

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Michal Chudý

Biologická ochrana rostlin

Biological control of plant pathogens

Balalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením své školitelky Doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

Michal Chudý

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat své vedoucí práce RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za veškerou odbornou pomoc a všechny rady při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D. a Mgr. Kateřině Bělonožníkové za všechny poskytnuté metodické rady a pomoc při zpracování této práce. Dále Ing. Tomáši Vaňkovi Ph.D. za poskytnutí rostlinných materiálů. Poděkování patří i Technologické agentuře ČR za podporu projektu číslo TJ01000451.

Abstrakt

Proteiny teplotní šoku (HSP) hrají hlavní úlohu v ochraně buněčných proteinů, fungují jako chaperony, zamezují agregaci částečně poškozených molekul, pomáhají proteinu při opětovném sbalení, opravení a vytvoření správné trojrozměrné struktury. K jejich syntéze dochází zejména během stresového stavu buňky nebo celé rostliny. Biotické formy stresu indukují expresi proteinů souvisejících s patogenezí (PR), které se často vyznačují enzymovou aktivitou, jedná se například o glukanasu, chitinasy a peroxidasy.

V této práci byl sledován vliv infekce houbovými patogeny *Alternaria brassicicola* a *Verticillium longisporum* na obsah HSP70, HSP90 a PR-1, PR-2, PR-3 v rostlinách rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) a řepky olejné (*Brassica napus* subsp. *oleifera*). Semena těchto rostlin byla ošetřena kmeny oomycety *Pythium oligandrum*, která patří mezi unikátní a komerčně dostupné prostředky biologické ochrany rostlin. HSP a PR proteiny byly detekovány imunochemicky na nitrocelulosové membráně.

Imunochemická analýza prokázala interakci primárních protilátek proti HSP70 a HSP90 i s proteiny o nižších relativních molekulových hmotnostech. Infekce *Alternaria brassicicola* a *Verticillium longisporum* zvýšila zastoupení zejména proteinů o velikosti 33 kDa – 43 kDa. Ošetření semen izoláty *Pythium oligandrum* mělo významný vliv na obsah HSP proteinů.

Zastoupení PR-1 proteinů bylo ve všech experimentálních skupinách rostlin na prahu detekovatelnosti. Infekce patogenem *Alternaria brassicicola* významně zvýšila zastoupení PR-2 v rostlinách řepky a PR-3 v rajčeti v porovnání s *Verticillium longisporum*.

Tato práce byla vytvořena v rámci projektu TAČR TJ01000451.

Klíčová slova

Proteiny teplotního šoku, houbová infekce, *Alternaria brassicicola*, *Verticillium longisporum*

Abstract

Heat shock proteins (HSPs) play a major role in protecting cellular proteins, acting as chaperones, preventing aggregation of partially damaged molecules, and help the protein repack, repair and create its right three-dimensional structure. Their synthesis occurs mainly during the stress state of the cell or the whole plant. Biotic forms of stress induce the expression of pathogenesis-related proteins (PRs), which are often characterized by enzyme activity, such as glucanases, chitinases and peroxidases.

In this work, the effect of infection with fungal pathogens *Alternaria brassicicola* and *Verticillium longisporum* on the content of HSP70, HSP90 and PR-1, PR-2, PR-3 was followed in the tomato plants (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) and rapeseed plants (*Brassica napus* subsp. *oleifera*). The seeds were treated with isolates of oomycete *Pythium oligandrum*, which is one of the unique and commercially available biological control agents. HSPs and PRs proteins were detected immunochemically on a nitrocellulose membrane.

Immunochemical analysis showed the interaction of primary antibodies against HSP70 and HSP90 with low relative molecular weight proteins. Infection with *Alternaria brassicicola* and *Verticillium longisporum* increased the representation of 33 kDa - 43 kDa proteins. Seed treatment with *Pythium oligandrum* isolates had a significant effect on the HSPs content.

The amount of PR-1 proteins was on the threshold of detectability in all experimental groups of plants. Infection with *Alternaria brassicicola* pathogen significantly increased the PR-2 content in rapeseed plants and PR-3 in tomatoes compared to *Verticillium longisporum*.

This work was created within the project TACR TJ01000451.

Keywords

Heat shock proteins, fungal infection, *Alternaria brassicicola*, *Verticillium longisporum*

Obsah

1. Úvod.....	5
1.1. Proteiny teplotního šoku HSP.....	5
1.1.1. HSP70.....	8
1.1.2. HSP90.....	11
1.2. Proteiny související s patogenezí.....	15
1.2.1. PR-1.....	17
1.2.2. PR-2.....	19
1.2.3. PR-3.....	21
2. Cíl práce.....	24
3. Materiály a metody.....	25
3.1. Přístroje.....	25
3.2. Chemikálie a rozpouštědla.....	25
3.3. Protilátky.....	26
3.4. Rostliny.....	27
3.5. Experimentální metody.....	27
3.5.1. Extrakce proteinů z rostlinného materiálu.....	27
3.5.2. Stanovení koncentrace proteinů podle Bradforda.....	28
3.5.3. Elektroforetické metody.....	29
3.5.4. Imunochemické stanovení HSP a PR proteinů.....	31
4. Výsledky.....	32
4.1. Množství proteinů v izolátech z rostlin rajčete jedlého ošetřených oomycetami <i>Pythium oligandrum</i>	32
4.2. Sledování přítomnosti heat shock proteinů v izolátech z rajčete jedlého.....	34
4.2.1. HSP70.....	34

4.2.2.	HSP90.....	37
4.3.	Sledování přítomnosti PR proteinů v izolátech z rajčete jedlého	40
4.3.1.	PR-1.....	40
4.3.2.	PR-2.....	41
4.3.3.	PR-3.....	43
4.4.	Množství proteinů v izolátech z rostlin řepky olejně ošetřených oomycetami <i>Pythium oligandrum</i>	46
4.5.	Sledování přítomnosti heat shock proteinů v izolátech z řepky olejně	46
4.5.1.	HSP70.....	47
4.5.2.	HSP90.....	49
4.6.	Sledování přítomnosti PR proteinů proteinů v izolátech z řepky olejně	53
4.6.1.	PR-2.....	53
4.6.2.	PR-3.....	54
5.	Diskuze	58
6.	Shrnutí	61
7.	Seznam použité literatury	62

Seznam použitých zkratek

ADP	adenosindifosfát
APS	peroxodisíran amónny
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BiP	protein vázající imunoglobulin (<i>z angl. Binding immunoglobulin protein</i>)
BSA	hovězí sérový albumin (<i>z angl. Bovine serum albumine</i>)
CBD	doména vázající chitin (<i>z angl. Chitin-binding domain</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
HSF	transkripční faktor teplotního šoku (<i>z angl. Heat-shock transcription factor</i>)
HSP	proteiny teplotního šoku (<i>z angl. Heat-shock proteins</i>)
NADP+	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaný)
NBT	Nitroblue tetrazolium chlorid
PR protein	protein související s patogenezí (<i>z angl. Pathogenesis-related proteins</i>)
PSII	fotosystém II
PVP	polyvinylpyrrolidonu
RNA	ribonukleový kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný (<i>z angl. Sodium dodecylsulphate</i>)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (<i>z angl. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TEMED	N,N,N',N' - tetramethylethylendiamin

Tris tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20 polyoxyethylensorbitanmonolaurát

1. Úvod

1.1. Proteiny teplotního šoku HSP

Při obraně buněk před biotickým, nebo abiotickým stresem, je velmi důležité zachování původní struktury a tedy i aktivity proteinů, zamezení agregace denaturovaných nebo částečně denaturovaných proteinů a také ochrana DNA. Hlavní úlohou v ochraně buněčných proteinů hraje skupina proteinů teplotního šoku (*z angl.* heat-shock protein, HSP), které jsou syntetizovány během stresového stavu buňky nebo celé rostliny. HSP sehrávají roli chaperonů, které zamezují nascentním proteinům agregaci při sbalování nebo při přesunu do jiných buněčných kompartmentů ^{1,2}. Také ale zamezují agregaci pouze částečně poškozených molekul, kdy proteinu pomáhají při opětovném opravení struktury ².

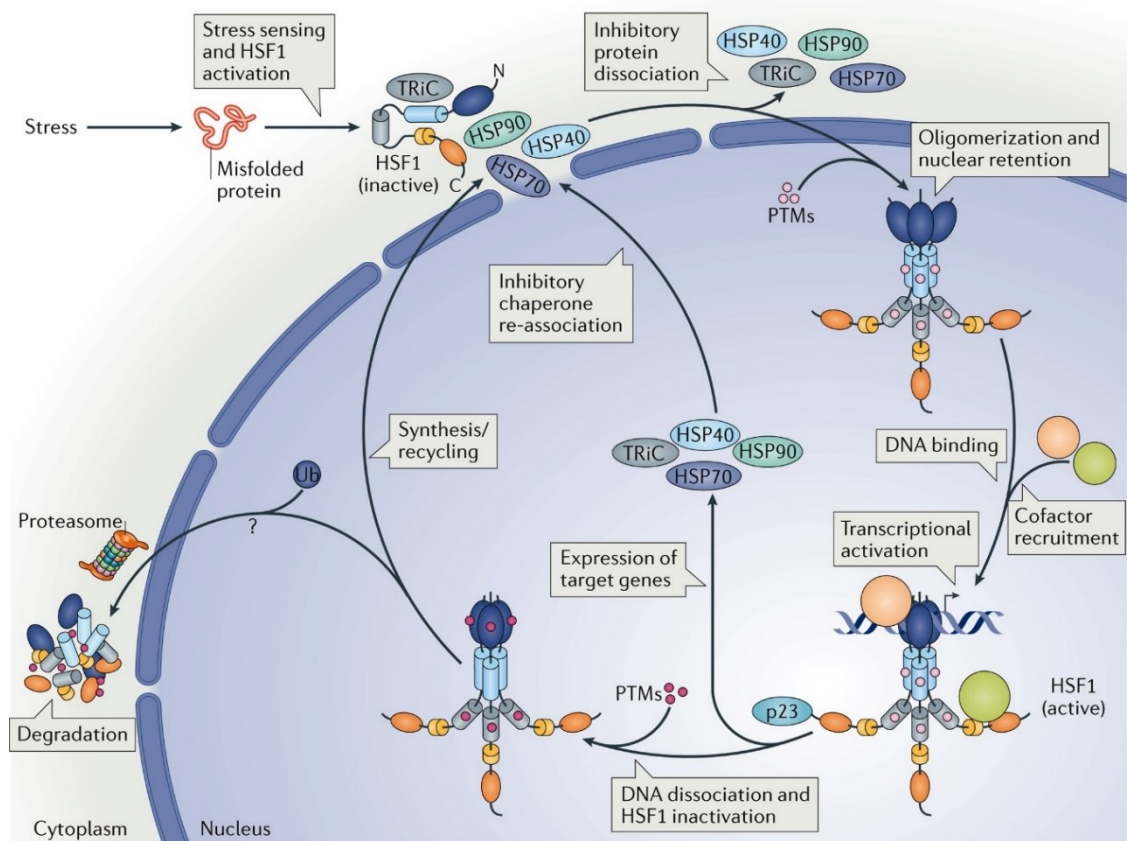
Název proteinů HSP není již přesný, nýbrž historický. HSP byly náhodně poprvé objeveny při studování larev *Drosophila melanogaster*, kde při mírně zvýšené teplotě inkubace larev, byla zjištěna zvýšená transkripční aktivita určitého genu neznámého proteinu ³. Tento jev byl později nazván „odpověď na teplotní šok“ (*z angl.* heat-shock response) a následně objevené skupiny proteinů byly podle toho také nazvány HSP ⁴. Podobný jev a podobné proteiny související se zvýšenou teplotou, byly později evidovány u všech eukaryotických i prokaryotických buněk ^{5,6} včetně rostlinné říše, kde přítomnost HSP byla pozorována již při klíčení semene při stresových podmínkách ^{7,8}.

HSP patří do skupiny proteinů označovaných jako molekulární chaperony. Chaperony obecně jsou proteiny, které pomáhají nově syntetizovaným polypeptidovým řetězcům k jejich sbalení do nativní konformace. Chaperony, jako i určité HSP, se váží na specifické oblasti polypeptidového řetězce, čímž zabraňují předčasnému sbalení do nesprávné struktury nebo agregaci peptidového řetězce, ale také asistují při přesunu peptidového řetězce do jiných buněčných kompartmentů, kde se následně sbalí do nativní konformace ^{9,10}. Chaperony HSP spolupracují s jejich ko-chaperonovými proteiny, které regulují aktivitu, při syntéze podjednotek velkých proteinů a také skládání finálních oligomerních proteinů ¹¹.

Celá rodina HSP se nachází ve všech větších kompartmentech buňky jako jsou chloroplasty, mitochondrie, endoplasmatické retikulum a přirozeně také v cytosolu ¹². Za vytvoření 3D

struktury proteinů, jsou v buňkách zodpovědné dva typy proteinů: foldasy nebo již zmíněné molekulární chaperony HSP. Foldasy, s enzymovou aktivitou, katalyzují změnu disulfidických vazeb a izomerizaci vazeb kolem aminokyselinových zbytků prolinu¹³, zato HSP participují při celé škále procesů života proteinů od translace mRNA, elongace řetězce, až po maturaci a degradaci proteinů, a to ve všech buněčných kompartmentech¹³. HSP také hrají roli i při transkripci a mnoha posttranslačních modifikacích¹⁴.

Expresce proteinů HSP je regulována transkripčními faktory (z angl. heat-shock transcription factor, HSF), přičemž existují tři mechanismy, kterými může být exprese indukována: i) přímo stresovým faktorem; ii) reakcí s denaturovaným proteinem nebo fragmentem proteinu; iii) změnou fluidity membrány kvůli vyšší teplotě nebo jinému abiotickému stresu¹. HSF regulují promotor genu daného HSP, kde se vážou na cis-elementy¹⁵. HSF se dělí do třech skupin, a to HSFA, HSFB a HSFC, kde se dále dělí podle jejich funkce.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Obr. č. 1 – Cyklus aktivace HSFA: Neaktivní HSFA jsou udržovány v klidovém stavu ve vazbě s HSP90, nebo i jinými HSP či chaperoníny, jako je TCP komplex (TRiC). Po zaznamenání stresu, se HSFA aktivuje, což způsobuje disociaci HSFA od HSP a následnou trimerizaci v jádře buňky. HSFA je upravena posttranslačními modifikacemi (PTMs), které podporují vazbu na DNA a transkripci genů určených přesnými kofaktory. HSFA je následně opět posttranslačně modifikován, což způsobuje disociaci od DNA, inaktivaci HSFA a jejich následnou degradaci¹⁶.

Například HSFA regulují v cytosolu cyklus aktivace HSP, který je zobrazen na Obr. č. 1, na předešlé straně. V klidovém stavu, se HSFA vyskytuje jako neaktivní monomer, který je regulován HSP90¹⁷. Do aktivní, trimerní, formy se HSFA dostává po disociaci HSP90. Vytvořená homo-trimerní forma je následně schopna vazby na cis-elementy promotoru, přičemž se startuje transkripce a finálně i syntéza HSP¹⁸. Fosforylace serinových a threoninových zbytků, vyvolává hyperfosforylaci homo-trimeru, co způsobuje zvýšení životnosti trimerní formy. HSF je tedy regulován kinasami a fosfatasami, ale také byla zjištěna regulace acetylasami, kde acetylace urychluje vazbu HSF na cis-promotor^{16,19}. Vlivem stresu dochází k reakci různých HSFA, které vytváří velmi efektivní oligomer, který kromě regulace HSP reguluje i syntézu ochranných enzymů jako jsou glutathion-S-transferasa, glutathionreduktasa, superoxidodismutasa a různé peroxidasy a katalasy^{20,21}.

Další stresy, při kterých se zvyšuje koncentrace HSP, jsou nízké teploty, sucho, vysoká koncentrace solí, minerálů a těžkých kovů, oxidativním stresu, zvýšené koncentraci volných radikálů a i při silném UV záření^{13,14,22,23}. HSP proteiny se v buňkách nacházejí více méně neustále, ale můžeme pozorovat vyšší koncentrace při různých typech stresu a i při různých fázích buněčného cyklu²³. Mezi biologické stresy, které zvyšují koncentraci HSP proteinů, se řadí i oomyceta *Pythium oligandrum*, která se řadí mezi mykoparazitický rod *Pythium*. *P. oligandrum* proniká do rostlinných buněk čím spouští obrannou odpověď, ale nespůsobuje jim žádnou škodu. Oomycety *P. oligandrum* obsahují mnoho různých povrchových proteinů reprezentující více členů rodu *Pythium*, čím iniciují rostlinnou obrannou odpověď²⁴.

Původně se HSP dělily podle relativní molekulové hmotnosti, a to do pěti skupin: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 a malé HSP, u kterých se jejich relativní molekulová hmotnost pohybuje v rozmezí od 15 do 45 kDa a tvoří ji více než 20 různých proteinů²⁵. Nyní se již dělí podle strukturní homologie. Větší proteiny HSP104, HSP70 a HSP40 se vyskytují primárně ve vyšších koncentracích při replikaci DNA spolu s HSP90, který se také objevuje při transkripčních a posttranskripčních procesech. HSP70 a HSP90 dále hrají roli při buněčné morfogenezi a dimorfismu. Při teplotním stresu hrají úlohu HSP104, HSP90, HSP60, HSP30 a HSP10, přičemž na nízké teploty primárně reaguje HSP12. Dále HSP90, HSP70 a HSP30 reagují na pH stres a HSP60 na osmotický stres. Při vyšším atmosférickém tlaku lze pozorovat v listech vyšší koncentraci HSP104^{6,8,9}.

