

## INHIBITORY PROTEAS, MECHANISMY ÚČINKU A PERSPEKTIVY JEJICH VYUŽITÍ V TRANSGENOZI ROSTLIN

MAREK HRAŠKA<sup>a,b</sup>, SLAVOMÍR RAKOUSKÝ<sup>a,c</sup>  
a VLADISLAV ČURN<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra genetiky, Biologická fakulta, <sup>b</sup>Biotechnologické centrum, Zemědělské fakulta a <sup>c</sup>Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice  
mhraska@seznam.cz

Došlo 11.7.05, přijato 9.12.05.

Klíčová slova: inhibitory proteas, ochrana rostlin, transgenní rostliny

### Obsah

1. Úvod
2. Integrovaná ochrana rostlin
3. Transgenní rostliny odolné vůči biotickým stresům
4. Inhibitory proteas
  - 4.1.1. Inhibitory serinových proteas
  - 4.1.2. Inhibitory cysteinových proteas
  - 4.1.3. Inhibitory aspartátových proteas a metalo-proteas
- 4.2. Mechanismus toxického působení na hmyz
- 4.3. Regulace inhibitorů proteas
- 4.4. Transgenní rostliny exprimující inhibitory proteas
5. Závěr

### 1. Úvod

Celosvětová populace se stále rozrůstá, na přelomu tisíciletí dosáhla hranice 6 mld obyvatel a odhady pro rok 2025 mluví již o 8,5 mld. Tento trend klade také stále vyšší nároky na zemědělství, a to nejen co se týče objemu produkce, ale také její kvality. Zemědělství však může vycházet pouze z omezených zdrojů. Podle údajů Světové banky činila průměrná plocha obdělávané zemědělské půdy v roce 1961 0,44 ha na obyvatele planety, v roce 2002 klesla na 0,26 ha a výhled pro rok 2050 hovoří o pouhých 0,15 ha (cit.<sup>1</sup>). Zemědělství a šlechtění tedy stojí před nelehkým úkolem nasycit neustále rostoucí množství lidí ze stále se zmenšujících zdrojů.

Klasické šlechtění sice zaznamenalo během uplynulých desetiletí řady pokroků, přesto se již v současnosti přiblížilo hranici svých možností, neboť u řady plodin bylo dosaženo hranice biologického výnosu. Naopak nové poznatky genetiky a molekulární biologie nabízejí zcela nové

možnosti v tvorbě nových, tzv. geneticky upravených nebo-li transgenních odrůd zemědělských plodin. Přímé šlechtění na výnos je kvůli charakteru komplikovaného genetického založení tohoto znaku v současnosti stále ještě obtížné, ale existuje celá řada možností, jak ovlivňovat znaky a vlastnosti mající na konečný výnos a kvalitu rostlinné produkce významný vliv. Jedná se např. o kvalitativní změny spektra aminokyselin a bílkovin, vlastnosti umožňující jednodušší a levnější pěstování, zvyšování odolnosti rostlin vůči suchu, mrazu či zasolení půd. Významným činitelem je odolnost rostlin vůči biotickým stresům. Ztráty a poškození způsobené různými škůdci, houbovými, bakteriálními a virovými chorobami silně zatěžují ekonomiku rostlinné výroby<sup>1,2</sup>. Ochrana rostlin má kromě přímého vlivu na výši produkce také vliv na rentabilitu pěstování a zdravotní nezávadnost potravin či krmiv.

### 2. Integrovaná ochrana rostlin

Integrovaná ochrana rostlin představuje moderní trend v boji proti chorobám a škůdcům, jejíž součástí je i tvorba rezistentních odrůd. Možnosti klasického šlechtění jsou však značně omezené, zejména v případech, kdy je rezistence založena kvantitativně, geny rezistence jsou lokalizovány na více lokusech a často ještě nejsou identifikovány. Šlechtitelský pokrok je proto velice zdoluhavý a neodpovídá poměrně rychle se měnícím potřebám pěstitelů. Velmi perspektivní alternativu v podobě možnosti záměrného vnesení genů kvalitativního charakteru představují techniky rekombinantní DNA – transgenozy. Z širokého okruhu rostlinných škůdců je hlavním předmětem zájmu hmyz, neboť se jedná o nejpočetnější skupinu škůdců v zemědělství. Transgenozy umožňuje již nyní poměrně vysoce specificky vymezit okruh cílových skupin hmyzu, na něž technologie (genový produkt) přednostně působí, zatímco jiné zůstávají prakticky nedotčeny. Názorným příkladem jsou rostliny s vnesenými geny pro  $\delta$  (delta)-endotoxin *Bacillus thuringiensis*, které již dosáhly značného rozšíření v zemědělské praxi (např. tzv. *Bt*-kukuřice, *Bt*-bavlník). Navíc využitím vhodných promotorů, vymezujících místo a dobu projevu vloženého genu v rostlině jakož i míru jeho exprese, je potenciální rizikovitost modifikovaných plodin dále výrazně snížena. K výčtu pozitiv dané technologie je třeba uvést i snížení zátěže životního prostředí v důsledku omezení či úplné absence postřiků insekticidními přípravky. Hmyz je často také přímým vektorem dalších onemocnění, či jím svým působením otevírá a ulehčuje cestu do rostlinného těla<sup>3</sup>. Nepřímo je tak ovlivněna kvalita rostlinné produkce a potravin z ní vyrobených. Např. v případě *Bt*-kukuřice bylo již nezvratně prokázáno, že její zrna obsahují až o 60 % méně kancerogenních mykotoxinů než běžná kukuřice, u které jsou hmyzem

poškozená zrna napadána houbami<sup>4</sup>.

