wiąże kationy metali dwuwartościowych, takich jak:  $Pb^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  i  $Ni^{+2}$ . Można więc spekulować o domniemanej funkcji tych białek w procesie fitoeks-trakcji, który bazuje na zdolności roślin do hiperakumulacji metali [35]. Ocenia się, że wprowadzenie do roślin genów, kodujących białka zaangażowane w wiązanie i transport jonów metali ciężkich, może prowadzić do otrzymania roślin transgenicznych o zwiększonej zdolności do ich akumulacji.



RYCINA 1. Mechanizm ilustrujący rolę roślinnych białek transportujących tłuszcze (LTP) podczas interakcji pomiędzy patogenami grzybowymi i roślinami (wg [5], zmienione): LTP – białko transportujące lipidy; R – nieaktywny receptor; R\* – aktywny receptor; ŚK – ściana komórkowa; Bł – błona plazmatyczna; konstytutywna synteza enzymu kutynazy przez grzyby pasożytnicze np. *Fusarium* prowadzi do uszkodzenia kutykularnej warstwy ochronnej i uwolnienia monomerów kutyny, które następnie są wiązane przez białka LTP zlokalizowane w rejonie kutykuli (I). Powstały kompleks ‘monomer kutyny-białko LTP’ może wiązać się do receptorów zlokalizowanych w błonie plazmatycznej komórek roślinnych i tym samym zapoczątkowywać odpowiedź obronną organizmu. W rezultacie dochodzi do wzmożonej syntezy różnych białek transportujących tłuszcze oraz innych białek stresowych PR, które hamują wzrost i rozwój patogenu, jak również biorą udział w naprawie hydrofobowej warstwy kutykularnej (II). Alternatywnie przypuszcza się, że kompleks ‘monomer kutyny-białko LTP’ może wiązać się do domniemanych receptorów w błonie plazmatycznej u grzybów i indukować nadprodukcję enzymu kutynazy

Uwzględniając dane przedstawione powyżej, świadczące o funkcji białek ns-LTP w komórkach pod wpływem stresów, pewne białka transportujące tłuszcze zaliczono do grupy białek obronnych PR-14 (ang. *Pathogenesis-Related*) [92].

Niedawno wykazano, że niektóre białka ns-LTP mogą również uczestniczyć w wiązaniu kalmoduliny [57, 96]. Na przykład białko CaMBP wyizolowane z *A. thaliana* wiąże kalmodulinę w sposób niezależny od jonów wapnia oraz pośredniczy w procesach przez nią stymulowanych. Badania potwierdziły, że CaMBP pod względem homologii sekwencji i właściwości fizykochemicznych wykazuje znaczne podobieństwo do roślinnych białek transportujących tłuszcze. 12-aminokwasowy rejon w cząsteczce CaMBP wiążący kalmodulinę zawiera trzy silnie konserwatywne motywy, których obecność stwierdzono we wszystkich znanych ns-LTP.



Istnieją także dane na temat funkcji niektórych białek transportujących tłuszcze w procesach wzrostu i rozwoju roślin [27, 28].

Niezwykle ważną choć nie do końca wyjaśnioną rolę roślinnych białek ns-LTP jest inicjacja transdukcji sygnału apoptotycznego w mitochondriach w wątrobie u myszy [18]. Wykazano, że białko transportujące tłuszcze z kukurydzy (*Zea mays*) w obecności specyficznych lipidów może indukować uwolnienie cytochromu c i innych białek apoptogennych z wnętrza mitochondriom do cytoplazmy. Jakkolwiek szczegóły tego mechanizmu nie zostały dotychczas poznane. Analiza sekwencji aminokwasowej ujawniła wysoką homologię sekwencji pomiędzy roślinnymi białkami ns-LTP a pro-apoptotycznym białkiem ssaków Bid należącego do rodziny Bcl-2 [20].

Znaczne zainteresowanie budzi ostatnio wśród naukowców zaklasyfikowanie białek transportujących lipidy do grupy silnych panalergenów pokarmowych pochodzenia roślinnego [3, 4, 45, 70, 76]. Pierwotnie ns-LTP zostały zidentyfikowane w skórce owoców brzoskwini jako niskocząsteczkowe białka o właściwościach alergicznych. Ponadto ich obecność stwierdzono w owocach jabłoni, gruszy, śliwy, moreli, brzoskwini i wiśni. Udokumentowano też duże podobieństwo strukturalne między tymi białkami wymienionych owoców a odpowiednimi białkami kukurydzy. Badania wykazały, że alergia na owoce z rodziny *Rosaceae* może być związana z występowaniem pewnych reakcji krzyżowych [29, 60, 100].