1.1.1. HSP70

1.1.1.1. Výskyt a iniciace

Skupina rostlinných HSP70 patří mezi nejvíce prostudovanou skupinu HSP proteinů. Jsou to vysoce konzervované proteiny s vysokou sekvenční shodou mezi všemi organismy, od mikroorganismů, až po savčí buňky. HSP70 jsou přítomny ve všech větších buněčných kompartmentech^{1,22}, ale také se nacházejí v glyoxysomech a proteinových tělískách²⁶. Určité HSP70 (tzv. konstitutivní), jsou přítomny po celou dobu života buněk a jsou udržovány v určité koncentraci, pak jsou tu i jiné HSP70, indukovatelné, které se syntetizují až po iniciaci určitým stresem²⁷.

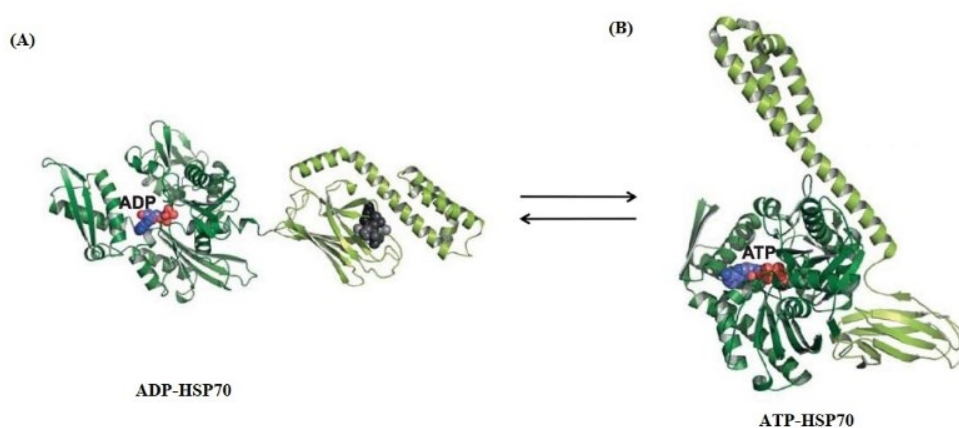
Předpokládá se rozdílnost funkcí jednotlivých proteinů HSP70, podle jejich umístění v buňce. HSP70, které jsou lokalizovány v různých kompartmentech, se liší molekulovou hmotností, ikdyž mají stejnou funkci²³. Obecně, hlavní funkcí HSP70 je asistence při importu, translokaci a degradaci proteinů nebo prekurzorů proteinů. Chloroplastové HSP70 také odpovídají na intenzivní světlo, když mají za úkol stabilizovat PSII. Při intenzivním záření dochází ke vzniku kyslíkových radikálů a následně k poškození chlorofylů a proteinů D1 fotosystému II, a dochází tedy k fotoinhibici²⁸. HSP70 endoplasmatického retikula, a také cytoplasmatické, se účastní stabilizace ribozomů a skládání proteinů do celků, přičemž cytoplasmatické se dále účastní při translokaci nesbalených proteinů mezi jednotlivými buňkami přes plazmodezmy²⁹.

1.1.1.2. Struktura

Proteiny HSP70 se skládají ze dvou funkčních domén. První, N-terminální doména, o velikosti přibližně ~40 kDa, s ATP-asovou aktivitou, váže ATP a ionty Mg^{2+} a K^+ . Její koncová sekvence se liší u všech HSP70 podle lokalizace v buňce³⁰⁻³². Druhá doména, tzv. doména vázající substrát, o přibližné velikosti ~30 kDa, váže polypeptidové řetězce.

C-terminální část, u cytoplasmatických HSP70 je zodpovědná za vazbu s ko-chaperonovým HSP40 při proteosyntéze^{30,32}.

ATP-asová doména v 3D struktuře má podobu písmene U, kde v dutině je vazebné místo pro komplex Mg^{2+} -ATP- $2K^+$. Krajní vrcholy domény jsou schopny pohybu v závislosti na hydrolyze ATP, čímž dojde ke změně konformace proteinu³³. Doména vázající protein vytváří prostor pro vazbu polypeptidového řetězce. Tento prostor se otevírá a zavírá v závislosti na konformaci ATP-asové domény^{30,34}. Hydrolyzou ATP se mění konformace HSP70, kde nová konformace má větší afinitu pro polypeptidový řetězec, a doména vázající protein uzavírá vázaný protein uvnitř, jako je vidět na Obr. č. 2³⁵.



Obr. č. 2 – Konformační změna HSP70 při hydrolyze vázaného ATP: (A) – zobrazuje konformaci s vysokou afinitou po hydrolyze ATP s navázaným proteinem. (B) – zobrazuje proteinovou konformaci s nízkou afinitou pro cílový protein. Tmavě zeleně je znázorněná N-terminální doména, světlě zeleně je znázorněna C-terminální doména s flexibilní koncovou sekvencí³⁶.

1.1.1.3. Reakce v buňkách

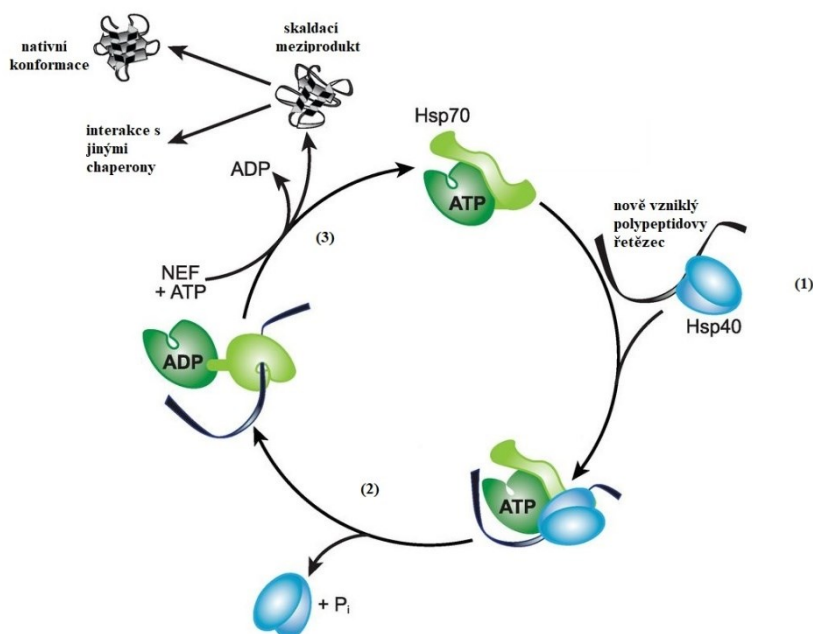
Rodinu HSP70 v rostlinné říši tvoří mnoho proteinů. Například u *Arabidopsis thaliana* je 18 genů pro různé HSP70. Z toho 3 geny kódují chloroplastové HSP70, 2 geny mitochondriální a 3 geny HSP70 endoplasmatického retikula³⁷.

Většina proteinů HSP70 se účastní při přesunu nově syntetizovaných proteinů, nebo již existujících proteinů, do buněčných kompartmentů²⁷. Aby se již sbalené proteiny mohly

přesouvat mezi jednotlivými kompartmenty, musejí se částečně rozbalit, a to pomocí HSP70. HSP70 se primárně váže na hydrofobní aminokyselinové postranní řetězce pro zamezení agregace¹⁰. Na druhé straně membrány jsou přenesené proteiny opětovně komplexovány s novými HSP70, které jim pomáhají k opětovnému sbalení. Většina mitochondriálních a plastidových HSP70 hraje roli ve vychytávání proteinů přenesených přes membránu³⁸.

Kromě přesunu proteinů přes membránu se HSP70B, které se nacházejí hlavně ve stromatu, účastní ochrany PSII při různých stresech. Především ochraňují proteiny D1 a CP43, na které je při silné intenzitě světla vyvíjen silný reakční tlak. Také další proteiny chloroplastů, jako cytochrom-b₆/f, ferredoxin nebo NADP⁺-ferredoxin oxidoreduktasa, reagují při stresu s HSP70B^{39,40}.

Druhy mitochondriální HSP70, mtHSP70, se účastní membránové stabilizace během působení různých typů stresu, při kterých může dojít k náhle změně membránového potenciálu a možnému rozpadu membrány⁴¹.



Obr. č. 3 – Cyklus vazby a uvolnění substrátu: V 1. kroku nově syntetizovaný polypeptidový řetězec interaguje s HSP40 a následně se komplexuje s aktivním ATP-HSP70. 2. Interakce s HSP40 spouští hydrolyzu ATP a vytváří se uzavřená forma. 3. Uvolnění ADP je katalyzované faktorem výměny nukleotidů (nucleotide exchange factor –NEF) a znovunavázaný ATP spouští uvolnění polypeptidového řetězce pro jeho následné složení nebo posunutí dalším HSP pro transport do potřebného místa³⁶.

HSP70, zodpovědné za proteosyntézu, tvoří komplex s cylindrickým chaperonem HSP40 za účasti ATP. Tento komplex je napojen přímo na ribozom a nově vzniklý protein je ihned po syntéze komplexován s podjednotku HSP70 vázající protein³⁰. Aktivita a funkce HSP70 je sice ovlivňována HSP40, ale HSP70 mohou fungovat i samostatně⁴². Cyklus vytváření komplexu je zobrazen na obr. č. 3 na předešlé straně.

V endoplasmatickém retikulu se HSP70, jako například BiP (z *angl.* binding immunoglobulin protein), primárně účastní syntézy proteinů. Pomáhají sbalování a skládání proteinů až do kvarterních struktur. Dále se účastní degradace nebo opravy proteinů označených pro likvidaci, chybně sbalených nebo denaturovaných proteinů^{43,27}.

Obrana před různými typy stresu je potřebná i v jádře buňky. Jaderný NtHSP70-1 se podílí na ochraně DNA před poškozením různými abiotickými stresy stabilizací jaderných proteinů⁴⁴.

1.1.2. HSP90

1.1.2.1. Výskyt a iniciace

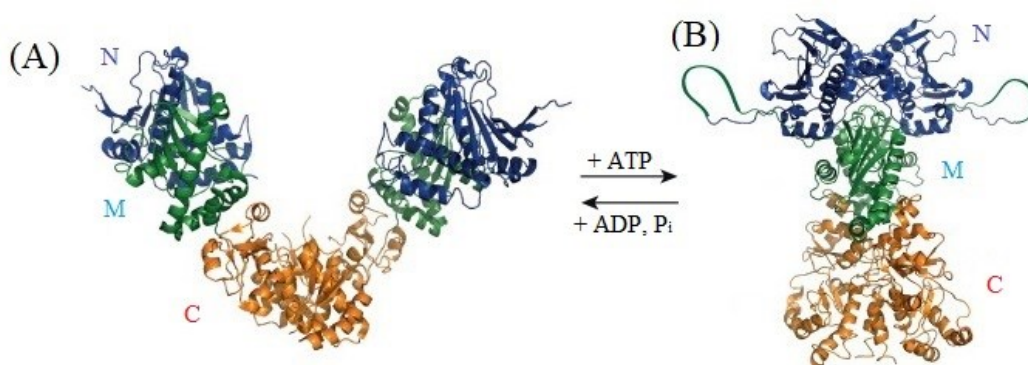
V rostlinách *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno 7 proteinů patřící do rodiny HSP90. Vyskytují se ve velkém množství primárně v cytoplasmě, kde tuto rodinu zastupuje více druhů HSP90, a to s označením AtHSP90-1 až 4. Ve zbylých kompartmentech se HSP90 vyskytují v menším počtu. V plastidech jako AtHSP90-5, v mitochondriích AtHSP90-6 a AtHSP90-7 v endoplasmatickém retikulu⁴⁵.

HSP90 jsou ještě více konzervované proteiny než menší HSP70. V rámci eukaryotních organismů mají 63-71% homologii a mezi rostlinami 88-93% homologii⁴⁶. Jsou to proteiny specializované pro skládání proteinů do jejich správných konformací a jejich aktivaci, primárně proteinů signálních drah a buněčného cyklu. Mnohé z HSP90 jsou v buňce syntetizovány konstitutivně. V závislosti na funkci daných HSP90 je patrná zvýšená

koncentrace HSP90 v různých fázích buněčného cyklu. Rostliny si také kódují ko-chaperony pro HSP90, které asistují HSP90 při komplikovanějších reakcích ⁴⁵.

1.1.2.2. Struktura

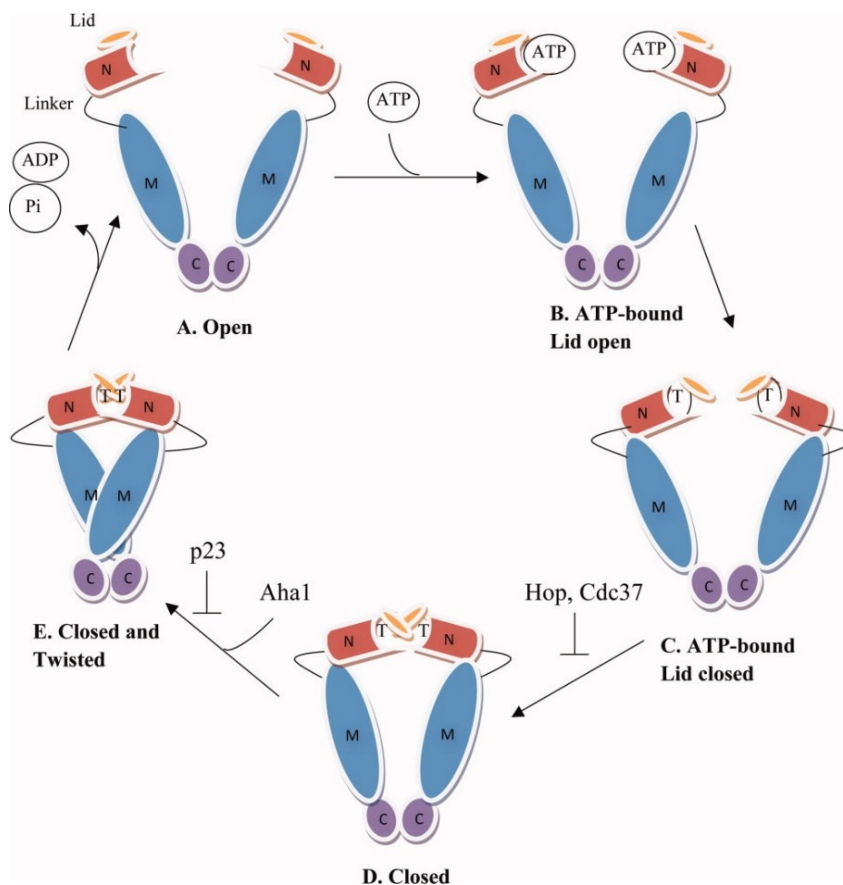
HSP90 mají vysoce konzervované N- i C- terminální sekvence, které jsou spojeny sekvencí různé délky závisející na jejich místě působení ⁴⁷. Například všechny cytoplasmatické HSP90 obsahují motiv Lys-Glu-Ile-Ser-Asp-Asp-Glu, kam se specificky váže kasein-kinasa II ⁴⁵. Stejně jako HSP70, také HSP90 se skládá ze dvou domén, které vytváří strukturu v průměru o velikosti 90 kDa ⁴⁸. Jedná se o N-terminální doménu, s ATP-asovou aktivitou a C-terminální doménu s vysokým počtem zbytků glutamátů, které udělují celkový negativní náboj ⁴⁵. Na C-terminální části byly nalezeny dva úseky se specifickými sekvencemi, které obsahují střídavě záporně a kladně nabitě aminokyseliny, a to Glu, nebo Asp, a Lys, kde se dvojice aminokyselin mnohokrát opakuje ⁴⁹. Tyto dva úseky umožňují HSP90 vázat dva polypeptidové řetězce, což umožňuje jejich kombinaci při skládání ⁵⁰. Velmi podobně jako u HSP70, N-terminální doména vázající ATP je zodpovědná za změnu konformace celého proteinu. Změna probíhá po hydrolýze ATP, kde ADP komplex, s větší afinitou k cílovým postranním řetězcům proteinů, způsobuje změnu konformace N-terminální domény a tedy i celého proteinu ^{51,52}.



Obr. č. 4 – Struktura dimeru HSP90: (A) – Zobrazuje neaktivní dimerní formu spojenou na C-terminálním konci (C). Střední úsek (M) je volný a nezatočený. N-terminální (N) konec má otevřenou strukturu připravenou na vazbu ATP. (B) – HSP90 jsou v dimerní formě na obou terminálních koncích a střední úseky (M) jsou zatočeny ⁵³.

Kromě sekvencí pro vazbu polypeptidů, obsahuje C-terminální doména na konci specifickou sekvenci způsobující dimerizaci dvou HSP90, nebo vazbu kalmodulinu nebo jiného substrátu^{54,55}. Cytoplasmatické HSP90 jsou charakteristické stejnou sekvencí na C-terminálním konci: Met-Glu-Glu-Val-Asp, kterou zbylé HSP90 postrádají⁵⁶. Jsou mezi sebou sekvencně velmi podobné. AtHSP90-2, 3 a 4 jsou z 96% identické a lze předpokládat i podobnou buněčnou funkci⁴⁵.

1.1.2.3. Reakce v buňkách



Obr. č. 5 – ATP-asový cyklus HSP90: (A) zobrazuje dimerizovanou konformaci na C-terminálním konci, bez navázané ATP. Po vazbě ATP (B) se mění konformace N-terminální domény s ATP uzamknutou uvnitř (C). Následuje dimerizace na N-terminálním konci (D) a následnou stočení struktury (E)⁶².

HSP90 se účastní, stejně jako i HSP70, skládání proteinů. Na rozdíl od HSP70 se HSP90 primárně účastní aktivace proteinů, avšak hlavní úlohou HSP90 je skládání a kontrola signálních a receptorových proteinů, jako jsou steroidní receptory, tyrosin kinasy a proteiny buněčného cyklu ⁵⁷. HSP90 dále asistují při přepravě proteinů do kompartmentů, kdy proteiny ochraňují během cesty ⁵⁸, ale také se objevují ve stresových podmínkách kvůli R-proteinům a při DNA methylaci RNA-řízenou reakcí ^{59,60}.