Během evoluce se u rostlin vyvinula řada obranných mechanismů vůči škodlivým organismům. Většina jich je soustředěna do semen a jsou aktivovány konstitutivně nebo indukovaně po napadení či onemocnění. Jedná se převážně o látky bílkovinné povahy. Nejznámější rostlinám vlastní obranné proteiny jsou lektiny, ribosomy inaktivující proteiny, inhibitory proteolytických enzymů, glykosidasy, chitinasy či arcelininy<sup>1</sup>. Rostliny jsou v neustálém kontaktu s okolím a jejich vztahy se škodlivými činiteli se neustále vyvíjejí a mění. Obranné bariéry rostlin jsou časem překonány a je třeba vyvinout si nový způsob ochrany, který je opět posléze překonán.

### 3. Transgenní rostliny odolné vůči biotickým stresům

Rostliny vytvořené postupy genového inženýrství, označované jako geneticky modifikované vyšší rostliny (GMVR), představují kvalitativně nový příspěvek do mozaiky integrované ochrany rostlin<sup>5</sup>. GMVR mohou efektivně nahradit, a výzkum a praxe potvrzují, že skutečně nahrazují, konvenčně používané agrochemikálie. Nicméně i v této oblasti vyvstávají otázky možného negativního vlivu v důsledku dané genetické modifikace. Konkrétně se jedná o možnost zrychlení selekce rezistentních populací škůdců či ras patogenních hub<sup>6</sup>. K výraznému omezení těchto rizik u hmyzu byly již vyvinuty a do praxe zavedeny účinné strategie využívající tzv. refugií, kdy na polích vedle odolných GMVR plodin musí být současně pěstován i určitý podíl běžných (citlivých) odrůd, které udržují dostatečnou zásobu citlivých forem hmyzu. Ty se pak kříží s ojediněle se vyskytujícími odolnými jedinci z „transgenních“ polí. Jejich potomstvo je obvykle opět náchylné a tak je oddálen nástup rezistentních forem hmyzu<sup>6</sup>.

Ochrana plodin vůči biotickým stresům je jedním z hlavních objektů zájmu transgenozy rostlin a v současnosti představuje velmi intenzivně řešenou problematiku. Získat či vytvořit transgenní plodinu však vyžaduje splnění několika základních požadavků jako jsou:

- existence vhodného cílového genomu,
- dostatečná charakterizace kandidátského genu a existence vektoru pro jeho vnesení,
- existence postupů pro kultivace explantátových kultur daného objektu a účinný regenerační systém,
- možnost modifikovat cizí gen a zvyšovat či usměrňovat tím jeho expresi,
- identifikace a selekce transformovaných (transgenních) buněk,
- charakterizace potenciálně transformovaných rostlin na molekulární úrovni.

Pokud jsou tyto požadavky jednou splněny, stává se produkce transgenních plodin nesoucích rozličné nové geny takřka rutinní záležitostí. V minulosti byly vypracovány postupy pro transformaci řady modelových i kultur-

ních rostlin<sup>3</sup>. Zavedení transgenní odrůdy do praxe předchází splnění celé řady dalších náročných kritérií<sup>7</sup>.

Do dnešního dne bylo vyvinuto mnoho postupů, jak vpravit cizorodou DNA do rostlinného genomu. Zdaleka nejrozšířenější jsou však dva okruhy postupů, a to přímá transformace nukleovou kyselinou a transgenozy pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. V prvním případě je plasmidová DNA nesoucí požadované geny nanášena na částičky inertního kovu (nejčastěji zlato či wolfram) a pomocí různých vysokotlakých zařízení je „vstřelována“ do cílové tkáně či shluku buněk<sup>8</sup>. Druhý způsob spočívá ve využití přirozeného jevu, kdy bakterie *A. tumefaciens* je sama o sobě schopna vnést část své DNA (tzv. T-DNA – transferred DNA) nesené na plasmidu Ti (tumor inducing) do rostlinného genomu<sup>9</sup>. Metodami molekulární biologie je možno poměrně snadno tuto T-DNA upravovat a vnášet tak do rostliny různé geny.