Dane wielu autorów sugerują, że białka transportujące tłuszcze dzięki wysokiej stabilności termicznej mogą być wykorzystywane w procesie technologicznym produkcji piwa. Badania wykazały, że białko ns-LTP z jęczmienia (*Hordeum vulgare*) należące do grupy białek PR-14, hamuje proces fermentacji drożdży piwowskich (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz wpływa na tworzenie i stabilność piany [36].

## 5. DIALOG POMIĘDZY ns-LTP1 A ELICITYNAMI W MECHANIZMACH OBRONNYCH ROŚLIN

Elicityny stanowią dużą rodzinę niskocząsteczkowych, bogatych w cysteinę białek zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez grzyby patogenne *Phytophthora* i *Pythium* [68]. Są one związane z aktywną odpowiedzią rośliny na zewnętrzne czynniki stresowe [74]. Ponadto, stanowią ważny element w regulacji procesów metabolicznych komórek w stanie zagrożenia zewnętrznego.

Pierwotnie elicityny zostały zidentyfikowane na podstawie ich zdolności do indukcji reakcji nadwrażliwości (ang. *Hypersensitive Response*, *HR*) prowadzącej do samobójczej śmierci komórek kontaktujących się z patogenem u *Nicotiana tabacum*, *Raphanus sativus* i niektórych gatunków *Brassica* [54]. Obecnie wiele danych wskazuje, że mogą one również zapoczątkowywać rozwijającą się często w następstwie HR systemiczną odporność nabytą (ang. *Systemic Acquired Resistance*, *SAR*) przeciwko szerokiej różnorodności patogenów grzybowych i bakteryjnych [51, 73]. Istnieją również dowody świadczące, iż białka te przemieszczają się w obrębie rośliny [73].

Pomimo że funkcja większości elicytyn nie została dotychczas poznana ostatnie doniesienia sugerują, że pewne klasy tych białek, tj. I-A i I-B, mogą wiązać cząsteczki lipidowe i sterole. Dlatego też sugeruje się funkcję elicytyn jako nośników steroli i transporterów tłuszczu [66, 67]. Ma to również związek z charakterystyczną strukturą tych białek. Badania krystalograficzne i NMR wykazały, że głównymi elementami budowy elicytyn jest obecność sześciu amfipatycznych  $\alpha$ -helis stabilizowanych przez trzy mostki dwusiarczkowe oraz motywu w kształcie „dzioba” utworzonego przez antyrównoległą strukturę  $\beta$  i pętlę  $\Omega$  [7]. Silnie pofałdowane  $\alpha$ -helisy tworzą wewnętrzną kieszeń hydrofobową, która jest miejscem wiązania steroli oraz kwasów tłuszczowych [66, 93]. Dalsze badania ujawniły, że niektóre białka elicytyno-podobne, np. kapsyceina z *Phytophthora capsici* mają aktywność fosfolipazy [65]. Ponadto wykazano, że indukcja ekspresji dwóch genów dla elicytyn z *Phytophthora infestans* zachodzi podczas kopulacji [30].