Předpokládá se tedy, že hlavní funkcí HSP90 je stabilizace proteinů, nebo přesněji polypeptidů, buněčného cyklu a udržování v nefunkční konformaci, až do chvíle, kdy jsou na správném místě jejich účinku, nebo je správná fáze buněčného cyklu. Taky se předpokládá, že HSP90 jsou zodpovědné za poskládání daných polypeptidů do aktivních forem ⁶¹.

Funkční strukturou HSP90 je dimerní forma. Bez navázaného ATP má vazebné místo na konci C-terminální domény vysokou afinitu k druhému HSP90 a vytváří dimer. N-terminální domény, s volnými vazebnými místy pro ATP a s nízkou afinitou pro proteiny, vážou molekuly ATP. Vazbou ATP se mění konformace N-terminálních domén, což způsobuje uzavření vazebného místa uvnitř proteinu a umožnění dimerizace N-terminálních domén. HSP90-dimer je tímto aktivní a váže polypeptid s flexibilním středem částí C-terminální domény s následným stočením do spirály. Po hydrolyze ATP se HSP90-dimer rozpadá ⁶². Tento cyklus HSP90 je zobrazen na předešlé straně na Obr. č. 5.

1.2. Proteiny související s patogenezí

Proteiny související s patogenezí (*z angl.* pathogenesis-related proteins, PR proteiny), byly poprvé nalezeny virology v rostlinách tabáku při hypersenzitivní reakci listů infikovaných virem tabákové mozaiky⁷⁸. Prvotně bylo v rostlinách tabáku identifikováno pět hlavních skupin PR proteinů, a to PR-1, PR-2, PR-3, PR-4 a PR-5⁷⁹. Později byla stanovena pravidla nomenklatury pro vytvoření skupin PR proteinů se stejným chováním. Skupiny se liší různými kritérii, jako jsou: molekulární, biochemické, serologické a jiné biologické nebo enzymatické aktivity. Aby protein mohl být zařazen mezi PR proteiny, musí se vyskytovat na určité hladině i za normálních podmínek a na výrazně zvýšené hladině při nákaze patogenem, přičemž toto musí být potvrzeno u více rostlinných druhů. Podle pravidel byly PR proteiny zařazeny do 17 skupin, primárně založených na jejich sekvencích a enzymových aktivitách^{80,81}.

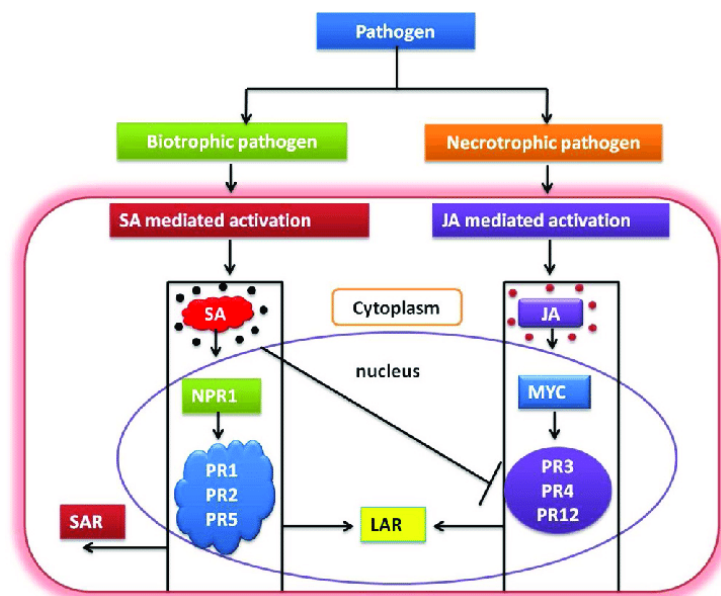
Tab. č. 1 – Tabulka popisuje funkci jednotlivých PR proteinů a organismus ve kterém byl daný PR protein poprvé nalezen⁶³.

PR protein	funkce	zdroj
PR-1	Antifungální	<i>Nicotina tabacum</i> ⁶⁴
PR-2	β-1,3-glukanasa	<i>Nicotina tabacum</i> ⁶⁴
PR-3	I, II, IV, V, VI, VII Chitinasy	<i>Nicotina tabacum</i> ⁶⁵
PR-4	I, II Chitinasy	<i>Nicotina tabacum</i> ⁶⁵
PR-5	Proteiny podobné Thaumatinu	<i>Nicotina tabacum</i> ⁶⁵
PR-6	Inhibitor proteas	<i>Solanum lycopersicum</i> ⁶⁶
PR-7	Endoproteasa	<i>Solanum lycopersicum</i> ⁶⁷
PR-8	III Chitinasa	<i>Cucumis sativus</i> ⁶⁸
PR-9	Peroxidasa	<i>Nicotina tabacum</i> ⁶⁹
PR-10	Proteiny podobné ribonukleasam	<i>Petroselinum crispum</i> ⁷⁰
PR-11	I Chitinasa	<i>Nicotina tabacum</i> ⁷¹
PR-12	Defensin	<i>Raphanus raphanistrum</i> ⁷²
PR-13	Thionin	<i>Arabidopsis thaliana</i> ⁷³
PR-14	Proteiny transferující lipidy	<i>Hordeum Vulgare</i> ⁷⁴
PR-15	Oxalát oxidasa	<i>Hordeum Vulgare</i> ⁷⁵
PR-16	Oxidasa	<i>Hordeum Vulgare</i> ⁷⁶
PR-17	Antifungální a antivirální	<i>Nicotina tabacum</i> ⁷⁷

PR proteiny jsou nízkomolekulární proteiny (6-43 kDa), které jsou stabilní při nízkém pH, vysoké teplotě a které jsou také velmi rezistentní vůči proteasam. Jsou přítomny hlavně v

primární a sekundární buněčné stěně. PR proteiny se vyskytují ve všech rostlinných částech, ale nejhojněji se vyskytují v listech, kde představují 5-10% z celkových listových proteinů⁸². PR proteiny překypují rozmanitostí v enzymové aktivitě. Patří sem: β -1,3-glukanasa (PR-2), chitinyasy (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11), inhibitory proteas (PR-6), peroxidasa (PR-9), defensin (PR-12), thionin (PR-13) a jiné. Můžeme je dále dělit i podle jejich acidity. Kyselé PR proteiny jsou převážně větší a vyskytují se v intercelulárních prostorech. Na rozdíl menší zásadité proteiny, se vyskytují v organelách a to převážně ve vakuole⁸³. Funkce PR proteinů a rostliny, ve kterých byly nalezeny, jsou sepsané v tab. č. 1 na předešlé straně.

Název „proteiny související s patogenezi“ popisuje skupinu proteinů vyvolaných v rostlinách jako odpověď na interakci s houbami, oomycetami, bakteriemi, viry a viroidy, a také na poranění listů a reakci s chemikáliemi, které napodobují účinek patogenů, a rostlinnými hormony, jako je například ethylen. Syntéza PR proteinů je startována až po několika hodinách od infekce, nebo od interakce s patogenem⁸⁴. Mnohé studie ukázaly, že PR proteiny jsou pak syntetizovány ve velkém jako reakce jak na biotický, tak i na abiotický stres⁶³.



Obr. č. 6 – Rostlinné signální kaskády po biotrofní nebo nekrotrofní infekci: Interakce s biotrofním nebo nekrotrofním patogenem startuje signální kaskádu SA, kyseliny salicylové, nebo JA, kyseliny jasmonové. Akumulace těchto defenzivních hormonů aktivuje geny skupin PR proteinů pomocí transkripčních faktorů určených pro specifickou signální kaskádu. Akumulace SA taky vede k aktivaci SAR, systémové získané rezistence, co aktivuje obranné reakce v celé rostlině. LAR, značí pro lokální získanou rezistenci⁶³.

Indukce PR proteinů je tedy spuštěna přímo patogeny a také i signálními molekulami souvisejícími s obranou (*z angl.* defense-related signaling molecules). Tyto signály jsou zachyceny speciálními membránovými receptory rozeznávajícími molekulární vzory (*z angl.* pattern recognition receptors), které spouští kaskádu obranných reakcí, končící u syntézy PR proteinů. Obecně se patogeny dělí na biotrofní a nekrotrofní. Biotrofní patogeny aktivují kaskádu reakcí pomocí kyseliny salicylové. Tyto reakce spouštějí transkripci NPR-1 genu, který spouští syntézu skupiny PR proteinů kyseliny salicylové, a to PR-1, PR-2 a PR-5, které působí lokálně v buňce, tak i mimo buňku. Zatímco nekrotrofní patogeny aktivují kaskádu kyseliny jasmonové, ve které se aktivuje skupina genů pro PR proteiny PR-3, PR-4 a PR-12, působící jenom lokální ochranu buňky⁸⁵. Dané kaskády jsou zobrazeny na Obr. č. 6 na následující straně.

1.2.1. PR-1

PR-1 proteiny se řadí mezi nejhojněji se vyskytující PR proteiny. V listech tvoří v průměru 1-2% ze všech proteinů za normálních podmínek. Byly to také první PR proteiny, které byly objeveny jako odpověď na infekci patogenem. Navzdory mnoha studiím, nebyla dosud nalezena biochemická funkce těchto proteinů⁸⁶. Odhadovaná životnost PR-1 proteinů je od 40 do 70 hodin. Tato vysoká životnost naznačuje vysokou relativní resistenci proti exogenním a endogenním proteasám. Odolnost je způsobena vysokým obsahem cysteinů, které tvoří disulfidické můstky. Dlouhá životnost a stabilita vůči proteolytickým útokům, ukazují na dobrou adaptaci PR-1 na extracelulární prostor⁸⁷.

Vysoký nárůst PR-1 proteinů byl zaznamenán u tabáku po infekci vyvolané oomycetami *Peronospora tabacina* a *Phytophthora parasitica*, což rapidně snížilo symptomy⁸⁸. Z toho byl vysloven předpoklad antifungální aktivity PR-1 proteinů. Antifungální aktivita byla potvrzena také proti jiným patogenům jako *Uromyces fabae* a *Phytophthora infestans*. Po aplikaci alikvotu PR-1 proteinů na listy tabáku, byl zaznamenán rapidní pokles šíření *Phytophthora infestans* a další studie ukázaly, že především bazické PR-1 proteiny mají negativní účinky na oomycety⁸⁹.

Studie výskytu různých PR-1 proteinů v infikovaných rostlinách ukázaly mnoho míst účinku. Vlivem infekce rostlin rajčete viroidy a také u rostlin tabáku při vystavení tmě, byly PR-1 proteiny nalezeny ve vakuole ^{90,91}. V infikovaných listech brambor oomycetou *P. infestans*, byly PR-1 proteiny nalezeny v epidermis listu včetně svěřacích buněk stomat, v mezibuněčném prostoru, v buněčné stěně, v xylému a ve floému ⁹². Dixon et al., popsal akumulaci PR-1a a b po virové infekci ve vakuolách specializovaných buněk listů, známých jako idioblasty. V těchto buňkách byla ale také zjištěna přítomnost speciálních proteolytických enzymů zodpovědných za rozklad PR proteinů ⁹³. Dále byly nalezeny zvýšené koncentrace PR-1 proteinů v okolí plasmodesmat floému mezi sítkovicemi a průvodními buňkami pro zamezení šíření infekce do vzdálených částí rostlin ⁹⁴.

Zatím bylo identifikováno mnoho izoform a izoenzymů PR-1 proteinů lišící se jejich enzymovou aktivitou, místem účinku a strukturou. Obecně byly PR-1 proteiny rozděleny do dvou skupin, na kyselé a bazické. Kyselé PR-1 proteiny setrvávají rozpustné i v pH 3, přičemž většina ostatních rostlinných proteinů se již denaturuje. U rostlin tabáku byly nalezeny tři, sekvenčně sobě podobné, PR-1 kyselé proteiny, vykazující antifungální aktivitu. Tyto proteiny vycházejí z podobných řetězců o délce 138 aminokyselin, ze kterých se po odštěpení hydrofobního N-terminálního konce, o délce 30 aminokyselin, vytváří finální 15 kDa protein. Mezi těmito kyselými PR proteiny je sekvenční shoda více než 90% ⁷⁹.

V rostlinách tabáku byly zatím definovány dva bazické PR-1 proteiny, přičemž studie genetické informace naznačují geny kódující alespoň osm bazických PR-1 proteinů. Tyto bazické PR-1 jsou přibližně z 65% shodné v sekvenci s kyselými PR-1 ⁹⁵. Poprvé byl objeven 17 kDa bazický protein, PR-1g, se sekvenční podobností s menšími kyselými PR-1 proteiny tabáku. Hydrofobní N-terminální, 30 aminokyselinová, sekvence, se na rozdíl od kyselých PR-1 proteinů neodštěpuje a pravděpodobně má funkci při přesunu PR proteinů do endoplasmatického retikula ⁹⁶. Delší C-terminální sekvence u bazických PR-1 proteinů, než u kyselých má pravděpodobně signální funkci při přesunu do vakuoly, protože byla zjištěna vyšší koncentrace bazických proteinů ve vakuole během infekce ⁹⁷. PR-1g byly také nalezeny v extracelulárním prostoru a tedy se předpokládá, že kyselé i bazické PR-1 proteiny nejsou vázány na specifické místo ⁸⁹.

1.2.2. PR-2

Dříve byly PR-2 proteiny pojmenovány jako laminarinasy, zvyšují v rostlinách resistenci proti plísňovým, bakteriálním a virovým patogenům⁹⁸. Kromě rostlin, byly PR-2 proteiny nalezeny taky v kvasinkách, baktériích, hmyzu a v rybách⁹⁹. Do skupiny PR-2 proteinů patří proteiny s enzymovou, β -1,3-endoglukanasovou, aktivitou. Katalyzují štěpení β -1,3-glukosidické vazby¹⁰⁰, kde glukany tvoří základ buněčné stěny mnohých patogenů. Například u oomycety, *Phytophthora infestans*, která napadá mnohé zemědělské rostliny, β -1,3-glukany tvoří až 90% buněčné stěny¹⁰¹.

Rostlinné PR-2 proteiny jsou za normálních podmínek udržovány na velmi nízkých, nebo až nulových, koncentracích. Ale po interakci s patogenem se jejich koncentrace rapidně zvyšuje. Například, po napadení transgenních rostlin podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*), schopných exprese tabákového PR-2 proteinu patogenní houbou „listových skvrn“, *Cercospora arachidicola*, transgenní rostliny nejen zredukovaly celkový počet skvrn na listech, ale také zpozdily nástup infekce. Také po napadení patogenní houbou, *Aspergillus flavus*, bylo pozorováno velmi pomalé šíření hyf a snížená akumulace aflatoxinů v semenech podzemnice olejné¹⁰². Napadení další patogenní houbou, *Fusarium graminearum*, způsobuje devastační chorobu ječmene a obilí nazývanou „plíseň hlavičková“. Transgenní rostliny exprimující PR-2 vykazaly vysokou odolnost vůči této patogenní houbě. Byla detekována rapidně snížená koncentrace mykotoxinu, deoxynivalenolu a také viditelné snížené šíření plísně¹⁰³. A dále mnoho dalších studií ukázalo zvýšenou resistenci transgenních rostlin, jako jsou len setý, rajče jedlé a kostřava rákosovitá vůči mnohým plísňovým a jiným patogenům díky dodatečné expresi PR-2 proteinů.

Mnoho virů se pohybuje a šíří po rostlině přes buněčné plasmodesmy za pomoci jednoho, nebo i více, pohybových virových proteinů (z angl. movement proteins, MP), které vyhledávají a rozšiřují plazmodezmy a umožňují tedy pohyb virů po celé rostlině¹⁰⁴. Jediným, dosud známým mechanismem obrany proti šíření virů do celé rostliny je syntéza kalózových vláken přes plasmodesmy. Kalóza je tvořena β -1,3-glukanem a mnohé studie potvrdily, že viry, dosud ještě neznámým způsobem, využívají cytoplasmatické PR-2 proteiny pro lýzi kalózy¹⁰⁵. Později bylo však zjištěno, že rostliny na obranu proti virům

využívajícím pohybových proteinů a rostlinných PR-2 proteinů, inhibují transkripci genů pro určité PR-2 proteiny ¹⁰⁶.

Iniciace syntézy PR-2 proteinů může být způsobena patogeny, nebo i jinými stimuly. β -1,3-glukany jsou hojně rozšířené po celé rostlině, a kromě rostlinné ochrany, mohou participovat i na mnoho dalších fyziologických procesech, jako jsou růst buněk, buněčné dělení, klíčení semen a mnoho dalších ¹⁰⁷. Geny PR-2 proteinů byly nalezeny u mnoha rostlinných druhů, včetně tabáku, sóji, banánovníku a rýže. Každá rostlina může obsahovat rozdílné geny, o rozdílných počtech, kódující rozdílné PR-2 proteiny. Například bylo nalezeno 14 genů kódujících β -1,3-glukanasy v rostlinách tabáku ¹⁰⁸ a až 50 individuálních genů v rostlinách huseníčku (*Arabidopsis*). Nedávné studie seskupily tyto geny do 13 genových klastrů s označením od A do M ¹⁰⁹. Skupiny od A do C kódují PR-2 proteiny specifické pro listy. Skupina D kóduje specifické pro buňky kořenů. PR-2 proteiny těchto čtyř skupin vykazují nejvyšší aktivitu a během obranného mechanismu proti patogenům jsou tyto klastry také nejvíce transkripčně aktivní. Dále skupiny H a K kódují PR-2 proteiny specifické pro květy a plody rostlin, které jsou hlavně aktivní při reprodukčních procesech. Poslední, největší skupina M, která obsahuje 13 genů, kóduje proteiny vyskytující se ve všech částech rostliny. Vysoké koncentrace můžeme pozorovat hlavně ve výhoncích. Předpokládá se, že tato skupina PR-2 proteinů se účastní buněčné morfogeneze a také buněčného dělení. Avšak ze skupiny M nebyla potvrzena odpověď vůči biotickému stresu, a proto se diskutuje, zda patří do skupiny PR proteinů ¹⁰⁵.