První transgenní rostliny tabáku byly získány v roce 1984 a od té doby byly získány transgenní rostliny od více než 100 dalších druhů. Z nich nejúspěšnější se dočkaly uvedení do pěstitelské praxe. Pro představu o rozvoji pěstitelských ploch GMVR odrůd, první transgenní plodiny začaly být velkoplošně pěstovány v r. 1996, v roce 2000 plocha pěstovaných GMVR plodin dosahovala 44,2 mil ha (cit.<sup>4</sup>) a v r. 2004 již 66,7 mil ha. Odhady pro letošní rok předpokládají až 88 mil ha (zdroj ISAAA 2004, cit.<sup>7</sup>). Co se týče plodin odolných proti hmyzu, největšího rozšíření se dočkaly rostliny exprimující gen pro  $\delta$ -endotoxin z bakterie *B. thuringiensis*. Osevní plochy těchto *Bt*-plodin celosvětově neustále rostou, nicméně výzkum rezistence neustrnul pouze na tomto jednom úspěšném typu a pokračuje i jinými směry. Mnoho dalších genových produktů ovlivňuje výživu a fyziologii škůdců a jsou tedy potenciálně využitelné pro transgenozu rostlin. Předmětem zájmu jsou jak rostlinám vlastní látky (inhibitory proteas, chitinasy, různé sekundární metabolity či lektiny), tak i látky bakteriálního původu či odvozené od genové výbavy vyšších živočichů. Právě inhibitory proteas různého původu jsou intenzivně zkoumanou skupinou potenciálně insekticidních či antifungálních látek<sup>1</sup>.

### 4. Inhibitory proteas

Proteolytické enzymy katalyzují štěpení molekuly bílkoviny na menší řetězce a posléze až na jednotlivé aminokyseliny. Rozlišují se čtyři hlavní skupiny proteas: serinové proteasy obsahující v aktivním centru aminokyselinu serin, cysteinové obsahující cystein, aspartátové se začleněným zbytkem kyselina asparagové a metaloproteasy obsahující ve svém aktivním centru kovové ionty  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  či  $Mn^{2+}$  (cit.<sup>1</sup>).

Proteolýza je klíčový proces všech živých organismů, a proto musí být přesně regulována. Nepřekvapí tedy existence přirozeně se vyskytujících inhibitorů proteas (PI) různého původu, které se klasifikují podle cílových enzymů, které inhibují.

V rostlinách zastávají PI různé funkce, např. v zásob-

ních orgánech či při regulaci proteolytické aktivity. Podílejí se také na regulaci mnoha vývojových procesů včetně programované buněčné smrti a v neposlední řadě tvoří významnou složku obranných mechanismů rostlin vůči hmyzu a patogenům. V rostlinách se často vyskytují v překvapivě vysokých koncentracích<sup>10</sup>. Syntetizovány jsou buď konstitutivně nebo jako odpověď na právě vzniklé poškození či probíhající napadení<sup>1</sup>.

První náznaky poukazující na možnou roli PI v obraně rostlin se objevily již v roce 1947. Mickel a Standish<sup>11</sup> pozorovali, že pokud jsou larvy rozličného hmyzu udržovány na extraktech sóji, tak ztrácejí schopnost normálního vývoje. Posléze byl prokázán toxický efekt inhibitoru trypsinu sóji na larvy brouka *Tribolium confusum*. Poté byla identifikována celá řada podobných látek, jejichž insekticidní účinky byly prokázány jak v *in vitro* testech na střevních enzimech hmyzu, tak i *in vivo* na živém hmyzu<sup>2</sup>.

Z metodického hlediska skýtají geny kódující PI jednu významnou výhodu. Lze je poměrně jednoduše přenášet z jednoho rostlinného (či živočišného) druhu do druhého a docílit jejich exprese v nové rostlině za použití jejich již stávajících regulačních mechanismů, či pod kontrolou souběžně vnesených promotorů. Tímto způsobem Hilder a spol.<sup>12</sup> v roce 1987 transformovali tabák genem pro inhibitor trypsinu z bobovité rostliny vigny a navodili tak jeho zvýšenou odolnost vůči širokému spektru hmyzích škůdců. Doposud nebyl potvrzen negativní účinek nového genového produktu na vyšší organismy. Někteří autoři se dokonce domnívají, že vzhledem ke svému charakteru (jsou bohaté na lysin a cystein) mohou PI zlepšovat nutriční hodnotu rostlin<sup>13</sup>.

PI vykazují velmi široké spektrum inhibiční aktivity vůči mnoha organismům, jako např. hádčákům, jsou rovněž schopny potlačit zrání spor a růst mycelia některých houbových patogenů. Všechny tyto vlastnosti představují PI jako vhodnou skupinu látek využitelnou pro tvorbu transgenních odrůd polních plodin. Navíc transformace rostlin geny pro PI není zajímavá pouze z pohledu produkce odolných rostlin jako takových, ale i z pohledu využití rostlin jako „továren“ vyrábějících inhibiční proteiny využitelné i pro jiné účely v ostatních oblastech lidské činnosti<sup>2</sup>.

#### 4.1.1. Inhibitory serinových proteas

Role PI serinových proteas jako defenzivní složky ochrany rostlin je již poměrně dlouho známa. Serinové proteasy nejsou ve větším množství využívány v procesech primárního metabolismu a tudíž přítomnost velkého množství inhibitorů právě těchto enzymů vylučuje jejich jakoukoli roli v regulaci vnitřních pochodů rostlin. Inhibitory serinových proteas byly popsány v mnoha rostlinných druzích a rostlinné PI vykazují určitou podobnost. Nejvíce prozkoumanou skupinou jsou inhibitory trypsinu. Poměrně snadná dostupnost trypsinu a snadné měření jeho katalytické aktivity vedly k tomu, že PI serinových proteas se staly předmětem mnohem intenzivnějšího zkoumání než další zástupci PI, nicméně získané poznatky jsou úspěšně aplikovatelné nejen na celou skupinu PI serinových proteas,

ale i na ostatní třídy PI. Všechny inhibitory výše zmíněné skupiny jsou kompetitivní inhibitory.