W ostatnim czasie trwają intensywne prace nad ustalaniem związku pomiędzy elicytynami a białkami ns-LTP1 w mechanizmach obronnych roślin. Badania ujawniły, że roślinne białka transportujące lipidy i elicytyny mają wspólne właściwości strukturalne i funkcjonalne. Warto zaznaczyć, że w przeciwieństwie do elicytyn białka ns-LTP1 nie mogą wiązać steroli. Dane wielu autorów wskazują, że kompleks ‘ns-LTP - lipid’ wiąże się do zlokalizowanych w błonie plazmatycznej komórki receptorów dla elicytyn [11], zapoczątkowując tym samym reakcję obronną organizmu [5]. Receptory dla elicytyn tworzą struktury oligomeryczne złożone z czterech identycznych podjednostek o łącznej masie około 193 kDa [8]. To częściowo wyjaśnia powinowactwo i współzawodnictwo egzogennych elicytyn i endogennych białek transportujących o te same sensory błonowe. Wynikiem tego współzawodnictwa może być przykładowo niska wrażliwość pewnych roślin na traktowanie elicytynami. Na przykład zaobserwowano, że poziom białek ns-LTP u tytoniu (*Nicotiana tabacum*) jest około 10 razy niższy niż u niewrażliwego na traktowanie elicytynami pomidora (*Lycopersicon esculentum*). Warto również zaznaczyć, że najprawdopodobniej sposób wiązania do receptorów jest różny dla obu grup białek. Podczas gdy wiadomo, że utworzenie kompleksu ‘sterol - elicytyna’ jest niezbędne dla jego związania z odpowiednim sensory komórkowym, ciągle brak dowodów na to, czy utworzenie kompleksu ‘białko ns-LTP1 - lipid’ warunkuje jego oddziaływanie z cząsteczką receptora?

Badania wykazały, że selektywne rozpoznanie cząsteczek sygnałowych (elicytyn lub białek transportujących tłuszcze) przez specyficzne receptory komórkowe, zlokalizowane na zewnętrznej stronie błony jest pierwszym etapem kaskady sygnalizacyjnej prowadzącej do końcowej odpowiedzi rośliny na działający bodziec (ryc. 1). W dalszej kolejności zostaje uruchomiony cały łańcuch zdarzeń skierowanych przeciwko patogenowi [5], obejmujący napływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do komórki, depolaryzację błony cytoplazmatycznej, uwolnienie jonów  $\text{K}^+$  i równocześnie akumulację jonów  $\text{H}^+$ . Dochodzi do fosforylacji pewnych białek, zakwaszenia cytozolu, syntezy fitoaleksyn i enzymów hydrolitycznych oraz produkcji aktywnych form tlenu. W rezultacie następuje uruchomienie ekspresji określonych genów, których produkty białkowe mają na celu uniemożliwienie patogenowi dalszego rozprzestrzeniania się oraz zahamowanie jego