Rostlinné PR-2 proteiny se podobně jako jiné PR proteiny dělí na dvě izoformní skupiny závislé na jejich aciditě. Všeobecně, pro všechny rostliny, PR-2 proteiny byly rozděleny do čtyř tříd, závislých na jejich aminokyselinové sekvenci, struktuře a buněčné lokalizaci, a to s označením od I do IV ¹⁰⁸. Většina dosud objevených PR-2 proteinů patří do třídy I a II a drtivá většina z třídy I je tvořena bazickými enzymy. Na druhou stranu, třídy II až IV jsou tvořeny kyselými proteiny lokalizovanými v extracelulárním prostoru, kdežto PR-2 proteiny I jsou lokalizovány ve vakuole uvnitř buněk.

PR-2 se přímo podílí na ochraně rostlin díky jejich hydrolytické aktivitě proti buněčné stěně houbových patogenů. Většinou byly PR-2 proteiny třídy I nalezeny spolu s PR-3 proteiny, které jako chitinasy, jejich antifungální účinek doplňují. Bylo zjištěno, že PR-2 proteiny třídy I přímo reagují proti buněčným stěnám degradací jejich β -1,3, nebo 1,6-glukanů. Degradace buněčné stěny hyf způsobuje jejich buněčnou lyzi, což nejen otevírá

prostor pro další molekuly rostlinné ochrany, ale také poskytuje oligomerní fragmenty buněčné stěny, které iniciují další syntézu PR proteinů, nebo jiných antifungálních sloučenin, jako jsou fytoalexiny^{110,111}. Naproti tomu PR-2 proteiny třídy II nevykázaly žádný antifungální efekt¹¹². Akumulace a syntéza PR-2 proteinů třídy I byla zjištěna až po infekci patogenem, kdežto PR-2 třídy II a III se v buňkách vyskytují konstitutivně a zvýšeně při infekci¹¹³.

Dosud objevené PR-2 proteiny mají přibližnou velikost od 30 do 40 kDa. Bazické PR-2 proteiny třídy I, o přibližné velikosti 33 kDa, jsou syntetizovány jako preproteiny s hydrofobní signální sekvencí na N-terminálním konci, která je následně kotranslačně odstraněna. Taky obsahují N-glykosylovanou signální sekvenci na C-terminálním konci a předpokládá se, že hlavní úlohou je lokalizace vakuol v buňce. Zbylé třídy postrádají danou sekvenci a jsou proto odváděny do extracelulárního prostoru. Proproteiny jsou následně z ER, přes Golgiho aparát, transportovány do vakuoly, kde je C-terminální sekvence odstraněna a vzniká 33 kDa finální protein¹¹⁴. Z vakuoly jsou tyto bazické proteiny, po iniciaci patogenem, vypouštěny do daného místa účinku¹¹⁵. Zbylé tři skupiny PR-2 proteinů jsou ihned po syntéze transportovány do extracelulárního prostoru. Tyto proteiny postrádají C-terminální sekvenci, kterou PR-2 proteiny I. třídy mají a velikostně se většina pohybuje od 35 do 36 kDa¹¹⁶, ale také byly nalezeny v květech tabáku dva proteiny o velikosti 41 kDa, u kterých se avšak nepotvrdila iniciace infekcí patogenem.

1.2.3. PR-3

Jedná se o skupinu PR proteinů vyskytující se ve všech částech buňky. PR-3 proteiny patří mezi enzymy s endochitinasovou aktivitou, kde tato aktivita je u bazických proteinů pět-krát vyšší než u kyselých. Enzymaticky katalyzují hydrolýzu β -1,4-vazby mezi N-acetylglukosaminovými zbytky chitinu, kteří tvoří hlavní polysacharid exoskeletu bezstavovců a buněčné stěny některých plísní. Relativní hmotnost PR-3 proteinů se pohybuje v rozmezí od 26 do 46 kDa¹¹⁷.

PR proteiny s chitinasovou aktivitou byly kvůli jejich početnému zastoupení rozděleny mezi čtyři skupiny na základě jejich aminokyselinových sekvencí. Skupinu PR-3 proteinů tvoří enzymy s charakteristikou katalytickou doménou a velmi podobnými terciálními strukturami ¹¹⁸. Globulární struktura je tvořena hlavně α -helixy, které jsou uspořádané do tvaru žlábků. Uvnitř žlábků se nachází katalytické centrum, tvořené dvěma glutamátovými zbytky ¹¹⁹. Všeobecně se chitinasy dále dělí podle terciální homologie, velikosti a přítomnosti domény vázající chitin (chitin-binding domain, CBD) do specifitějších 7 tříd. Do skupiny PR-3 proteinů patří třída I, která na rozdíl od třídy II, obsahuje CBD. Třída IV obsahuje zkrácenou verzi CBD a katalytické domény v porovnání s třídou I. Dále třídy V a VI, obsahují dvě CBD, nebo jednu zkrácenou CBD spolu s dlouhou sekvencí bohatou na prolin. Poslední VII. třída obsahuje katalytickou doménu homologní k třídě IV, ale postrádá CBD. Všechny třídy dále obsahují podobné specifické smyčky označené od 1 do 4. Smyčka 1, nacházející se na vrcholu žlábků, poskytuje místo pro glykosylaci. Smyčka 2 se nachází na spodní části enzymu, pod katalytickým místem, a slouží pro stabilizaci 3D struktury disulfidickým můstkem. Zbylé dvě smyčky se nacházejí na povrchu, daleko od katalytického místa blízko u sebe. Smyčka 3 má za úkol stabilizovat smyčku 4, která tvoří koncovou sekvenci na C-terminálním konci s cysteinem, jako koncovou aminokyselinou, vytvářející disulfidický můstek ¹⁰⁸.

Třída I RP-3 proteinů byla poprvé popsána u rostlin tabáku a byly zařazeny mezi bazické proteiny o velikosti 32 kDa ¹²⁰. U tabáku byly nalezeny čtyři geny kódující PR-3 proteiny, z čehož dva se transkribují primárně. Jsou syntetizovány jako prekurzory s N-terminální signální sekvencí, umožňující jejich sekreci. Většina PR-3 proteinů obsahuje taky speciální C-terminální signální sekvenci cílenou pro transport do vakuol ¹²¹. Zralé PR-3 proteiny I. třídy obsahují N-terminální CBD a katalytickou doménu, mezi kterými je mezerní sekvence bohatá na prolin nebo glycin, lišící se délkou u jednotlivých proteinů ¹²². Další modifikace byla objevena u PR-3 proteinů brambor, která má jednu stranu bohatě N-glykosylovanou ¹²³.

Hlavní dva PR-3 proteiny II. třídy, byly opět popsány v rostlinách tabáku, se značením PR-Q a PR-P. Třída II, v porovnání s I. třídou, postrádá CBD a taky střední doména je kratší, což zamezuje vzniku 2. smyčky a finální proteiny mají relativní molekulovou hmotnost v rozmezí 27-28 kDa. Porovnáním sekvencí u proteinů II. třídy naznačuje, že CBD byly ztraceny různými způsoby u všech proteinů. Bylo také zjištěno, že některé PR-3 proteiny II.

třídy postrádají i 1. smyčku. Byly proto vytvořeny podtřídy, a a b, do kterých byly proteiny 2. třídy rozděleny podle struktury.

Prvně objevena IV. třída byla u fazolí. Byly nazvány jako PR-4 proteiny ¹²⁴. Později byly zahrnuty do PR-3 proteinů, sice mají velmi nízkou homologii s ostatními skupinami. Jsou to proteiny o velikosti 30 kDa a obsahují zkrácenou verzi CBD, kde chybí jedna ze smyček bez ovlivňování aktivity. V katalytické doméně, proteiny IV. třídy neobsahují 1 smyčku, což zkracuje vzdálenost mezi katalytickým centrem a povrchem enzymu, což by mohlo mít za následky hydrolýzu buněčné stěny dále od povrchu. Delece smyčky 3 a 4 celkově snižuje objem enzymu.

Třídou V, o velikosti 41-43 kDa, reprezentuje zatím jeden protein. Jako jediný, z pomezí PR-3 proteinů, obsahuje 2 CBD ¹²⁵.

Prvně byla VI. třída objevena v cukrové řepě ¹²⁶. Obsahuje zkrácenou verzi CBD, kde se tvoří jenom jeden disulfidický můstek, což tvoří protein o velikosti 28 kDa. Tato třída obsahuje nejdelší prolinovou sekvenci mezi CBD a katalytickou doménou, až 90 prolinů. Z toho se dá předpokládat, že se tato třída vyskytuje stabilně v buněčné stěně.

2. Cíl práce

1. Zavést a optimalizovat imunochemické stanovení proteinů teplotního šoku HSP70, HSP90 a proteinů souvisejících s patogenzí PR-1, PR-2 a PR-3 v rostlinách rajčete jedlého a řepky olejně
2. Zjistit vliv oomycety *Pythium oligandrum* v rostlinách rajčete jedlého a řepky olejně na expresi HSP70, HSP90, PR-1, PR-2 a PR-3
3. Zjistit vliv patogenních hub *Verticillium longisporum* a *Alternaria brassicola* na expresi HSP70, HSP90, PR-1, PR-2 a PR-3

3. Materiály a metody

3.1. Přístroje

Analytické váhy XE Series 100A, *Denver Instrument Company*, USA

Centrifuga Universal 32R, *Hettich Zentrifugen*, Německo

Čtečka absorbancí destiček Sunrise, *Tecan*, Švýcarsko

Elektroforetická souprava, *Bio-Rad*, UK

Souprava pro přenos proteinů z gelu na membránu Trans-Blot[®] Turbo[™], *Bio-Rad*, UK

Vortex V-1 plus, *Biosan*, Litva

3.2. Chemikálie a rozpouštědla

5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát, *Sigma*, USA

akrylamid, *Sigma*, USA

azid sodný, *Fluka*, Velká Británie

bisakrylamid, *Sigma*, USA

bromfenolová modř, *Sigma*, USA

hovězí sérový albumin, *Sevac*, ČR

dihydrogenfosforečnan draselný, *Penta*, ČR

dithiothreitol, *Sigma*, USA

dodecylsulfát sodný, *Serva*, Německo

ethanol, *Lachema*, ČR

glycerol, *Penta*, ČR

glycin, *Degussa*, ČR

kyselina fosforečná,

hydrogenfosforečnan sodný, *Penta*, ČR

hydroxid sodný, *Lachema*, ČR
chlorid draselný, *Lachema*, ČR
chlorid sodný, *Lachema*, ČR
kyselina chlorovodíková, *Penta*, ČR
kyselina octová, *Penta*, ČR
merkptoethanol,
methanol, *Penta*, ČR
Nitroblue tetrazolium chlorid, *Sigma*, USA
N,N,N',N' - tetramethylethylendiamin, *Serva*, Německo
peroxodisíran amonný, *Lachema*, ČR
polyvinylpyrrolidon, *Sigma*, USA
tris(hydroxymethyl)aminomethan, *Sigma*, USA
Tween 20, *Sigma*, USA

3.3. Protilátky

Pro kvalitativní stanovení specifických proteinů byly použity primární králičí monoklonální protilátky IgG proti pěti různým proteinům.

Anti HSP70 - AS08 371 (lyofilizovaný, *Agrisera*, SWE)

Anti HSP90 - AS08 346 (lyofilizovaný, *Agrisera*, SWE)

Anti PR-1 - AS10 687 (lyofilizovaný, *Agrisera*, SWE)

Anti PR-2 - AS12 2366 (lyofilizovaný, *Agrisera*, SWE)

Anti PR-2 - AS07 208 (lyofilizovaný, *Agrisera*, SWE)

Anti PR-3 - AS07 207 (lyofilizovaný, *Agrisera*, SWE)

Jako sekundární protilátka pro vizualizaci byla použita kozí polyklonální protilátka proti králičí IgG konjugovaná alkalickou fosfatase - SLBV4176/A3687-1ML (*Sigma*, USA)

3.4. Rostliny

Rostlinné materiály byly z rostlin rajčete (*Solanum lycopersicum*) a rostlin řepky olejně (*Brassica napus*), které byly poskytnuty Ing. Tomášem Vaňkem, Ph.D. (Biopreparáty spol. s r.o.). Semena rostlin byla mořena v rostoku obsahujícím 12.0×10^6 oospor·g⁻¹ *P. oligandrum*. V této práci byly použity tři kmeny *P. oligandrum*: komerčně používaný preparát M1 a dva dosud nepoužívané kmeny 42 a 48. Všechny rostlinné semena, společně s neošetřenými semeny, byla pěstována v kultivační místnosti při teplotě 20 °C, 60% relativní vlhkosti vzduchu a osvětlení 150 μmol fotonu m²·s⁻¹. V místnosti byl režim 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Po dvou týdnech kultivace byly listy rostlin inokulovány houbovými patogeny *Verticillium longisporum* a *Alternaria brassicola*. Po 2 týdnech od inokulace byly odebrány vzorky listů, které byly okamžitě zmrazeny v kapalném dusíku a uchovávány při -78 °C.

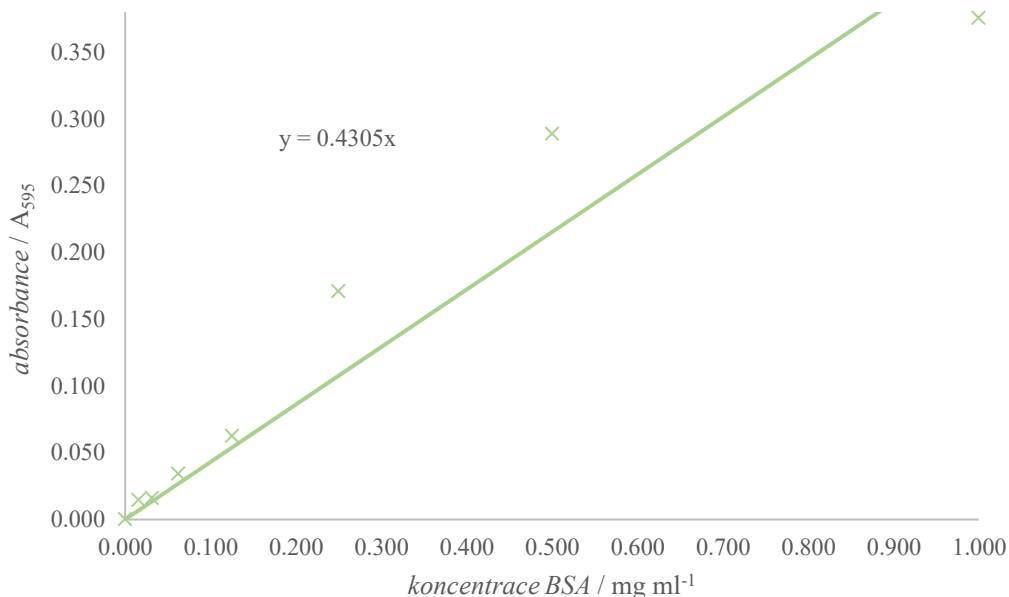
3.5. Experimentální metody

3.5.1. Extrakce proteinů z rostlinného materiálu

Listy z řepky olejně a rajčete jedlého byly nejprve ve třecí misce rozdrobeny a homogenizovány v tekutém dusíku a následně extrahovány ve dvojnásobném množství extrakčního pufru složeného z 0.13M Tris-HCl pufru o pH 6.8, 2% (w/v) SDS a DTT. Vzniklý homogenát byl převeden do mikrozkuhavky a ponechán stát, tak aby extrakce trvala 12 minut. Následně byl extrakt centrifugován 15 minut při 4°C a 15000 x g. Vzniklý supernatant byl použit ke stanovení koncentrace proteinů a ke kvalitativnímu stanovení HSP a PR proteinů.

3.5.2. Stanovení koncentrace proteinů podle Bradforda

Bradfordova metoda pro stanovení koncentrace proteinů v roztoku je kolorimetrická metoda založena na absorpčním maximu barviva Coomasie Brilliant blue G-250 po navázání na protein. Interakce barviva s proteinem v kyselém prostředí mění barvu roztoku z hnědé, s absorpčním maximem při 450 nm, na modrou, s maximem 595 nm. Změna absorpčního maxima barviva je způsobena interakcemi molekul s bazickými aminokyselinami v proteinu. Pro kalibraci byly použity roztoky hovězího sérového albuminu, BSA, o koncentraci 1.00, 0.500, 0.250, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0156 a 0.00 mg ml⁻¹. Do mikrotitrační destičky bylo aplikováno, vždy v triplicátech, po 10 µl roztoků proteinů. K roztokům bylo následně přidáno 200 µl barvicího činidla o složení Coomasie Brilliant blue G-250, metanol, H₃PO₄, a ponechány inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byla měřena absorbance při 595 nm. Roztoky rostlinných izolátů byly 10x ředěny pro stanovení koncentrace proteinů. Názorná kalibrační přímka, podle které byly vypočteny koncentrace proteinů u rostlin rajčete jedlého, je zobrazena na Obr. č. 7.



Obr. č. 7 – Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinů v rostlinných extraktech z rostlin rajčete: Graf vyjadřuje závislost absorbance při 595 nm na koncentraci BSA v roztoku.

3.5.3. Elektroforetické metody

Pomocí elektroforetické separace v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného, SDS, byly separovány jednotlivé proteiny. SDS je iontový tenzid, který protein po zahřátí denaturuje. Ionty SDS pokrývají rozbalené proteiny a udělují jim rovnoměrně rozložený záporný náboj, který je přímo úměrný hmotnosti peptidového řetězce. Působením externího stejnosměrného elektrického proudu dochází k separaci jednotlivých proteinů podle molekulových hmotností. Následným přenosem separovaných proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu působením externího elektrického pole lze imunochemicky stanovit jednotlivé proteiny.