Serinové proteasy byly nalezeny v zaživacím traktu mnohých zástupců hmyzu, zejména řádu motýlů *Lepidoptera*, který zahrnuje celou řadu významných škůdců rostlin. Mnoho těchto trávicích proteolytických enzymů je ovlivňováno právě PI serinových proteas, jejichž optimální pH prostředí 9–11 koresponduje s obvyklým pH střevního traktu řady zástupců *Lepidoptera*. Antinutriční účinek byl demonstrován celou řadou pokusů<sup>2</sup>.

#### 4.1.2. Inhibitory cysteinových proteas

Při izolacích střevních proteas z larev hmyzu zavíječe *Callosobruchus macalatus* a mšice *Zabrotes subfaceatus* byla odhalena, mimo jiné, též přítomnost cysteinových proteas. Podobné proteasy byly izolovány také ze střev několika dalších hmyzích druhů. Všechny byly inhibovány jak syntetickými, tak i přirozeně se vyskytujícími PI a jejich příslušnost k dané třídě byla posléze potvrzena řadou testů. Optimální pH cysteinových proteas je v neutrální až mírně kyselé oblasti (pH 5–7).

Pokročilými postupy enzymologie posledních let byla identifikována celá řada inhibitorů proteas, jako např. alpin. PI cysteinových proteas byly popsány v řadě rostlinných druhů, např. u bramboru, vigny, avokáda či papáji. Nejvíce prostudovaný je PI pocházející z rýže, tzv. oryzacystatin.

#### 4.1.3. Inhibitory aspartátových proteas a metaloproteas

Znalosti o této skupině enzymů u hmyzu jsou ve srovnání se dvěma předešlými nesrovnatelně menší. Aspartátové proteasy byly nalezeny spolu s cysteinovými u šesti zástupců skupiny ploštic *Hemiptera*. Nízké pH střevního prostředí zástupců skupin brouků *Coleoptera* a *Hemiptera* představuje mnohem vhodnější podmínky pro aspartátové proteasy než vysoké pH (8–11) střev většiny ostatních druhů. V silně zásaditém prostředí ztrácejí svou aktivitu. U rostlin byly doposud charakterizovány dvě skupiny PI metaloproteas, rodina PI metalo-karboxypeptidas z bramboru a rajčat a skupina cathepsin D PI brambor.

### 4.2. Mechanismus toxického působení PI na hmyz

Přesný způsob, jakým PI pracují, je stále předmětem intenzivního výzkumu. Získané znalosti o projevech a regulaci inhibitorů pocházejících z rostlin, živočichů, mikroorganismů, ale i třeba z virů, přispěly k vývoji či modifikaci celé řady postupů v medicíně či zemědělství, využívajících právě PI.

Obecně lze konstatovat, že sekrece proteolytických enzymů ve střevě hmyzu je ovlivňována spíše obsahem bílkovin v přijímané potravě, než jejím celkovým množstvím<sup>14</sup>. Sekrece proteas je indukována dvěma odlišnými cestami. Jedná se o přímé působení složek potravy (hlavně bílkovin) na epiteliální buňky střeva hmyzu nebo o hormonální regulaci iniciovanou příjmem potravy. Modelové studie odhalily, že příjem potravy stimuluje syntézu

a sekreci trávicích enzymů z epiteliálních buněk zadní části středního střeva. Enzymy jsou pak uvolněny z membránově asociovaných komplexů a následně odděleny v podobě váčků, které jsou postupně spojovány s cytoskeletem. Peptidasy jsou vyloučeny do ekto-peritrofitického prostoru v epitelu, ze kterého prostupují transversálně do středního lumen. Zde pak degradují bílkoviny stravy. PI inhibují proteasovou aktivitu těchto trávicích enzymů a snižují tak množství proteinu, které může být stráveno. Inhibice proteas zároveň vede k nadprodukcii trávicích enzymů, což má za následek vyčerpání rezerv sirných aminokyselin. V krajním případě je výsledkem všech těchto pochodů oslabení hmyzu, jeho omezený vývoj a často smrt<sup>2</sup>.

Trávicí proteolytické enzymy různých řádů hmyzu většinou náležejí k některé z hlavních skupin proteas. Zástupci skupin *Coleoptera* a *Hemiptera* vykazují přítomnost převážně cysteinových proteas, zatímco příslušníci motýlů *Lepidoptera*, blanokřídlých *Hymenoptera*, „kobylek“ *Orthoptera* a dvoukřídlých *Diptera* využívají spíše serinových enzymů. Účinek PI na hmyz nemusí být vždy inhibice proteolytické aktivity. Nedávné studie prokázaly, že může také dojít ke vzniku zpětné vazby. Cílový hmyz totiž často disponuje dvěma či více odlišnými skupinami trávicích enzymů. Jedny mohou být k inhibitorům citlivé, jiné naopak ne. Výsledkem působení PI na jedince disponujícího takovouto enzymovou výbavou pak může být přednostní produkce PI-rezistentních proteolytických enzymů<sup>15,16</sup>.