rozwoju. Do tej pory badacze poszukują odpowiedzi na pytanie, czy białka ns-LTP1 stymulują w roślinie odpowiedź w sposób podobny jak elicytyny prowadząc do indukcji reakcji nadwrażliwości? Czy też, co wydaje się bardziej prawdopodobne, zachowują się jak ich antagoniści?

## PODSUMOWANIE

W jakim punkcie zatem znajduje się obecna wiedza o funkcjach roślinnych białek transportujących tłuszcze? Uwaga badaczy skupia się na roli ns-LTP zarówno w fizjologii roślin, jak i w procesach technologicznych. Wskazuje się na udział tej olbrzymiej rodziny białek w wielu aspektach życia rośliny. Ciągłe jednak dużo pytań pozostaje bez odpowiedzi. Wydaje się, że poznanie przestrzennej struktury większości roślinnych białek transportujących tłuszcze oraz mechanizmów regulacji ich ekspresji pozwoli głębiej wniknąć w ogrom zadań, jakim muszą sprostać te białka w komórce.

## PODZIĘKOWANIE

*Autorka pracy dziękuje Panu doc. dr hab. Tadeuszowi Roratowi za cenne uwagi podczas redagowania niniejszej pracy.*

## LITERATURA

- [1] AIRENNE TT, KIDRON H, NYMALM Y, NYLUND M, WEST G, MATTJUS P, SALMINEN TA. Structural evidence for adaptive ligand binding of glycolipid transfer protein. *J Mol Biol* 2006; **355**: 224–236.
- [2] ARONDEL V, VERGNOLLE C, CANTREL C, KADER JC. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 2000; **157**: 1–12.
- [3] ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, AMATO S, VAN REE R. A case of allergy to beer showing cross-reactivity between lipid transfer proteins. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; **87**: 65–70.
- [4] ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, AMATO S. Relationship between peach lipid transfer protein specific IgE levels and hypersensitivity to non-Rosaceae vegetable foods in patients allergic to lipid transfer protein. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; **92**: 268–272.
- [5] BLEIN JP, COUTOS-THEVENOT P, MARION D, PONCHET M. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 293–296.
- [6] BLILOU I, OCAMPO JA, GARCIA-GARRIDO JM. Induction of Ltp (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *J Exp Bot* 2000; **51**: 1969–1977.
- [7] BOISSY G. The 2.1 angstrom structure of an elicitor-ergosterol complex: a recent addition to the sterol carrier protein family. *Protein Sci* 1999; **8**: 1191–1199.
- [8] BOURQUE S, BINET MN, PONCHET M, PUGIN A, LEBRUN-GARCIA A. Characterization of the cryptogin binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34699–34705.
- [9] BOUTROT F, GUIRAO A, ALARY R, JOUDRIER P, GAUTIER MF. Wheat non-specific lipid transfer protein genes display a complex pattern of expression in developing seeds. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1730**: 114–125.