3.5.3.1. Příprava rostlinných extraktů pro elektroforézu v redukčním prostředí

K přípravě rostlinných izolátů pro elektroforetickou separaci v prostředí SDS byly použity izoláty z řepky a rajčete (3.5.1). Rostlinné izoláty byly v poměru 1:1 smísené se vzorkovým redukčním pufrům o složení 0.13M Tris-HCl pufr o pH 6.8, sacharóza, 3% (w/v) SDS, DTT a 0.05% (w/v) bromfenolová modř. Vzniklé roztoky byly před aplikací do gelu zahřáty na 100°C po dobu 5 min. a následně byly ochlazeny na laboratorní teplotu.

3.5.3.2. Provedení SDS-PAGE

Akrylamidový gel pro elektroforézu byl složen ze zaostřovacího velkopórového 6% gelu a separačního malopórového 12% gelu. První separační 12% gel byl vytvořen ze 4.9 ml deionizované vody, 6 ml 30% (w/v) akrylamidu/bisakrylamidu, 3.8 ml 1.5M Tris-HCl pufru o pH 8.8, 150 μ l 10% (w/v) SDS, 6 μ l TEMED a 150 μ l 10% (w/v) peroxodisíranu amonného, APS. Následně byl separační gel překryt zaostřovacím 6% gelem složeného z 2.7

ml deionizované vody, 670 μ l 30% (w/v) akrylamidu/bisakrylamidu, 500 μ l 0.5M Tris-HCl pufru o pH 6.8, 40 μ l 10% (w/v) SDS, 4 μ l TEMED a 40 μ l 10% (w/v) APS.

Po složení elektroforetické aparatury, která byla předem odmaštěna etanolem, byly prostory naplněny elektrodoým pufrém složeného z 14.4 g glycinu, 3 g Trisu a 1 g SDS v 1 l deionizované vody s celkovou hodnotou pH 8.3. Před aplikací izolátů byla zjištěna koncentrace proteinů metodou podle Bradforda a následně koncentrace proteinů byla tak upravena, aby byla pro každý roztok shodná. Jako standard molekulových hmotností byl použit komerční roztok proteinů Precision Plus Protein Kaleidoscope™ Standards s proteiny o molekulové hmotnosti 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa se specifickým barevným odlišením žlutě zbarveného proteinu s molekulovou hmotností 10 kDa, zeleně zbarveného proteinu při 37 kDa a růžově zbarvených proteinech při 25 a 75 kDa. Napětí bylo nastaveno pro zaostřovací gel na 70 V a následně po doputování bromfenolové modři do separačního gelu byla hodnota napětí zvýšena na 140 V.

3.5.3.3. Provedení elektro-přenosu

Proteiny separované v akrylamidovém gelu byly přeneseny na nitrocelulosovou membránu pomocí metody elektro-přenosu, neboli Western blot (z angličtiny „blotting“). Do soupravy, určené pro elektro-přenos, Trans-Blot® Turbo™ bylo podle návodu nejprve umístěno 5 kusů filtračního papíru, nitrocelulosová membrána pak na ní akrylamidový gel a dalších 5 kusů filtračního papíru. Všechny vrstvy byly nejprve namočeny do transferového pufru o pH 8.3 o složení 25 mM Tris-HCl, 150 mM glycin a 10% (v/v) methanol. Pak byl nastaven 30 minutový standardní elektro-přenos o proudu 1.0 a.

3.5.4. Imunochemické stanovení HSP a PR proteinů

Proteiny po elektroforetické separaci v redukčním prostředí SDS byly z gelu přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Na membráně byly pak HSP, nebo PR proteiny, detekovány imunochemicky pomocí specifických protilátek.

Imunochemická detekce HSP, nebo PR proteinů, je založena na principu specifické vazby primárních králičích protilátek proti HSP, nebo PR proteinů. Pro vizualizaci se proti primárním králičím protilátkám použila sekundární kozí protilátka konjugovaná alkalickou fosfatase, ALP - E.C. 3.1.3.1. Alkalická fosfatasa katalyzuje odštěpení fosfátu ze substrátu 5-bromo-4-chloro-3-indoylfosfát (BCIP). Vzniklý meziproduct reakce, indoxyl, v alkalickém prostředí dimerizuje a jako vedlejší produkt reakce vzniká hydridový ion, který redukuje nitroblue tetrazolium chlorid (NBT) za vzniku barevné sraženiny diformazanu.

Po ukončení elektro-přenosu byla volná místa na membráně blokována po dobu 1 hodiny 1% (w/v) roztokem BSA v pufru PBS + T o pH 7.4 složeného ze 137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 15 mM KH₂PO₄, 3.7 mM KCl, 3 mM NaN₃ a 0.05% (w/v) Tween 20. Následně byla membrána 3x promyta po dobu 5 minut PBS + T pufrem. Následně byla membrána inkubována s primární králičí protilátkou specifickou proti HSP, nebo PR proteinu, ředěnou podle návodu, od 5000x do 1000x, konjugačním pufrem o pH 7.4 složeného z PBS + T pufru, 2% (w/v) PVP a 0.2% (w/v) BSA. Inkubace byla provedena přes noc při laboratorní teplotě. Membrána byla po navázání primární protilátky opět promyta 3x PBS + T pufrem po 5 minut a pak inkubována v termostatu při 37°C spolu se sekundární kozí protilátkou, proti králičímu IgG, konjugovanou s alkalickou fosfatázou 10 000x ředěnou konjugačním pufrem po dobu 4 hodin. Znovu byla membrána promyta 3x PBS + T pufrem a následně inkubována v reakční směsi při laboratorní teplotě až dokud se neobjevily proužky značící detekované proteiny. Reakční směs tvořil roztok 10 ml substrátového pufru o pH 9.8, 0.2 mg BCIP a 0.3 mg NBT.

4. Výsledky

V této bakalářské práci byly porovnávány vlastnosti rostlin rajčete jedlého, *Solanum lycopersicum*, a řepky olejně, *Brassica napus*, ošetřených třemi různými kmeny *P. oligandrum*, a sice M1, který je v současné době vyráběn jako prostředek biologické ochrany rostlin a dvou nových, které jsou označeny 42 a 48. Všechny tyto skupiny rostlin, včetně neošetřené kontroly, označené N jako neošetřený, byly rovněž infikovány fytopatogeny *V. longisporum* a *A. brassicola*. Pokud není uvedeno jinak, termín "izolát" označuje extrakt z listů experimentálních skupin rostlin.

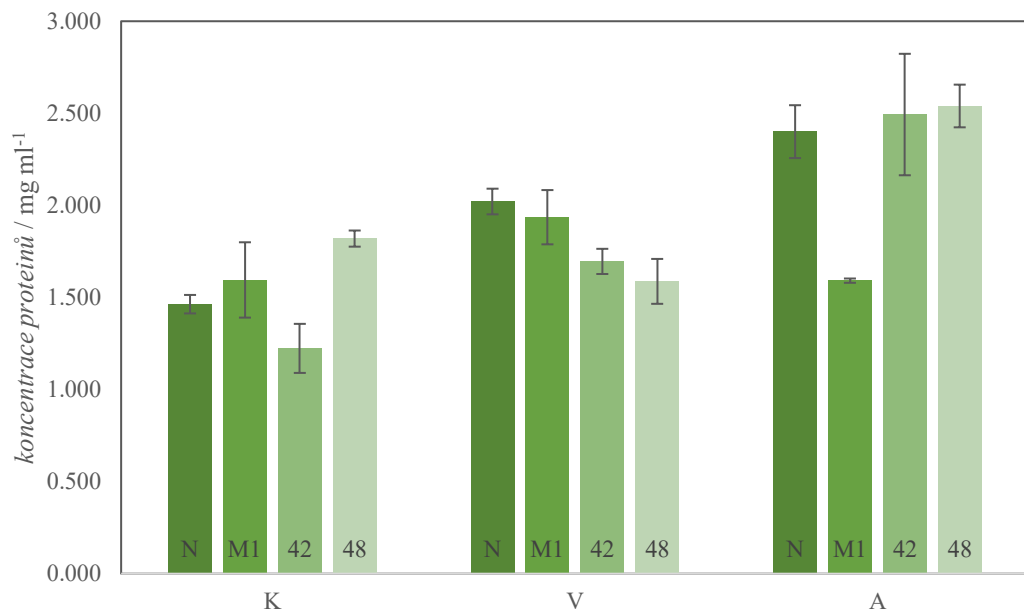
4.1. Množství proteinů v izolátech z rostlin rajčete jedlého ošetřených oomycetami *Pythium oligandrum*

Izoláty z listů rostlin rajčete jedlého ošetřené *P. oligandrum* a infikované fytopatogenními houbami byly charakterizovány množstvím proteinu. Získané výsledky dokumentuje Obr. č. 8. Rozdíly v množství proteinu mezi izoláty rajčat ošetřených *P. oligandrum* nejsou příliš velké, nejnižší v rostlinách ošetřených 42. V rostlinách infikovaných je množství proteinů mírně zvýšené. Nejnižší hodnota platí pro rostliny ošetřené M1 a infikované *A. brassicola*.

Po provedení extrakce proteinů z rostlinných materiálů (kapitola 3.5.1.), bylo nutné zjistit celkovou koncentraci všech proteinů v jednotlivých izolátech. Koncentrace proteinů byly zjištěny metodou podle Bradforda (kapitola 3.5.2.), kde byla sestrojena kalibrační přímka (Obr. č. 7) s využitím roztoků BSA o známé koncentraci. Získaná rovnice kalibrační přímky byla použita pro výpočet koncentrací proteinů v izolátech z listů rajčete.

Výsledné hodnoty koncentrací proteinů v jednotlivých izolátech jsou zobrazené na Obr. č. 8, na následující straně. Průměrná koncentrace vyextrahovaných proteinů je přibližně 2 mg ml⁻¹. V rámci jednotlivých skupin, se koncentrace pohybují v malém rozmezí, kromě izolátu M1 infikovaného *A. brassicola*, který na rozdíl od ostatních izolátů dané skupiny obsahuje výrazně nižší koncentrace. Obecně, hodnoty koncentrací všech proteinů závisí

nejen na fyziologickém stavu rostliny, ale také na technice a době extrakce. Pro následující imunochemická stanovení HSP a PR proteinů, bylo nutno izoláty zředit extrakčním pufrům



na stejnou koncentraci.

Obr. č. 8 – Koncentrace rozpustných proteinů v extraktech z listů rajčete: Levá skupina, K, značí kontrolní skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty oomycety *P. oligandrum*, kde N, značí neošetřený izolát, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny *P. oligandrum*.

4.2. Sledování přítomnosti heat shock proteinů v izolátech z rajčete jedlého

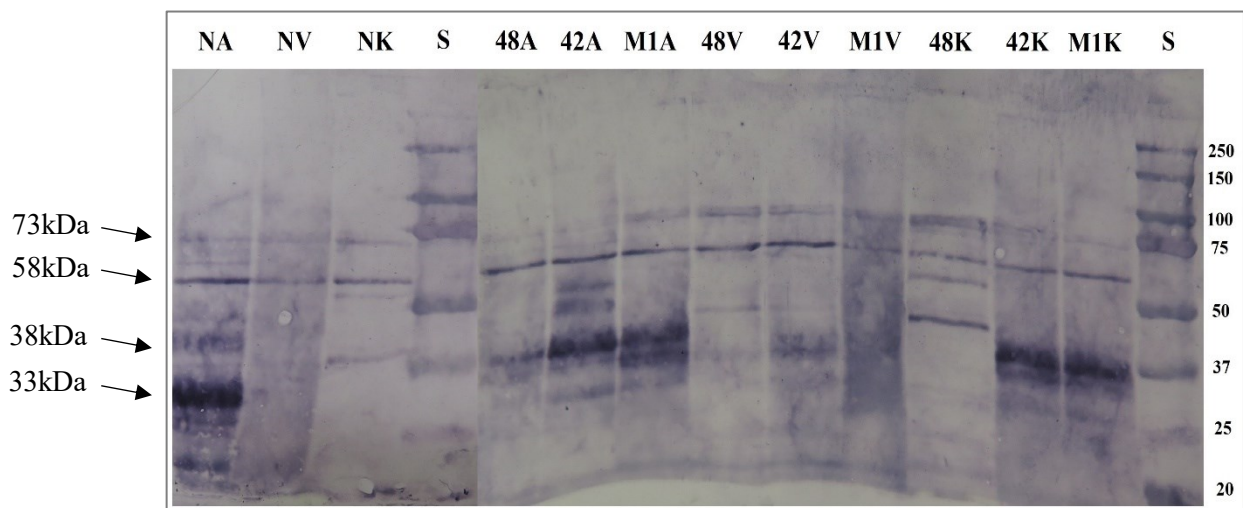
V izolátech všech experimentálních skupin rostlin, bylo imunochemicky podle kapitoly 3.5.4. sledováno zastoupení heat-shock proteinů.

4.2.1. HSP70

Skupina proteinů označovaných jako HSP70 souvisí s různými typy stresu, proto bylo sledováno také zastoupení těchto proteinů v rostlinách rajčete ošetřených *P. oligandrum* a infikované fytopatogenními houbami. Proteiny byly elektroforeticky separovány v prostředí SDS, přeneseny na nitrocelulosovou membránu a detekovány imunochemicky pomocí specifické primární protilátky proti HSP70.

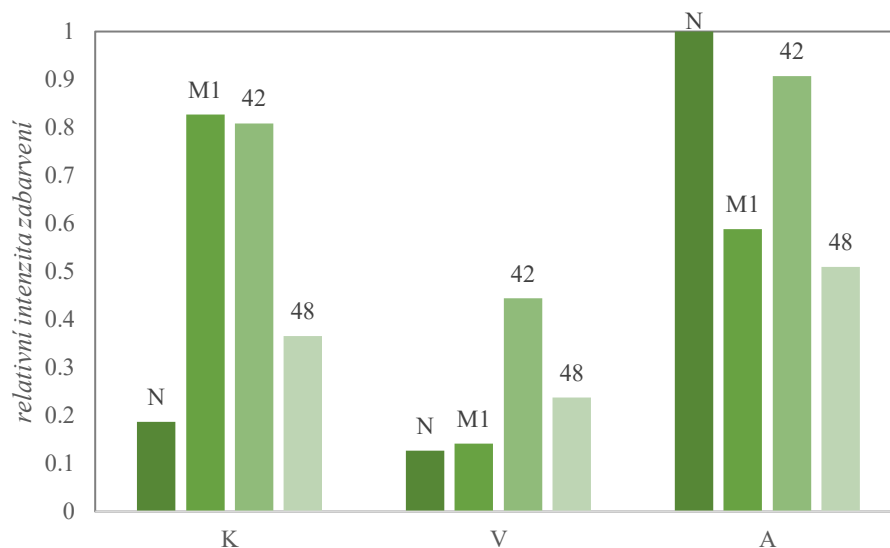
Jeden z cílových proteinů sledovaných jako odpověď na biotický stres v této práci je HSP70. Získané rozpustné proteiny z rostlinných izolátů, byly elektroforeticky separovány v denaturujícím prostředí SDS. Přítomnost HSP70 v rostlinách rajčete byla po přenosu proteinů z elektroforetického gelu na nitrocelulosovou membránu detekována imunochemicky specifickou protilátkou proti HSP70.

Membrána vizualizovaná pomocí sekundární protilátky značené alkalickou fosfatase je znázorněna na Obr. č. 9, na následující straně. Proteiny, které reagovaly s protilátkou proti HSP70 lze porovnat se standardy molekulových hmotností KaleidoscopeTM označené S. Proteiny rodiny HSP70, jak již bylo uvedeno v kapitole 1.1.1., dosahují velikosti v rozmezí od 66 do 78 kDa. V této oblasti lze pozorovat zastoupení proteinů o velikosti 73 kDa ve všech experimentálních izolátech.



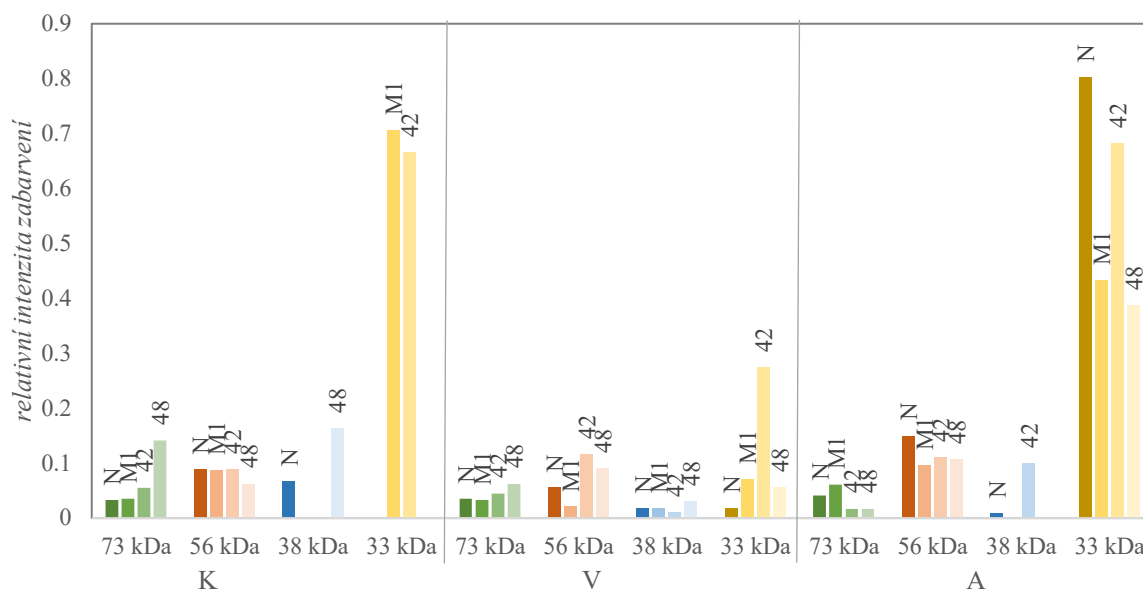
Obr. č. 9 – Imunochemická detekce proteinů HSP70 u izolátů z rajčete: Nitrocelulózová membrána na levé straně zobrazuje kontrolní izolát neošetřený *P. oligandrum*, NK, a izoláty, neošetřené, jenom infikované patogenem *V. longisporum*, NV, a patogenem *A. brassicola*, NA. Na pravé straně jsou separovány jednotlivé izoláty ošetřené různými kmeny oomycety *P. oligandrum* 48, 42 a M1 infikované patogeny *A. brassicola*, *V. longisporum* a neinfikované.