Způsob, jakým se PI váží na cílové trávicí enzymy, se zdá být pro všechny čtyři skupiny stejný. Inhibitor se naváže na aktivní centrum enzymu a vytvoří komplex o velmi malé disociační konstantě ( $10^7$  až  $10^{14}$  M při neutrálním pH). Tím efektivně blokuje aktivní centrum. Jedná se o kompetitivní inhibici. Střevní proteasy nejsou jedinou skupinou látek ovlivňovaných PI, omezena je aktivita mnoha dalších enzymů, vodní rovnováha, a některé další fyziologické pochody<sup>6</sup>.

#### 4.3. Regulace inhibitorů proteas

Inhibitory proteas, které se v rostlinách akumulují jako odpověď na poranění, byly již v minulosti dostatečně charakterizovány. První práce s těmito inhibitory u bramboru odhalily, že iniciační faktor proteas (PIIF- protease inhibitor initiation factor) uvolněný v odpovědi na poranění či poškození rostliny je tou sloučeninou, která uvolňuje sled dějů vedoucích k syntéze PI (cit.<sup>17</sup>).

Dnes se usuzuje na to, že produkce PI je řízena oktadekanovou dráhou, kterou je mimo jiné zprostředkován rozklad kyseliny linolenové na mnoho výsledných produktů, z nichž jedním je kyselina jasmonová (JA). Tyto pochody ve svém důsledku vedou k indukci exprese genů kódujících PI. Zajímavá je také funkční souvislost s poraněním. Za odezvu na poranění rostlin jsou zodpovědné čtyři systemicky působící faktory, signální látky systemin, kyselina abscisová (ABA), hydraulické signály a elektrické signály<sup>18</sup>. Molekuly signálních látek jsou transportovány od místa poranění vodivými pletivy rostli-

ny. První zástupce, systemin, peptid obsahující 18 aminokyselin, byl intenzivně zkoumán u rajčete, v jehož poraněných listech byla silně indukována exprese genů kódujících PI. Oproti tomu, transgenní rostliny, které exprimovaly protismyslovou („antisense“) cDNA prosysteminu, vykazovaly podstatné snížení syntézy PI a následně i snížení odolnosti rostliny vůči hmyzím škůdcům<sup>19</sup>. Je známo, že v odpovědi na poškození hmyzem či patogenem systemin rajčete reguluje expresi asi 20 obranných genů a také aktivuje signální dráhu, během které je kyselina linolenová uvolněna z membránových struktur a konvertována na JA. Povrchový receptor systeminu (160 kDa), indukovaný poraněním, reguluje intracelulární kaskádu zahrnující depolarizaci plazmatické membrány a otevření iontových kanálů. Výsledkem je zvýšený obsah intracelulárního  $Ca^{2+}$ , který aktivuje mitogenem aktivovanou fosfokinasu (MAP kinasu) a fosfolipasu A. Tyto rychlé změny ve svém důsledku vedou k uvolnění kyseliny linolenové z intracelulárních membrán, a zřejmě i z plazmatické membrány, a její konverzi na JA, silného aktivátora exprese obranných genů rostliny<sup>20</sup>. Další práce na rajčeti prokázaly, že ke zvýšení hladiny jasmonátu dochází souhrou poranění rostliny, působení systeminu a různých oligosacharidů, vznikajících degradací pektinu, např. působením polygalaktorunasy. Úloha jasmonátu jako agens odpovídajícího na poranění rostliny a zvyšujícího lokální či systemickou expresi PI byla prokázána u mnoha rostlinných druhů<sup>21</sup>. Objev konzervativního motivu v promotoru PI-IK bramboru, tzv. G-boxu (sekvence CACGTGG), který je indukován JA, tuto myšlenku jen dále podporuje. Další studie na modelových objektech potvrdily významnou roli rostlinných růstových regulátorů, např. ABA, v přenosu signálu poranění. Hladina ABA a paralelně s ní i syntéza PI se zvyšuje v odpovědi na poranění, elektrické signály, tepelné šoky nebo aplikaci systeminu<sup>22</sup>. Přesto se však usuzuje pouze na okrajovou roli ABA v indukcii tvorby PI, neboť bylo experimentálně prokázáno, že i velmi vysoké koncentrace ABA (100 mM) indukovaly pouze slabě transkripci mRNA PI (cit.<sup>23</sup>).

Je zcela zřejmé, že dráhy přenášející informace o poranění a obranné dráhy se značně překrývají. Expese poraněním a JA indukovaných genů může být pozitivně či negativně regulována ethylenem či kyselinou salicylovou (SA). Obě sloučeniny jsou součástí obranné dráhy indukované patogenem. Stimulující efekt JA a tlumící efekt ethyleny byly prokázány ve studiích na modelech *Arabidopsis thaliana*<sup>24</sup> a *Griffonia simplicifolia*<sup>25</sup>.