- [10] BUBIER J, SCHLÄPPI M. Cold induction of *EARLII*, a putative *Arabidopsis* lipid transfer protein, is light and calcium dependent. *Plant Cell Environ* 2004; **27**: 929–936.
- [11] BUHOT N, DOULIEZ JP, JACQUEMARD A, MARION D, TRAN V, MAUME BF, MILAT ML, PONCHET M, MIKES V, KADER JC, BLEIN JP. A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS Lett* 2001; **509**: 27–30.
- [12] BUHOT N, GOMES E, MILAT ML, PONCHET M, MARION D, LEQUEU J, DELROT S, COUTOS-THEVENOT P, BLEIN JP. Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 5047–5052.
- [13] CAMERON KD, TEECE MA, SMART LB. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves and tree tobacco. *Plant Physiol* 2006; **140**: 176–183.
- [14] CASTRO MS, GERHARDT IR, ORRU S, PUCCI P, BŁOCH CJR. Purification and characterization of a small (7.3 kDa) putative lipid transfer protein from maize seeds. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; **794**: 109–114.
- [15] CHARVOLIN D, DOULIEZ JP, MARION D, COHEN-ADDAD C, PEBAY-PEYROULA E. The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. *Eur J Biochem* 1999; **264**: 562–568.
- [16] CLARK AM, BOHNERT HJ. Cell-specific expression of genes of the lipid transfer protein family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 1999; **119**: 765–774.
- [17] CONTI A, FORTUNATO D, ORTOLANI C, GIUFFRIDA MG, PRAVETTONI V, NAPOLITANO L, FARIOLI L, PERONO GAROFFO L, TRAMBAIOLI C, PASTORELLO EA. Determination of the primary structure of two lipid transfer proteins from apricot (*Prunus armeniaca*). *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; **756**: 123–129.
- [18] CRIMI M, ATEGNO A, ZOCCATELLI G, DEGLI ESPOSTI M. Pro-apoptotic effect of maize lipid transfer protein on mammalian mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 2006; **311**: 460–468.
- [19] DA SILVA, LANDON C, INDUSTRI B, MARAIS A, MARION D, PONCHET M, VOVELLE F. Solution structure of a tobacco lipid transfer protein exhibiting new biophysical and biological features. *Proteins* 2005; **59**: 356–367.
- [20] DEGLI ESPOSTI M. Sequence and functional similarities between pro-apoptotic Bid and plant lipid transfer proteins. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1553**: 331–340.
- [21] DIZ MSS, CARVALHO AO, GOMES VM. Purification and molecular mass determination of a lipid transfer protein exuded from *Vigna unguiculata* seeds. *J Plant Physiol* 2003; **15**: 171–175.
- [22] DOULIEZ JP, MICHON T, ELMORJANI K, MARION D. Structure, biological and technological functions of lipid transfer protein and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J Cereal Sci* 2000; **32**: 1–20.
- [23] DOULIEZ JP, MICHON T, ELMORJANI K, MARION D. Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1). *Biochim Biophys Acta* 2000; **1467**: 65–72.
- [24] DOULIEZ JP, JEGOU S, PATO C, MOLLE D, TRAN V, MARION D. Binding of two mono-acylated lipid monomers by the barley lipid transfer protein, LTP1, as viewed by fluorescence, isothermal titration calorimetry and molecular modeling. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 384–388.
- [25] DOULIEZ JP. Cutin and suberin monomers are membrane perturbants. *J Colloid Interface Sci* 2004; **271**: 507–510.
- [26] DUBOIS L, DA SILVA P, LANDON C, HUBER JG, PONCHET M, VOVELLE F, BERTHAULT P, DESVAUX H. Probing the hydrophobic cavity of lipid transfer protein from *Nicotiana tabacum* through xenon-based NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 2004; **126**: 15738–15746.
- [27] EDQVIST J, FARBOS I. Characterization of germination-specific lipid transfer proteins from *Euphorbia lagascae*. *Planta* 2002; **215**: 41–50.
- [28] EKLUND DM, EDQVIST J. Localization of nonspecific lipid transfer proteins correlate with programmed cell death responses during endosperm degradation in *Euphorbia lagascae* seedlings. *Plant Physiol* 2003; **132**: 1249–1259.
- [29] ENRIQUE E, UTZ M, DE MATEO JA, CASTELLO JV, MALEK T, PINEDA F. Allergy to lipid transfer proteins: cross-reactivity among pomegranate, hazelnut and peanut. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; **96**: 122–123.
- [30] FABRITIUS AL, CVITANICH C, JUDELSON HS. Stage-specific gene expression during sexual development in *Phytophthora infestans*. *Mol Microbiol* 2002; **45**: 1057–1066.