Součet relativních intenzit všech proužků reprezentujících proteiny, které reagovaly s primárními protilátkami, jsou zobrazeny na Obr. č. 10. Je patrné, že rostliny ošetřené oomycetami *P. oligandrum* vedou ke zvýšení obsahu HSP70 a to platí nejvíce pro izoláty M1 a 42. Po infekci houbou *V. longisporum* je zastoupení těchto proteinů nižší a po infekci houbou *A. brassicola* naopak vyšší.



Obr. č. 10 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení součtu relativních intenzit proteinů HSP70 rostlin rajčete programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

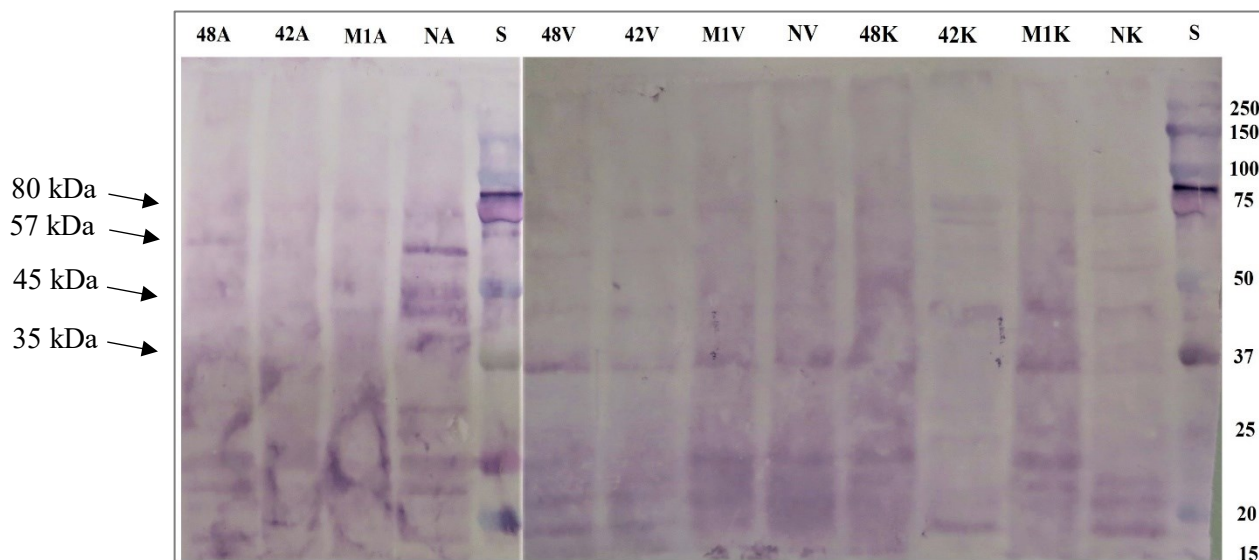
Z Obr. č. 9 vyplývá, že s protilátkami proti HSP70 interagovala řada proteinů i v nižších molekulových hmotnostech. Tyto proteiny byly detailně analyzovány, výsledek je zobrazen na Obr. č. 11, na následující straně. Z těchto proteinů dosahovaly největšího zastoupení proteiny o velikosti 33 kDa a to u neinfikovaných izolátů M1 a 42. Po infekci houbou *A. brassicola* bylo nalezeno výrazně zvýšené zastoupení těchto proteinů i v případě rostliny neošetřené *P. oligandrum*. Nejnižší zastoupení dosahovaly proteiny o velikosti 38 kDa. Neošetřený izolát, N, je tvořen hlavně proteiny o velikostech 56 a 38 kDa, přítomnost 33 kDa proteinu nebyla potvrzena. V porovnání s neošetřeným izolátem, zbylé kontrolní izoláty obsahují, podle Obr. č. 10, zvýšenou koncentraci HSP70. Největší rozdíl lze sledovat u proteinů o velikosti 33 kDa, které u izolátů M1 a 42 tvoří více než 70% celkových HSP70. U izolátu 48, lze sledovat zvýšenou koncentraci u proteinů o velikostech 73 a 38 kDa a to o čtyři-krát a dva-krát v daném pořadí. Nelze pozorovat rozdíly v zastoupení koncentrace HSP70 proteinů mezi kontrolním neošetřeným izolátem a neošetřeným izolátem infikovaným *V. longisporum*. V porovnání s neošetřeným izolátem infikovaným houbou *A. brassicola*, která podle Obr. č. 10 vykazuje nejvyšší zastoupení HSP70, lze pozorovat rozdíly, hlavně u proteinů o velikostech 56 a 33 kDa, kde u neošetřeného izolátu infikovaného *A. brassicola*, 33 kDa proteiny tvoří 80% všech proteinů. U izolátů infikovaných *V. longisporum*, lze při proteinech o velikostech 73, 56 a 38 kDa pozorovat relativně stejné zastoupení v porovnání s neošetřeným izolátem. Naproti tomu, u proteinů o velikostech 33 kDa, lze pozorovat nárůst a to čtyři-krát u izolátu M1, tři-krát u izolátu 48 a patnáct-krát u izolátu 42. U izolátů infikovaných patogenem *A. brassicola*, lze jediné pozorovat nárůst proteinů o velikostech 73 kDa u izolátu M1 a u proteinu o velikosti 38 kDa u izolátu 42. U zbylých izolátů lze pozorovat pokles v zastoupení.



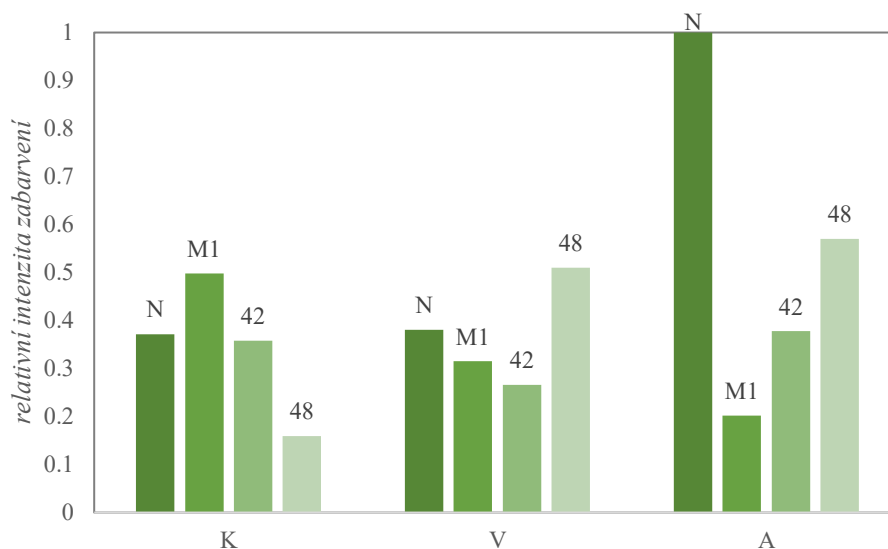
Obr. č. 11 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení relativních intenzit jednotlivých proteinů HSP70 rostlin rajčete programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci i skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

4.2.2. HSP90

Další skupinou proteinů, která byla v této práci imunochemicky sledována, byly HSP90. Obr. č. 12, na následující straně, dokumentuje nitrocelulosovou membránu s proteiny, které interagovaly s protilátkou proti tomuto proteinu. Na membráně je vidět zastoupení proteinů o velikosti 80 kDa, ale i řadu dalších proteinů o menších molekulových hmotnostech. Proteiny HSP90 o relativní molekulové hmotnosti 80 kDa byly nejvíce zastoupeny v listech rajčat infikovaných *A. brassicola* a neošetřených *P. oligandrum*. Infekce pomocí *V. longisporum* neměla na tento protein vliv. Ošetření rostlin oomycetou *P. oligandrum* mělo vliv na množství tohoto proteinu, některé kmeny *P. oligandrum* ho zvyšovaly, některé snižovaly.

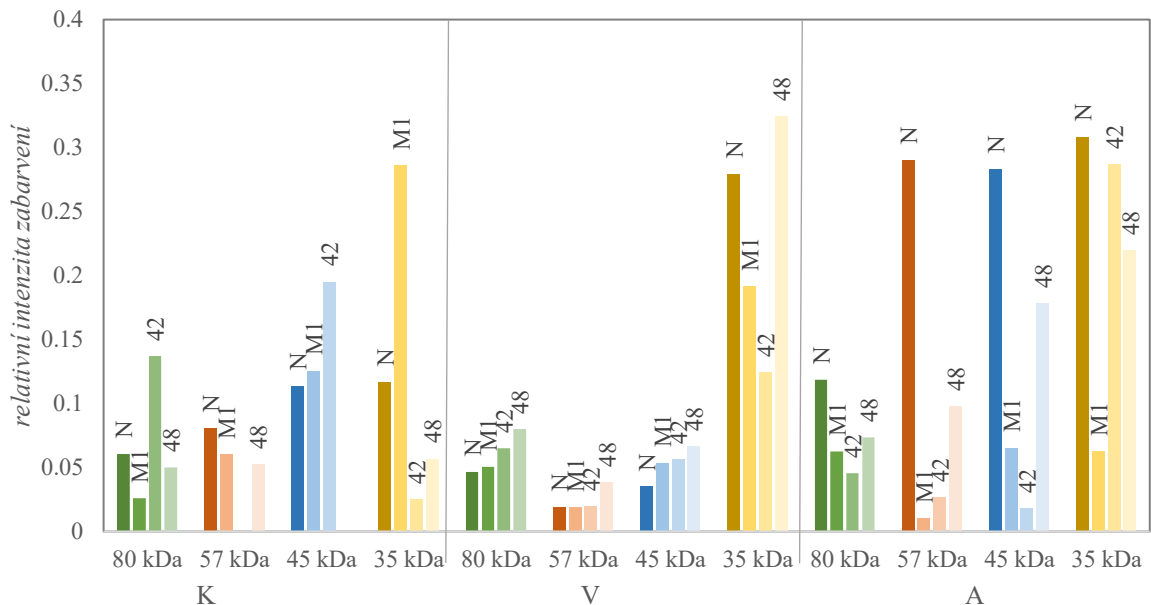


Obr. č. 12 - Imunochemická detekce proteinů HSP90 u izolátů z rajčete: Nitrocelulosová membrána zobrazuje pravou skupinu, K, značící kontrolní izoláty. Prostřední skupinu, V, značící skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Levou skupinu, A, značící skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí neošetřené izoláty, M1, 42 a 48 značí specifické izoláty ošetřené různými kmeny oomycety *P. oligandrum*.



Obr. č. 13 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení součtu relativních intenzit proteinů HSP90 rostlin rajčete programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

Na Obr. č. 14 lze pozorovat detailnější denzitometrickou analýzu i dalších proteinů, které interagovaly s protilátkou proti HSP90. U neinfikovaného izolátu M1 lze pozorovat zvýšenou expresi jenom u proteinů o velikosti 45 a 35 kDa, kde se zastoupení 35 kDa proteinů zvýšila téměř o trojnásobek. U izolátu 42, kde podle Obr. č. 13, nedošlo ke změně, ale u proteinů o velikosti 80 a 45 kDa došlo k nárůstu a to u obou o téměř 100%. U neošetřeného izolátu, infikovaného houbou *V. longisporum*, lze pozorovat pokles u proteinů o všech velikostech, kromě proteinu o velikosti 35 kDa, u kterého došlo téměř k trojnásobnému zvýšení zastoupení. Naproti tomu, neošetřený izolát infikovaný houbou *A. brassicola*, došlo ke zvýšení zastoupení u proteinů o velikostech 57, 45 a 35 kDa o trojnásobek a u 80 kDa proteinu o dvojnásobek. U ošetřených izolátů infikovaných *V. longisporum*, lze pozorovat u všech proteinů zvýšení zastoupení, kromě proteinů o hmotnosti 35 kDa, kde izoláty M1 a 42 obsahují poloviční zastoupení v porovnání s neošetřeným izolátem, kromě izolátu 48, u kterého lze sledovat zvýšení o 16%. U izolátů infikovaných patogenem *A. brassicola*, lze pozorovat u všech proteinů ke snížení zastoupení, jak již bylo zmíněno a ukázáno na Obr. č. 13.



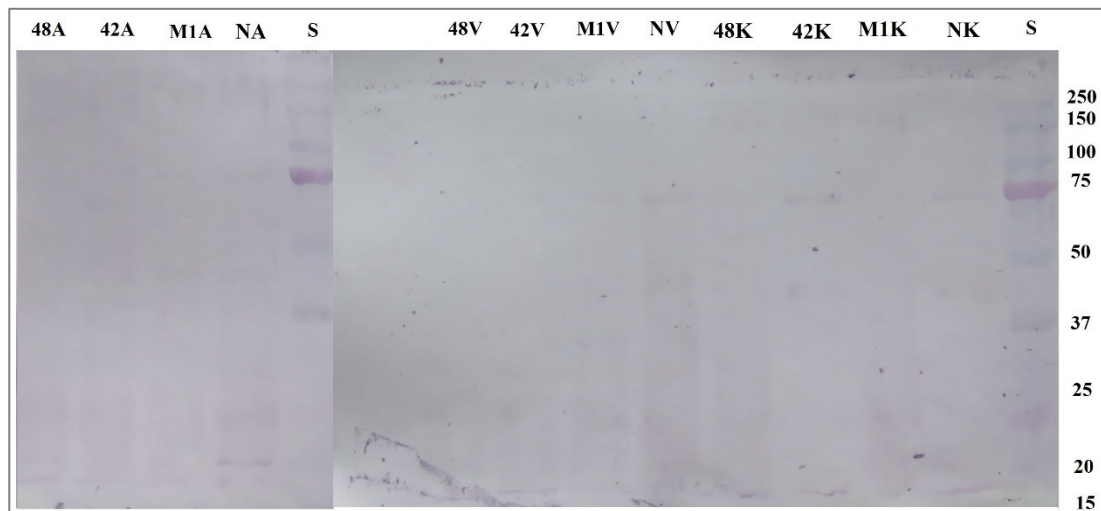
Obr. č. 14 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení relativních intenzit jednotlivých proteinů HSP90 rostlin rajčete programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

4.3. Sledování přítomnosti PR proteinů v izolátech z rajčete jedlého

Dalšími proteiny, které úsice souvisí s patogenezí, jsou pathogenesis related proteins, tedy PR proteiny.

4.3.1. PR-1

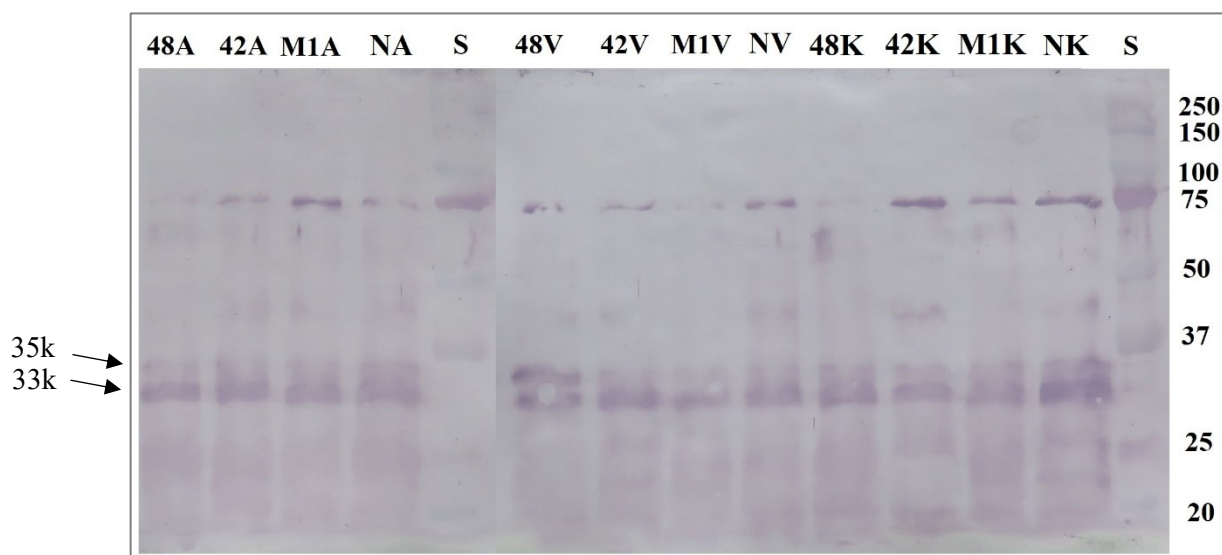
Imunochemická detekce proteinů na nitrocelulosové membráně, které interagovaly s protilátkami proti PR-1, ukazuje Obr. č. 15. Intenzita proužků byla velmi slabá, proteiny jsou patrné pouze pro rostliny tabáku, a to v oblasti molekulové hmotnosti od 14 až do 18 kDa.