V některých případech jsou rostliny schopny „vzdát“ se jednoho obranného mechanismu ve prospěch jiného. Např. SA a její methylester jsou sloučeniny silně navozující tzv. systémově získanou rezistenci rostlin jako reakci na napadení některé její části patogenem. Nicméně nemusí tomu tak být vždy. V některých případech může SA potlačit obranu rostliny cestou naředění a zeslabení oktadekanové dráhy, zatímco její methylester působí opačně, ve prospěch obranných mechanismů rostliny. V nedávné době byla identifikována celá řada podobně se chovajících drah, zdaleka však nebyly plně charakterizovány. Komponenty

## Tabulka I

Některé hmyzu odolné transgenní rostliny exprimující geny pro inhibitory proteas živočišného a rostlinného původu (přehled Schuler a spol., 1998, cit.<sup>6</sup>)

PI	Cílový hmyz	Transformované rostliny
Anti-chymotrypsin z <i>Manduca sexta</i>	<i>Homoptera</i>	bavlník, tabák
Anti-elastasa z <i>Manduca sexta</i>	<i>Homoptera</i>	vojtěška, bavlník, tabák
$\alpha$ -Antitrypsin ( $\alpha$ 1 AT)	<i>Lepidoptera</i>	brambor
Antitrypsin z <i>Manduca sexta</i>	<i>Homoptera</i>	bavlník, tabák
Hovězí pankreatický inhibitor trypsinu	<i>Lepidoptera, Orthoptera</i>	salát, petúnie, brambor, tabák, jetel plazivý
PI ze sleziny	<i>Lepidoptera</i>	brambor
C-II (PI sóji)	<i>Coleoptera, Lepidoptera</i>	řepka, topol, brambor, tabák
CMe (inhibitor trypsinu ječmene)	<i>Lepidoptera</i>	tabák
CMTI (inhibitor trypsinu dýně)		tabák
CpTI (inhibitor trypsinu luskovin)	<i>Coleoptera, Lepidoptera</i>	jabloň, řepka, salát, brambor, rýže, jahodník, slunečnice, sladké brambory, tabák, rajče
MTI-2 (PI hořčice)	<i>Lepidoptera</i>	<i>Arabidopsis</i> , tabák
OC-1 (PI rýže)	<i>Coleoptera, Homoptera</i>	řepka, topol, tabák
PHV (PI soji)	<i>Lepidoptera</i>	brambor, tabák
Pot PI-I (PI I bramboru)	<i>Lepidoptera, Orthoptera</i>	petunie, tabák
Pot PT-I (PI II bramboru)	<i>Lepidoptera, Orthoptera</i>	tabák, salát, rýže, břiza
SKTI (Kunitzův inhibitor trypsinu sóji)	<i>Lepidoptera</i>	brambor, tabák
PI I rajčete	<i>Lepidoptera</i>	vojtěška, tabák, rajče, lilek
PI II rajčete	<i>Lepidoptera</i>	tabák, rajče

těchto drah jsou většinou založené na reverzní fosforylaci, pochodech regulovaných vztahy vápník/kalmodulin a produkci aktivního kyslíku<sup>26</sup>.

#### 4.4. Transgenní rostliny exprimující inhibitory proteas

Zjištění, že v některých rostlinách přirozeně se vyskytující PI mohou potlačit činnost trávicích enzymů hmyzu, vedlo k myšlence vnést kódující sekvence PI do genomu zemědělsky významných plodin, či zvýšit expresi v rostlině již přítomných PI. Prvním úspěšným přenosem genu kódujícího PI byla v roce 1987 publikovaná transformace tabáku genem pro inhibitor trypsinu z bobovité rostliny vigny.

Doposud bylo pro transgenozu rostlin použito asi 14 genů kódujících PI. Převážně šlo o inhibitory serinových proteas pocházející z čeledi bobovitých *Fabaceae*, lilkovitých *Solanaceae* a lipnicovitých *Poaceae*. Cíleny byly převážně proti zástupcům hmyzu skupiny *Lepidoptera*, ale také proti některým škůdcům zastupujících řády *Coleoptera* a *Orthoptera*. Předmětem zájmu však nejsou pouze geny pro PI pocházející z rostlin, ale též geny pro PI živočišného původu. Stručný přehled o úspěšně transformovaných rostlinách sekvencemi PI podává tabulka I.

Ačkoliv hlavním objektem zájmu je hlavně hmyz, inhibitory proteas vykazují i aktivitu vůči houbovým pato-

genům, virům či háďátkům. Inhibitory serinových proteas potlačovaly růst polyfágní houby *Botrytis cinerea*, původce onemocnění luskovin *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, či patogena brukvovitých *Alternaria brassicicola*<sup>27</sup>. PI cysteinových proteas pocházející z rýže exprimovaný v transgenním tabáku zvyšoval odolnost vůči potyvírům, viru lepivosti tabáku a Y viru brambor. Proti viru mozaiky tabáku však PI cysteinových proteas nebyl účinný<sup>28</sup>. Inhibitory převážně serinových a cysteinových proteas byly s úspěchem použity pro tvorbu transgenních rostlin odolných vůči některým háďátkům<sup>29,30</sup>.