- [31] FEDERICO M, KAEPLER HF, SKADSEN RW. The complex developmental expression of a novel stress-responsive barley *Ltp* gene is determined by a shortened promoter sequence. *Plant Mol Biol* 2005; **57**: 35–51.
- [32] GE X, CHEN J, LI N, LIN Y, SUN C, CAO K. Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. *J Biochem Mol Biol* 2003; **36**: 603–607.
- [33] GOMČS E, SAGOT E, GAILLARD C, LAQUITQINE L, POINSSOT B, SANEJOUAND Y-H, DEIROT S, COUTOS-THÈVENOT P. Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cell in response to fungal elicitor treatments. *MPMI* 2003; **16**: 456–464.
- [34] GONORAZKY AG, REGENTE MC, DE LA CANAL L. Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. *J Plant Physiol* 2005; **162**: 618–624.
- [35] GORJANOVIĆ S, SUŽNJEVIĆ D, BELJANSKI M, HRANISAVLJEVIĆ J. Barley lipid-transfer protein as heavy metal scavenger. *Environ Chem Lett* 2004; **2**: 113–116.
- [36] GORJANOVIĆ S, SUŽNJEVIĆ D, BELJANSKI M, OSTOJIĆ S, GORJANOVIĆ R, VRVIĆ M, HRANISAVLJEVIĆ J. Effects of lipid-transfer protein from malting barley grain on brewers yeast fermentation. *J Inst Brew* 2004; **110**: 297–302.
- [37] GUERBETTE F, GROSBOIS M, JOLLIOT-CROQUIN A, KADER JC, ZACHOWSKI A. Lipid-transfer proteins from plants: structure and binding properties. *Mol Cell Biochem* 1999; **192**: 157–161.
- [38] GUIDERDONI E, CORDERO MJ, VIGNOLS F, GARCIA-GARRIDO JM, LESCOT M, THARREAU D, MEYNARD D, FERRIERE N, NOTTEGHEM JL, DELSENY M. Inducibility by pathogen attack and developmental regulation of the rice *Ltp1* gene. *Plant Mol Biol* 2002; **49**: 683–699.
- [39] GWÓŹDŹ EA. Odporność na czynniki abiotyczne. *Biotechnologia roślin. Praca zbiorowa pod redakcją Stefana Malepszego* 2001: 375–391.
- [40] HAMILTON JA. Fatty acid interactions with proteins: what X-ray crystal and NMR solution structure tell us. *Prog Lipid Res* 2004; **43**: 177–199.
- [41] HAN GW, LEE JY, SONG HK, CHANG C, MIN K, MOON J. Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *J Mol Biol* 2002; **308**: 263–278.
- [42] HEINEMANN B, ANDERSEN KV, NIELSEN PR, BECH LM, POULSEN FM. Structure in solution of a four-helix lipid binding protein. *Protein Sci* 1996; **5**: 565–577.
- [43] HINCHA DK, NEUKAMM B, SROR HAM, SIEG F, WECKWARTH W, RÜCKELS M, LULLIENPELLERIN V, SCHRÖDER W, SCHMITT JM. Cabbage cryoprotectin is a member of the nonspecific plant lipid transfer protein gene family. *Plant Physiol* 2001; **125**: 835–846.
- [44] HINCHA DK. Cryoprotectin: a plant lipid transfer protein homologue that stabilizes membranes during freezing. *Philosophical Transactions of the Royal Society (London): Biol Sci* 2002; **357**: 909–916.
- [45] HOFFMANN-SOMMERGRUBER K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**: 930–935
- [46] HOH F, PONS J-L, GAUTIER M-F, DE LAMOTTE F, DUMAS C. Structure of a liganded type 2 non-specific lipid-transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2005; **61**: 397–406.
- [47] HORVATH B, BACHEM C, TRINDADE L, VISSER R. Expression analysis of a family of ns-LTP genes tissue specifically expressed throughout the plant and during tuber life cycle1. *Am Soc Plant Physiol* 2002; **129**: 1494–1506.
- [48] JONES BL, MARINAC LA. Purification and partial characterization of a second cysteine proteinase inhibitor from ungerminated barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Agric Food Chem* 2000; **48**: 257–264.
- [49] JUNG HW, HWANG BK. Isolation, partial sequencing, and expression of pathogenesis-related cDNA genes from pepper leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Plant-Microbe Interactions* 2000; **13**: 136–142.
- [50] JUNG HK, KIM KB, HWANG BK. Identification of pathogen-responsive regions in the promoter of pepper lipid transfer protein gene (*CALTP1*) and the enhanced resistance of the *CALTP1* transgenic *Arabidopsis* against pathogen and environmental stresses. *Planta* 2005; **221**: 361–373.
- [51] KADER JC. Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant protein. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 66–70.
- [52] KERESZTESSY Z, HUGHES MA. Homology modeling and molecular dynamics aided analysis of ligand complexes demonstrates functional properties of lipid-transfer proteins encoded by the barley low-temperature inducible gene family, *blt4*. *Plant J* 1998; **14**: 523–533.
- [53] LERCHE MH, KRAGELUND BB, BECH LM, POULSEN FM. Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. *Structure* 1997; **5**: 291–306.