Obr. č. 15 - Imunochemická detekce proteinů PR-1 u izolátů z rajčete: Nitrocelulosová membrána zobrazuje pravou skupinu, K, značící kontrolní izoláty. Prostřední skupinu, V, značící skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Levou skupinu, A, značící skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí neošetřené izoláty, M1, 42 a 48 značí specifické izoláty ošetřené různými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

4.3.2. PR-2

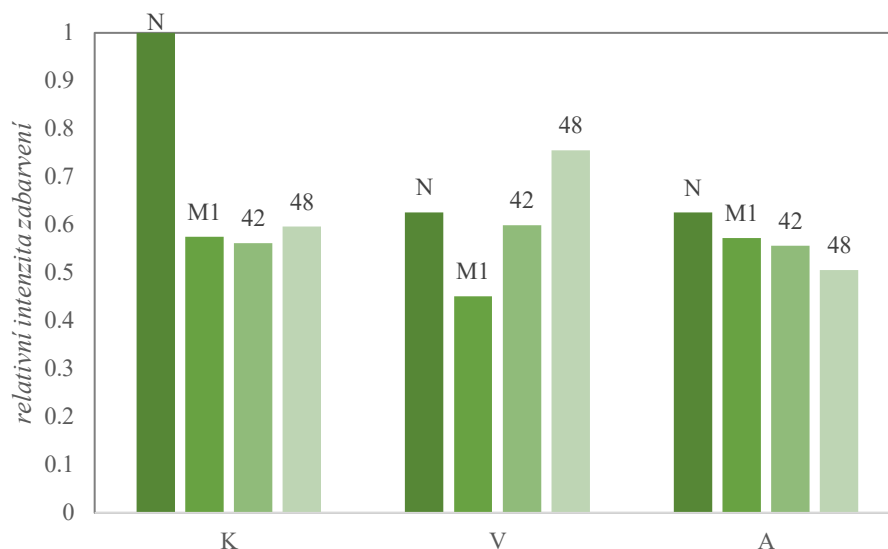
Skupinu PR-2 tvoří mnoho proteinů, o různých velikostech, se stejnou funkcí. Velikostně, se tato skupina pohybuje v rozmezí od 30 do 40 kDa (1.2.2.). Přítomnost PR-2 proteinů, u rostlin rajčete, byla imunochemicky stanovena a výsledná nitrocelulosová membrána je zobrazena na Obr. č. 16. Analýzou nitrocelulosové membrány, byly identifikovány dva typy PR-2 proteinů, a to třídy I a třídy II. Denzitometrické vyhodnocení zastoupení celkově PR-2 proteinů je zobrazeno na Obr. č. 17 (str. 42) a vyhodnocení jednotlivých stanovených proteinů je následně na Obr. č. 18 (str. 43).



Obr. č. 16 - Imunochemická detekce proteinů PR-2 u izolátů z rajčete: Nitrocelulosová membrána zobrazuje pravou skupinu, K, značící kontrolní izoláty. Prostřední skupinu, V, značící skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Levou skupinu, A, značící skupinu infikovanou patogenem *A. brassicicola*. Zkratky v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí neošetřené izoláty, M1, 42 a 48 značí specifické izoláty ošetřené různými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

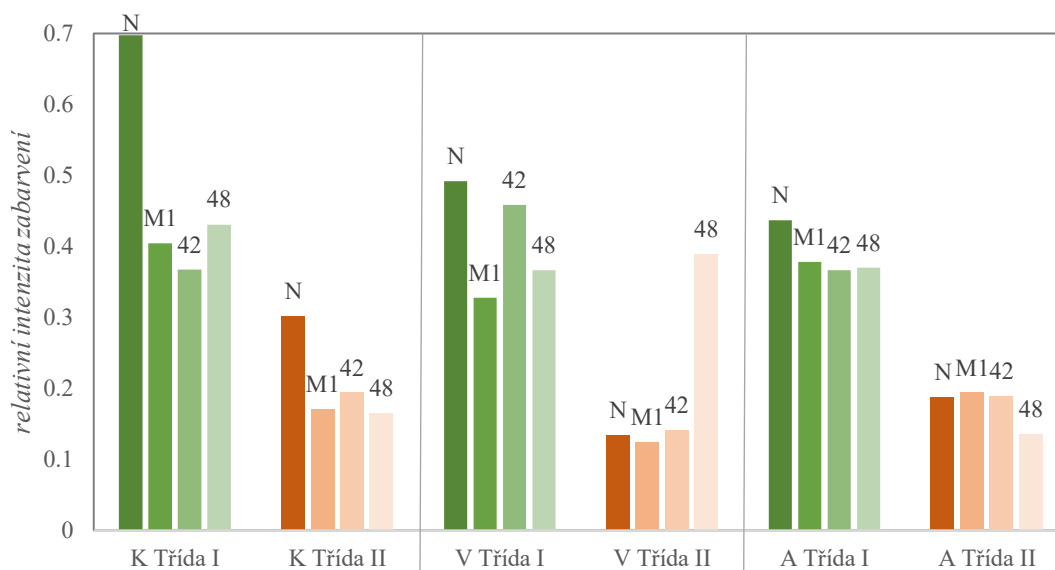
Z Obr. č. 17 lze pozorovat nejvyšší relativní intenzitu proužků v kontrolním neošetřeném izolátu, NK. Všechny ostatní izoláty, v porovnání s NK izolátem, zastávají v rozmezí 40-70% relativní intenzity. V kontrolních rostlinách ošetřených *P. oligandrum* bez infekce, nelze pozorovat rozdíl. Porovnáním jenom neošetřených izolátů, infikovaných patogenními houbami a neinfikovaného, lze pozorovat rapidní pokles PR-2 proteinů při infekci *V. longisporum* na 43% relativní intenzity, a pokles na 67% relativní intenzity při infekci *A. brassicicola*. U izolátů, infikovaných patogenem *V. longisporum*, lze pozorovat pokles

PR-2 proteinů u izolátu M1 na přibližně 60% a u izolátu 42 na 95%, v porovnání s jejich neošetřeným izolátem, NV. U izolátu 48, lze pozorovat, jako u jediného, nárůst PR-2 proteinů o 20%. U izolátů, infikovaných *A. brassicola*, lze pozorovat jenom pokles proteinů.



Obr. č. 17 – Grafické znázornění densitometrického vyhodnocení součtu relativních intenzit proteinů PR-2 rostlin rajčete programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

Detailnější rozbor relativních intenzit jednotlivých tříd PR-2 proteinů je zobrazen na Obr. č. 18, na následující straně. Obecně, lze pozorovat vyšší zastoupení proteinů třídy I, v porovnání s třídou II, která tvoří přibližně jenom poloviční podíl. U kontrolních izolátů lze pozorovat pokles obou typů proteinů stejným podílem, jako bylo možné sledovat na Obr. č. 17. U izolátů infikovaných *V. longisporum*, lze pozorovat předpokládaný pokles relativní intenzity u proteinů třídy I, ale žádnou změnu u proteinů třídy II u izolátů M1 a 42. Izolát 48, proteiny třídy II, ukazují velké zvýšení relativní intenzity o 190%, v porovnání s neošetřeným izoátem, NV. U izolátů infikovaných *A. brassicola*, lze pozorovat pokles u proteinů třídy I v porovnání s neošetřeným izolátem, a minimální změnu relativní intenzity u třídy II.

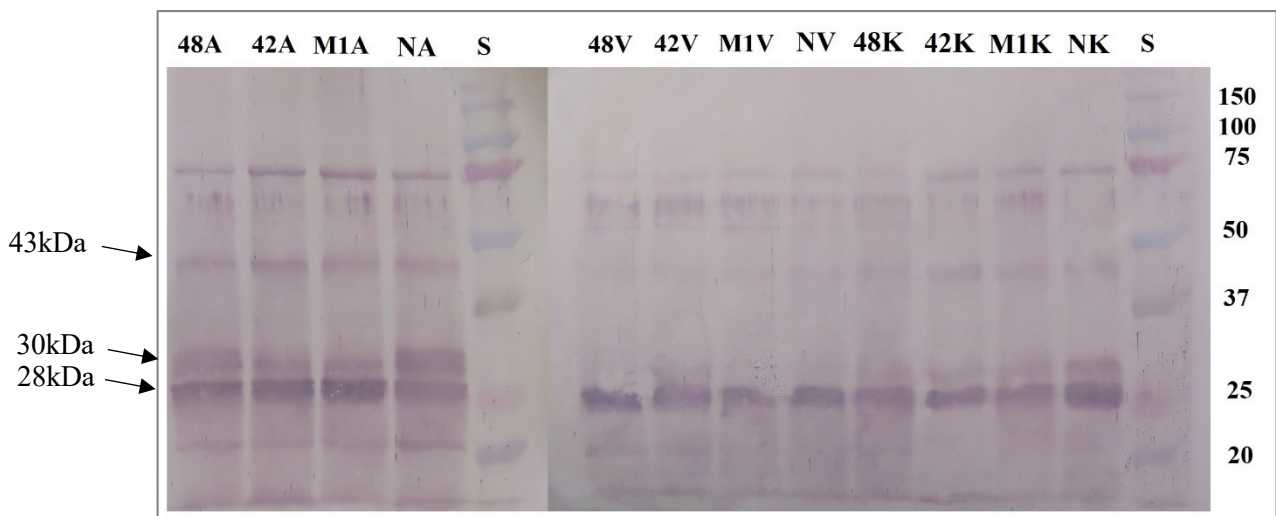


Obr. č. 18 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení relativních intenzit jednotlivých proteinů PR-2 rostlin rajčete programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

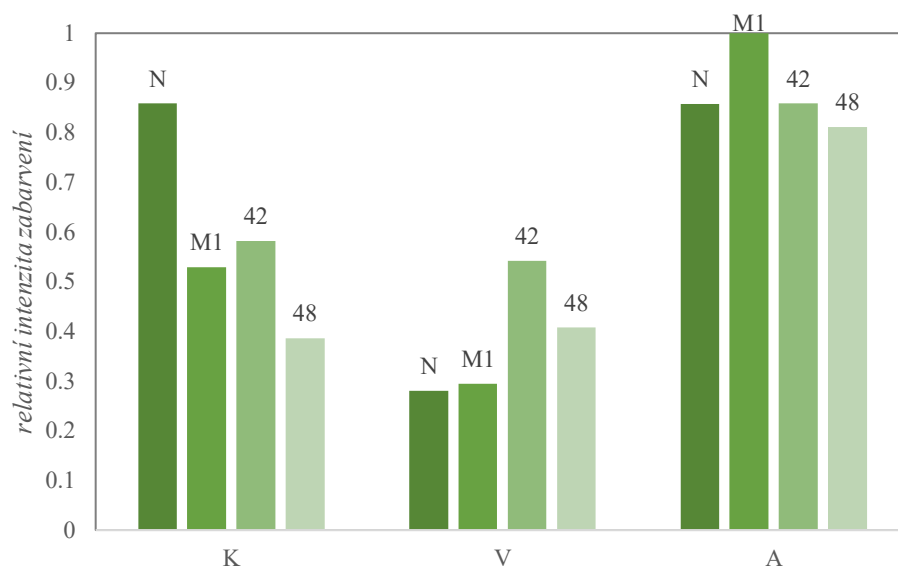
4.3.3. PR-3

Skupina PR-3 proteinů je rozdělena na šest tříd podle jejich strukturní homologie. Podle relativních molekulových hmotností, byly v rostlinách rajčete imunochemicky detekovány a identifikovány tři PR-3 proteiny, a to třídy II, IV a V. Výsledná membrána po imunochemické detekci PR-3 proteinů ve všech experimentálních skupinách je zobrazena na Obr. č. 19, na následující straně.

Následné denzitometrické vyhodnocení, celkově stanovených PR-3 proteinů, je na Obr. č. 20, na následující straně. Zde lze pozorovat obecný nárůst PR-3 proteinů u rostlin infikovaných houbou *A. brassicola* v porovnání s kontrolními izoláty. U kontrolních izolátů, ošetřených oomycetou *P. oligandrum*, došlo k poklesu PR-3 proteinů v porovnání s jejich neošetřeným izolátem. U izolátů infikovaných patogeny, lze sledovat nárůst proteinů u všech izolátů. U izolátů infikovaných patogenní houbou *V. longisporum*, se především jedná o izolát 42 a z izolátů infikovaných *A. brassicola*, se jedná o izolát M1.

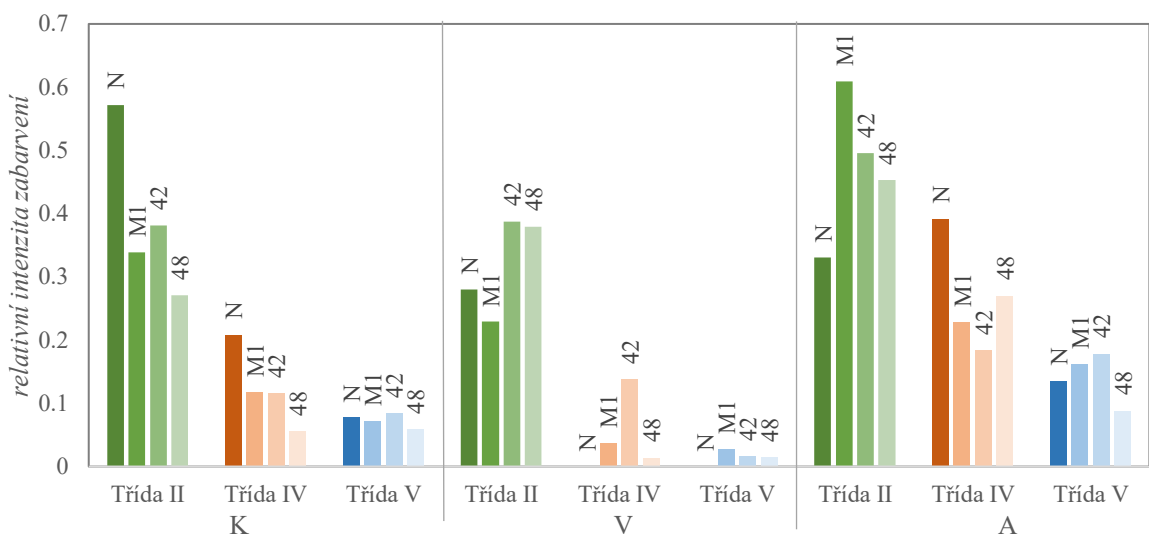


Obr. č. 19 - Imunochemická detekce proteinů PR-3 u izolátů z rajčete: Nitrocelulosová membrána zobrazuje pravou skupinu, K, značící kontrolní izoláty. Prostřední skupinu, V, značící skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Levou skupinu, A, značící skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí neošetřené izoláty, M1, 42 a 48 značí specifické izoláty ošetřené různými kmeny oomycety *P. oligandrum*.



Obr. č. 20 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení součtu relativních intenzit proteinů PR-3 rostlin rajčete programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

Na Obr. č. 21 lze sledovat zastoupení jednotlivých tříd v PR-3 protein v jednotlivých experimentálních skupinách. Nejhojněji zastoupené PR-3 proteiny jsou proteiny II. třídy a tvoří v průměru 65% u rostlin neinfikovaných, 85% u rostlin infikovaných houbou *V. longisporum* a 50% u rostlin infikovaných *A. brassicola*. Na druhou stranu, nejméně zastoupené PR-3 proteiny, jsou proteiny V. třídy. U kontrolních izolátů rostlin ošetřených jenom *P. oligandrum*, je u II. a IV. třídy, možné vidět pokles koncentrace proteinů mezi neošetřeným izolátem a izoláty M1, 42 a 48. U rostlin infikovaných houbami *V. longisporum* a *A. brassicola* lze, u obou případů, pozorovat nárůst většiny proteinů ze skupiny PR-3. Nejvyšší nárůst lze pozorovat u izolátu 42, při infekci *V. longisporum*, kde dochází k nárůstu všech tříd proteinů a u izolátu M1, při infekci *A. brassicola*, kde hlavně dochází k nárůstu II. třídy. Na rozdíl od kontrolních neinfikovaných izolátů, kde koncentrace PR-3 proteinů V. třídy mezi jednotlivými izoláty je neměnná, u infikovaných izolátů, je vidět nárůst. U izolátů *A. brassicola*, při proteinech IV. třídy, lze pozorovat stejné chování jako u kontrolních izolátů, kde lze sledovat 40% pokles v koncentraci.



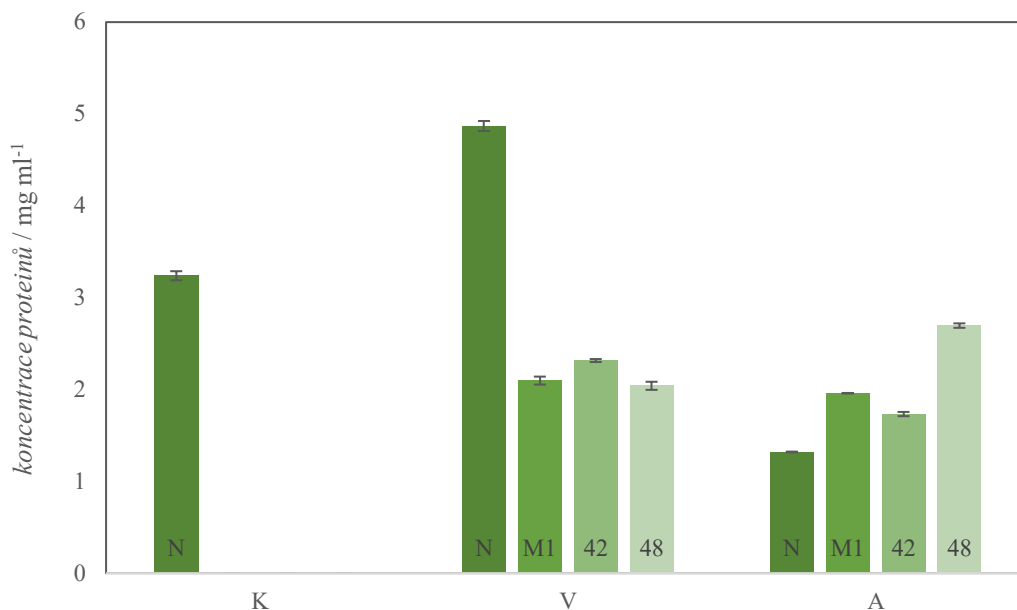
Obr. č. 21 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení relativních intenzit jednotlivých proteinů PR-3 rostlin rajčete programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *Alternaria*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

4.4. Množství proteinů v izolátech z rostlin řepky olejné ošetřených oomycetami *Pythium oligandrum*

Podobně jako v případě rostlin rajčat, byly stejné parametry sledovány také pro rostliny řepky ošetřené oomycetami *P. oligandrum* a infikované fytopatogenními houbami *V. longisporum* a *A. brassicola*.