## 5. Závěr

Přestože byly identifikovány geny kódující celou řadu PI pocházejících z různých organismů a bylo jimi transformováno mnoho druhů rostlin, vývoj tohoto typu transgenních rostlin je stále ještě na svém počátku. Výzkum poukázal na celou řadu limitujících a často i negativních faktorů v současnosti omezujících širší využití transgenních plodin exprimujících PI a dodnes nebyla žádná taková rostlina uvolněna pro komerční praxi.

Významným omezením rychlejšího vývoje této strategie GM rostlin je nesmírná variabilita trávicích proteas hmyzu, kdy je odhadováno, že ve střevě se vyskytuje více než jeden tisíc rozdílných enzymů. Je tedy nemožné ovliv-

nit expresi jednoho PI všechny proteasy hmyzu<sup>2</sup>. Pro navození odolnosti transgenních rostlin tedy bude nezbytné vnášet více genů pro PI, lišících se v mechanismu působení či geny pro další insekticidní látky. Hmyz je navíc schopen kompenzovat inhibici jednoho proteolytického enzymu využitím jiného, který není ovlivněn<sup>31</sup>, či jednoduše přejít na produkci enzymů k PI necitlivých<sup>32–36</sup>. V některých případech byl dokonce pozorován opačný efekt exprese PI v transgenní rostlině než snížení jejího poškození. Škodlivý hmyz sice vykazoval inhibici proteolytických enzymů, tuto si však kompenzoval jednoduše tím, že zkonsumoval více rostlinné hmoty<sup>37,38</sup>. Letální účinek PI také není vždy 100%, často dochází pouze ke zpomalení vývoje hmyzu či snížení jeho plodnosti<sup>39</sup>.

Z hlediska praktického využití je nezanedbatelnou otázkou také možný nežádoucí vliv rostlin exprimujících PI na necílové organismy. Ať už se jedná o přímou konzumaci rostlinných částí obsahující PI či o potravní vztahy predátorů a jejich potravy, které byly vystaveny účinkům PI, nelze tuto skutečnost přehlížet<sup>40–42</sup>. Rostliny exprimující PI jsou předmětem hodnocení potenciálních rizik stejně jako všechny ostatní transgenní plodiny uvolněné do prostředí nebo u kterých je jejich uvolnění plánováno<sup>43,44</sup>. Potenciální rizika PI pro živočichy a člověka nebyla zatím podrobněji studována vzhledem k tomu, že výzkum se doposud zaměřoval pouze na aspekty spojené s vývojem metodik a studium mechanismů účinku vůči cílovým skupinám organismů.

Efekt a využití transgenních rostlin exprimujících PI nelze doposud srovnávat např. s *Bt*-rostlinami, neboť výzkum v oblasti PI probíhá nesrovnatelně kratší dobu. Dodnes publikované výsledky však poukazují na to, že PI budou v budoucnu jedním ze způsobů efektivní kontroly škodlivých činitelů a najdou si své místo v integrované ochraně rostlin.

*Práce vznikla za podpory grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MŠMT IPO5ME800 a MSM 60076658-06 a Grantové agentury ČR GA ČR-31/H160.*