- [54] LHERMINIER J, BENHAMOU N, LARRUE M-L, BOUDON-PADIEU E, NICOLE M, BLEIN J-P. Cytological characterization of elicitin-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or *Phytoplasma*. *Am Phytopathol Soc* 2003; **93**: 1308–1319.
- [55] LIN KF, LIU YN, SAMUEL D, CHENG CS, BONVIN AM, LYU PC. Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean. *Biochemistry* 2005; **44**: 5703–5712.
- [56] LINDORFF-LARSEN K, WINTHER JR. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Lett* 2001; **488**: 145–148.
- [57] LIU H, XUE L, LI C, ZHANG R, LING Q. Calmodulin-binding protein BP-10, a probable new member of plant nonspecific lipid transfer protein superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **285**: 633–638.
- [58] LIU YJ, SAMUEL D, LIN CH, LYU PC. Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **294**: 535–540.
- [59] LIU KH, LIN TY. Cloning and characterization of two novel lipid transfer protein I genes in *Vigna radiata*. *DNA Seq* 2003; **14**: 420–426.
- [60] LOMBARDELO M, GARCIA-SELLES FJ, POLO F, JIMENO L, CHAMORRO MJ, GARCIA-CASADO G, SANCHEZ-MONGE R, DIAZ-PERALES A, SALCEDO G, BARBER D. Prevalence of sensitization to Artemisia allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa. Cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. *Clin Exp Allergy* 2004; **34**: 1415–1421.
- [61] MADEY E, NOWACK LM, SU L, HONG Y, HUDAK KA, THOMPSON JE. Characterization of plasma membrane domains enriched in lipid metabolites. *J Exp Bot* 2001; **52**: 669–679.
- [62] MALDONADO AM, DOERNER P, DIXON RA, LAMB CHJ, CAMERON RK. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in *Arabidopsis*. *Nature* 2002; **419**: 399–403.
- [63] MARION D, DOULIEZ JP, GAUTIER M-F, ELMORJANI K. Plant lipid transfer proteins relationships between allergenicity and structural, biological and technological properties. *Plant Food Allergy* 2004; **57**–69.
- [64] MOREAU P. Lipid trafficking in plant cell. *Prog Lipid Res* 1998; **37**: 371–391.
- [65] NESPOULOUS C, GAUDEMER O, HUET JC, PERNOLLET JC. Characterization of elicitin-like phospholipases isolated from *Phytophthora capsici* culture filtrate. *FEBS Lett* 1999; **452**: 400–406.
- [66] OSMAN H, MIKES V, MILAT ML, PONCHET M, MARION D, PRANGE T, MAUME BF, VAUTHRIN S, BLEIN JP. Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS Lett* 2001a; **489**: 55–58.
- [67] OSMAN H, VAUTHRIN S, MIKES ML, PANABIERES F, MARAIS A, BRUNIE S, MAUME B, PONCHET M, BLEIN JP. Mediation of elicitin activity on tobacco is assumed by elicitin-sterol complexes. *Mol Biol Cell* 2001b; **12**: 2825–2834.
- [68] QUTOB D, HUITEMA E, GIJZEN M, KAMOUN S. Variation in structure and activity among elicitins from *Phytophthora sojae*. *Mol Plant Pathology* 2003; **4**: 119–124.
- [69] PARK C-J, SHIN R, PARK JM, YOU J-M, PAEK K-H. Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol Biol* 2002; **48**: 243–254.
- [70] PASQUATO N, BERNI R, FOLLI C, FOLLONI S, CIANCIM, PANTANO S, HELLIWELL JR, ZANOTTI G. Crystal Structure of Peach Pru p 3, the Prototypic Member of the Family of Plant Non-specific Lipid Transfer Protein Pan-allergens. *J Mol Biol* 2006; **356**: 684–694.
- [71] PATO C, LE BORGNE M, LE BAUT G, LE PAPE P, MARION D, DOULIEZ JP. Potential application of plant lipid transfer proteins for drug delivery. *Biochem Pharmacol* 2001; **62**: 555–560.
- [72] PEARCE RS, HOULSTON CE, ATHERTON KM, RIXON JE, HARRISON P, HUGHES MA, DUNN MA. Localization of expression of three cold-induced genes, *blt101*, *blt4.9* and *blt14*, in different tissues of the crown and developing leaves of cold-acclimated cultivated barley. *Plant Physiol* 1998; **117**: 787–795.
- [73] PICCARD K, PONCHET M, BLEIN J-P, REY P, TIRILLY Y, BENHAMOU N. Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiol* 2000; **124**: 379–395.
- [74] PONCHET M. Are elicitins cryptograms in plant-fungi communication? A review of the plant and cell responses to elicitins treatments and analysis of signal involved. *Cell Mol Life Sci* 1999; **56**: 1020–1047.
- [75] POZNANSKI J, SODANO P, SUH SW, LEE JY, PTAK M, VOVELLE F. Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds. Comparison with homologous proteins. *Eur J Biochem* 1999; **259**: 692–708.
- [76] VAN REE R. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**: 910–913.

- [77] REGENTE MC, DE LA CANAL L. A cDNA encoding a putative lipid transfer protein expressed in sunflower seeds. *J Plant Physiol* 2003; **160**: 201–203.
- [78] REP M, DEKKER HL, VOSSSEN JH, DE BOER AD, HOUTERMAN PM, DE KOSTER CG, CORNELISSEN BJ. A tomato xylem sap protein represents a new family of small cysteine-rich proteins with structural similarity to lipid transfer proteins. *FEBS Lett* 2003; **534**: 82–86.
- [79] ROMO S, LABRADOR E, DOPICO B. Water stress-regulated gene expression in *Cicer arietinum* seedlings and plants. *Plant Physiol Biochem* 2001; **39**: 1017–1026.
- [80] SAMUEL D, LIU Y-J, CHENG CH-S, LYU P-CH. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J Biol Chem* 2002; **277**: 35267–35273.
- [81] SHA B, PHILIPS SE, BANKAITIS VA, LUO M. Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature* 1998; **391**: 506–510.
- [82] SODANO P, CAILLE A, SY D, DE PERSON G, MARION D, PTAK M. <sup>1</sup>H-NMR and fluorescence studies of the complexation of DMPG by wheat non-specific lipid transfer protein. Global fold of the complex. *FEBS Lett* 1997; **416**: 130–134.
- [83] SOHAL AK, PALLAS JA, JENKINS GI. The promoter of *Brassica napus* lipid transfer protein gene is active in a range of tissues and stimulated by light and viral infection in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 1999; **41**: 75–87.
- [84] SONG JY, CHOI D-W, LEE JS, KWON YM, KIM S-G. Cortical tissue-specific accumulation of the root-specific ns-LTP transcripts in the bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings. *Plant Mol Biol* 1998; **38**: 735–742.
- [85] SROR HAM, TISCHENDORF G, SIEG F, SCHMITT JM, HINCHA DK. Cryoprotectin protects thylakoids during a freeze-thaw cycle by a mechanism involving stable membrane binding. *Cryobiology* 2003; **47**: 191–203.
- [86] STERK P, BOOIJ H, SCHELLEKENS GA, VAN KAMMEN A, DE VRIES SC. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 1991; **3**: 907–921.
- [87] STULNIG TM, HUBER J, LEITINGER N, IMRE EM, ANGELISOVA P, NOWOTNY P, WALDHAUSL W. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37335–37340.
- [88] SY D, GRAVIER Y, GOODFELLOW J, VOVELLE F. Protein stability and plasticity of the hydrophobic cavity in wheat ns-LTP. *J Biomol Struct Dyn* 2003; **21**: 15–29.
- [89] TRAILD-HOFFMANN C, KASCHE A, MENZEL A, JAKOB T, THIEL M, RING J, BEHRENDT H. Impact of pollen on human health: more than allergen carriers? *Int Arch Allergy Immunol* 2003; **131**: 1–13.
- [90] TREVINO MB, O'CONNELL MA. Three drought-responsive members of the nonspecific lipid-transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different developmental patterns of expression. *Plant Physiol* 1998; **116**: 1461–1468.
- [91] TSUBOI S, OSAFUNE T, NISHIMURA M, YAMADA M. Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: Subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. *J Biochem (Tokyo)* 1992; **111**: 500–508.
- [92] VAN LOON LC, VAN STERIEEN EA. The family of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR1-type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 1999; **55**: 85–97.
- [93] VAUTHRIN S, MIKES V, MILAT ML, PONCHET M, MAUME B, OSMAN H, BLEIN JP. Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1419**: 335–342.
- [94] VEGA-MARAY AM, FERNANDEZ-GONZALEZ D, VALENCIA-BARRERA R, POLO F, SEOANE-CAMBA JA, SUDREZ-CERVERA M. Lipid transfer proteins in *Parietaria judaica* L. pollen grains: immunocytochemical localization and function. *Eur J Cell Biol* 2004; **83**: 493–497.
- [95] WANG SY, WU JH, NG TB, YE XY, RAO PF. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides* 2004; **25**: 1235–1242.
- [96] WANG Z, XIE W, CHI F, LI C. Identification of non-specific lipid transfer protein-1 as a calmodulin-binding protein in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 2005; **579**: 1683–1687.
- [97] WEST G, NYMALM Y, AIRENNE T, KIDRON H, MATTJUS P, SALMINEN TT. Crystallization and X-ray analysis of bovine glycolipid transfer protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004; **60**: 703–705.
- [98] WU G, ROBERTSON AJ, LIU X, ZHENG P, WILEN RW, NESBITT NT, GUSTA LV. A lipid transfer protein gene *BG-14* is differentially regulated by abiotic stresses, ABA, anisomycin, and sphingosine in brome grass (*Bromus inermis*). *J Plant Physiol* 2004; **161**: 449–458.

- [99] YUBERO-SERRANO EM, MOYANO E, MEDINA-ESCOBAR N, MUNOZ-BLANCO J, CABALLERO JL. Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *J Exp Bot* 2003; **54**: 1865–1877.
- [100] ZUIDMEER L, VAN LEEUWEN WA, BUDDE IK, CORNELISSEN J, BULDER I, RAFALSKA I, BESOLI NT, AKKERDAAS JH, ASERO R, RIVAS MF, MANCEBO EG, VAN REE R. Lipid transfer proteins from fruit: cloning, expression and quantification. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; **137**: 273–281.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 09.02. 2006 r.*

*Przyjęto: 10.05. 3006 r.*

*ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań*

*e-mail: akie@igr.poznan.pl*