#### LITERATURA

1. Carliny C. R., Grossi-de-Sá M. F.: *Toxicon* 40, 1515 (2002).
2. Lawrence P. K., Koundal K. R.: *Electron. J. Biotechnol.* 5, 93 (2002).
3. Sharma H. C., Sharma K. K., Seetharama N., Ortiz R.: *Electron. J. Biotechnol.* 3, 6 (2000).
4. Munkvold G. P., Hellmich R. L., Rice L. G.: *Plant Dis.* 83, 130 (1999).
5. Babu R. M., Sajeena A., Seetharaman K., Reddy M. S.: *Crop Prot.* 22, 1071 (2003).
6. Schuler T. H., Poppy G. M., Kerry B. K., Denholm I.: *Trends Biotechnol.* 16, 168 (1998).
7. ISAAA : <http://www.isaaa.org/main.htm>, staženo 27. června 2005.
8. Klein T. M., Wolf E. D., Wu R., Stanford J. C.: *Nature* 327, 70 (1987).
9. Chilton M.-D., Drummond M. H., Merlo D. J., Sciaky D., Montoya A. L., Gordon M. P., Nester E. W.: *Cell* 11, 263 (1977).
10. Murdock L. L., Shade R. E.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 6605 (2002).
11. Mickel C. E., Standish J.: University of Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 178, 1 (1947).
12. Hilder V. A., Gatehouse A. M. R., Sheerman S. E., Barker R. F., Boulter D. A.: *Nature* 300, 160 (1987).
13. Ryan C. A., v knize: *Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems* (Denno R. F., McClure M. S., ed.), 741–747. Academic Press, New York 1989.
14. Baker J. E., Woo S. M., Mullen M. A.: *Ent. Exp. App.* 36, 97 (1984).
15. Jongsma M. A., Bakker P. L., Peters J., Bosch D., Stiekema W. J.: *PNAS* 92, 8041 (1995).
16. Michaud D., Nguyen-Quoc B., Vrain T. C., Fong D., Yelle S.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31, 451 (1996).
17. Melville J. C., Ryan C. A.: *Biol. Chem.* 247, 3415 (1973).
18. Malone M., Alarcon J. J.: *Planta* 196, 740 (1995).
19. McGurl B., Orozco-Cardenas M., Pearce G., Ryan C. A.: *PNAS* 91, 9799 (1994).
20. Ryan C. A.: *Biochim. Biophys Acta* 1477, 112 (2000).
21. Wasternack K. F., Parthier B.: *Trends Plant Sci.* 2, 302 (1997).
22. Koiwa H., Bressan R. A., Hasegawa P. M.: *Trends Plant Sci.* 2, 371 (1997).
23. Birkenmeier G. F., Ryan C. A.: *Plant Physiol.* 117, 687 (1998).
24. Epple P., Aprl K., Bohlmann H.: *Plant Physiol.* 109, 813 (1995).
25. Zhu-Salzman K., Salzman R. A., Koiwa H., Murdock L. L., Bressan R. A., Hasegawa P. M.: *Physiol. Plant.* 104, 365 (1998).
26. León J., Rojo E., Sanchez-Serano J. J.: *J. Exp. Botany* 52, 1 (2001).
27. Lorito M., Broadway R. M., Hayes C. K., Woo S. L., Noviello C., Williams D. L., Harman G. E.: *Mol. Plant-Microbe Int.* 7, 525 (1994).
28. Gutierrez-Campos R., Torres-Acosta J. A., Saucedo-Arias L. J., Gomez-Lim M. A.: *Nature Biotech.* 17, 1223 (1999).
29. Urwin P. E., Levesley A., McPherson M. J., Atkinson H. J.: *Mol. Breed.* 6, 257 (2000).
30. Urwin P. E., Troth K. M., Zubko E. I., Atkinson H. J.: *Mol. Breed.* 8, 95 (2001).
31. Wu Y., Llewellyn D., Mathews A., Dennis E. S.: *Mol. Breed.* 3, 371 (1997).
32. Jongsma M. A., Bakker P. L., Stiekema W. J., Bosch D.: *Mol. Breed.* 1, 181 (1995).
33. De Leo F., Bonadé-Bottino M. A., Ceci L. R., Gallerani R., Jouanin L.: *Plant Physiol.* 118, 997 (1998).
34. Bonadé-Bottino M., Lerin J., Zaccomer B., Jouanin L.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 131 (1999).

35. Paulilo L. C. M. S., Lopes A. R., Cristofolleti P. T., Parra J. R. P., Terra E. R., Silvia-Filho M. C.: *J. Econ. Entomol.* *93*, 892 (2000).
36. Brito L. O., Lopes A. R., Parra J. R. P., Terra W. R. Silva-Filho M. C.: *Crop Biochem. Physiol.* *128B*, 365 (2001).
37. Cloutier C., Jean C., Fournier M., Yelle S., Michaud D.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* *44*, 69 (2000).
38. Winterer J., Bergelson J.: *Mol. Ecol.* *10*, 1069 (2001).
39. De Leo F., Gallerani R.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* *32*, 489 (2002).
40. Girard C., Picard-Nizou A. L., Grallien E., Zaccomer B., Jouanin L., Pham-Delegue M. H.: *Transgenic Res.* *7*, 239 (1998).
41. Bouchard E., Michaud D., Cloutier C.: *Mol. Ecol.* *12*, 2429 (2003).
42. Ferry N., Raemaekers R. J. M., Majerus M. E. N., Jouanin L., Port G., Gatehouse J. A., Gatehouse A. M. R.: *Mol. Ecol.* *12*, 493 (2003).
43. Atkinson H. J., Green J., Cowgill S., Aurora L.: *Trends Biotechnol.* *19*, 91 (2000).
44. Cowgill S. E., Atkinson, H. J.: *Transgenic Res.* *12*, 439 (2003).

**M. Hraška<sup>a,b</sup>, S. Rakouský<sup>a,c</sup>, and V. Čurn<sup>b</sup>**  
 (<sup>a</sup>*Department of Genetics, Faculty of Biology,* <sup>b</sup>*Biotechnological Centre, Faculty of Agronomy,* <sup>c</sup>*Health and Social Faculty, University of South Bohemia, České Budějovice*): **Protease Inhibitors, Mode of Action and Perspectives for Plant Transgenesis**

Contemporary cultivation of field crops utilizes new findings of biotechnologies, specifically recombinant DNA and transgenous techniques to an ever-increasing extent. Transgenic plants enriched in various new genes already became common practice in agriculture of a number of developed but also developing countries. The research in this field intensively grows, also entirely new directions, in addition to already proved gene manipulations, are the subject of interest. The contribution deals with classification and function of some protease inhibitors utilizable in transgenesis of plants. It concentrates also on the aspects associated with possible use of their recombinated genes in enhancement of resistance of plants to insect pests and some pathogens. Some examples are given of important transgenic plants which already express genes for most important protease inhibitors.