4.5. Sledování přítomnosti heat shock proteinů v izolátech z řepky olejné

Podobně, jako i s rostlinami rajčete z předešlé kapitoly, byla provedena extrakce proteinů z listů řepky olejné (kapitola 3.5.1.). Výsledné hodnoty koncentrací proteinů v jednotlivých izolátech jsou zobrazené na Obr. č. 22, na následující straně. Průměrná koncentrace extrahovaných proteinů je přibližně 3 mg ml⁻¹. V rámci jednotlivých skupin, se koncentrace pohybují v malém rozmezí, kromě neošetřeného izolátu N infikovaného *V. longisporum*, který od dané skupiny obsahuje dva-krát tak vyšší koncentraci.

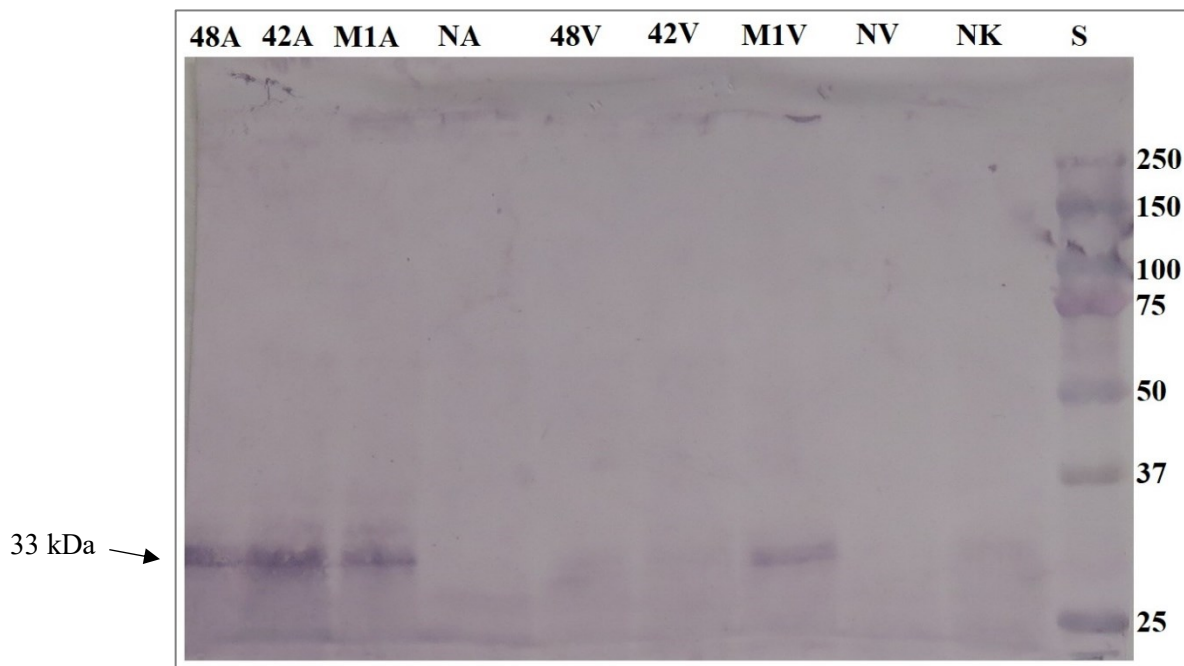


Obr. č. 22 – Koncentrace rozpustných proteinů v rostlinných extraktech z řepky: Levá skupina, K, značí kontrolní vzorek. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *Verticilium*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty oomycety *P. oligandrum*, kde K, značí kontrolní izoláty, M1 značí izoláty obsahující komerční přípravek ochrany rostlin Polyversum®, 42 a 48 značí specifické izoláty *P. oligandrum*.

4.5.1. HSP70

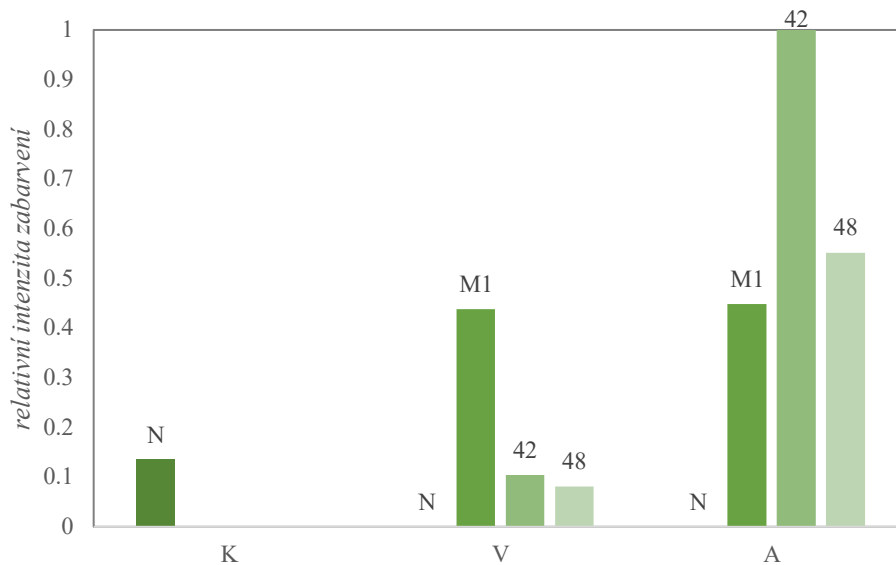
Jak již bylo uvedeno v kapitole 4.2.1, skupinu HSP70 proteinů tvoří proteiny v rozmezí molekulových hmotností 66-78 kDa. Takže opět, i u rostlin řepky, lze předpokládat nejvyšší zastoupení v této oblasti. Výsledná membrána po imunochemické detekci HSP70 proteinů je zobrazena na Obr. č. 23, na následující straně.

Na Obr. č. 23 jsou vidět proteiny jenom v oblasti 33 kDa. Více zastoupené jsou jen v rostlinách řepky ošetřené oomycetami *P. oligandrum* M1, 42 a 48 infikované houbou *A. brassicola*, pro izolát M1 platí i v případě infekce *V. longisporum*. U ostatních izolátů je vidět minimální náznak přítomnosti jakýchkoliv jiných HSP70 proteinů.



Obr. č. 23 - Imunochemická detekce proteinů HSP70 u izolátů z řepky: Nitrocelulosová membrána zobrazuje pravou skupinu, K, značící kontrolní izoláty. Prostřední skupinu, V, značící skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Levou skupinu, A, značící skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí neošetřené izoláty, M1, 42 a 48 značí specifické izoláty ošetřené různými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

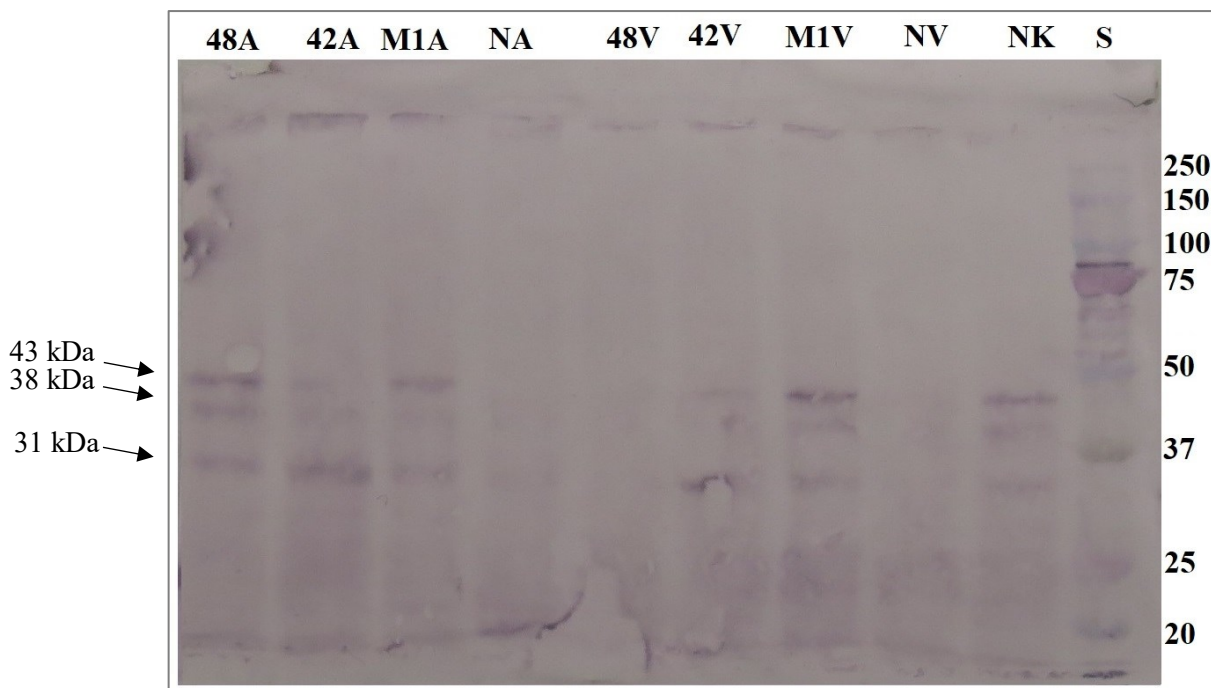
Denzitometrické vyhodnocení membrány je zobrazeno na Obr. č. 24, na následující straně. Zde lze vidět u neošetřených rostlin nízké zastoupení HSP70. Infekce houbou *V. longisporum* způsobuje zvýšení proteinů HSP70 především pro izolát M1, u kterého lze pozorovat čtyři-krát vyšší zastoupení HSP70 proteinů než u izolátů 42 a 48. Infekce houbou *A. brassicola* vede ke zvýšení zastoupení HSP70 ve všech rostlinných izolátech ošetřených *P. oligandrum*, nejvíc pro izolát 42.



Obr. č. 24 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení součtu relativních intenzit proteinů HSP70 rostlin řepky programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

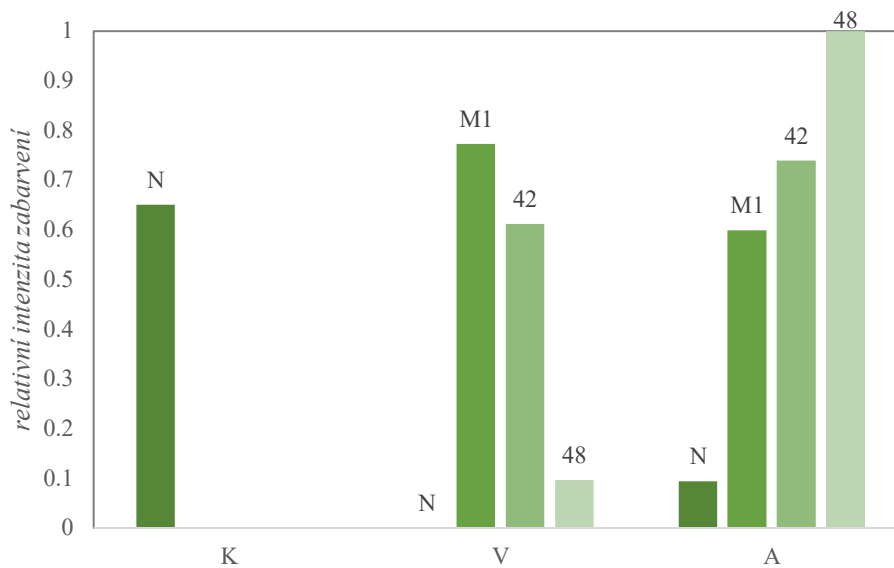
4.5.2. HSP90

Po imunochemické detekci protilátkami proti HSP90, bylo nalezeno více proteinů v rostlinách ošetřených *P. oligandrum* o rozdílných molekulových hmotnostech. Výsledná membrána po vizualizaci je zobrazena na Obr. č. 25, na následující straně, ke které celkové denzitometrické vyhodnocení zastoupení HSP90 řepky, je zobrazeno na Obr. č. 26, na str. 51. Bylo sledováno i zastoupení jednotlivých proteinů, které interagovali s protilátkami proti HSP90 ve všech experimentálních skupinách řepky olejné, je zobrazeno na Obr. č. 27, str. 52. Interakce s protilátkou proti HSP90, byla zjištěna pro proteiny o relativní molekulové hmotnosti 43 kDa, 38 kDa a 31 kDa.



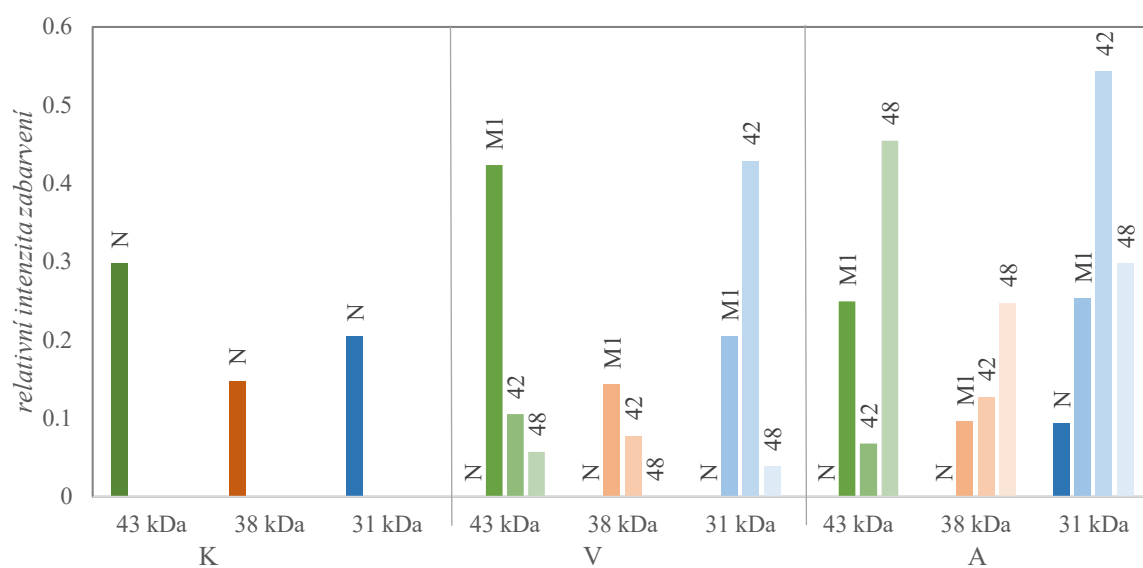
Obr. č. 25 - Imunochemická detekce proteinů HSP90 u izolátů z řepky: Nitrocelulosová membrána zobrazuje pravou skupinu, K, značící kontrolní izoláty. Prostřední skupinu, V, značící skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Levou skupinu, A, značící skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí neošetřené izoláty, M1, 42 a 48 značí specifické izoláty ošetřené různými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

Z Obr. č. 25 byly identifikovány tři izoformy HSP90, v rozmezí molekulových hmotností od 43 kDa do 31 kDa. Z membrány lze pozorovat vyšší zastoupení u izolátů infikovaných patogenní houbou *A. brassicola*, nejvíce u izolátu 48, což také potvrzuje Obr. č. 26. Z Obr. č. 26 lze pozorovat poměrně vysoké zastoupení HSP90 v kontrolním neošetřeném izolátu, kdežto u neošetřených izolátů infikovaných patogeny, zastoupení proteinů je velmi nízké. Přesněji u neošetřeného izolátu infikovaného *V. longisporum*, nebyla nalezena žádná přítomnost proteinů. Naproti tomu, u izolátů M1 a 42 koncentrace je mnohem vyšší, přesněji osm-krát vyšší u M1 a šest-krát vyšší u 42 než u izolátu 48, který jeví minimální zastoupení proteinů. U izolátů M1 a 42, po infekci *A. brassicola*, lze pozorovat podobný nárůst koncentrace jako u izolátů infikovaných *V. longisporum*. Kdežto, izolát 48 jeví nejvyšší zastoupení HSP90.



Obr. č. 26 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení součtu relativních intenzit proteinů HSP90 rostlin řepky programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

V podrobnějším denzitometrickém vyhodnocení, které je zobrazeno na Obr. č. 26, na následující straně, lze vidět poměrně stejné zastoupení izoform HSP90 u kontrolního neošetřeného izolátu. U izolátů infikovaných *V. longisporum*, lze pozorovat velmi rozdílné zastoupení izoform HSP90 u jednotlivých izolátů. U M1, lze pozorovat nejvyšší zastoupení u proteinů o velikosti 43 kDa, kdežto zbylé izoformy lze pozorovat při polovičních koncentracích. Na rozdíl, u izolátu 42 lze nejvyšší zastoupení pozorovat při velikosti 31 kDa. U izolátů infikovaných patogenem *A. brassicola*, lze pozorovat velmi podobné chování zastoupení izoform u jednotlivých izolátů, jako u izolátů infikovaných *V. longisporum*. Poměr zastoupení jednotlivých HSP90 u izolátu M1, je více vyrovnaný než u M1 *V. longisporum*, ale opět lze sledovat nejnižší zastoupení u 38 kDa izoformy a o mnoho vyšší zastoupení u zbylých izoform. U izolátu 42, lze opět sledovat stejný poměr izoform jako u izolátu 42 infikovaného *V. longisporum*, kde nejvyšší zastoupení tvoří 31 kDa izoforma a čtyři-krát nižší zastoupení mají zbylé izoformy.

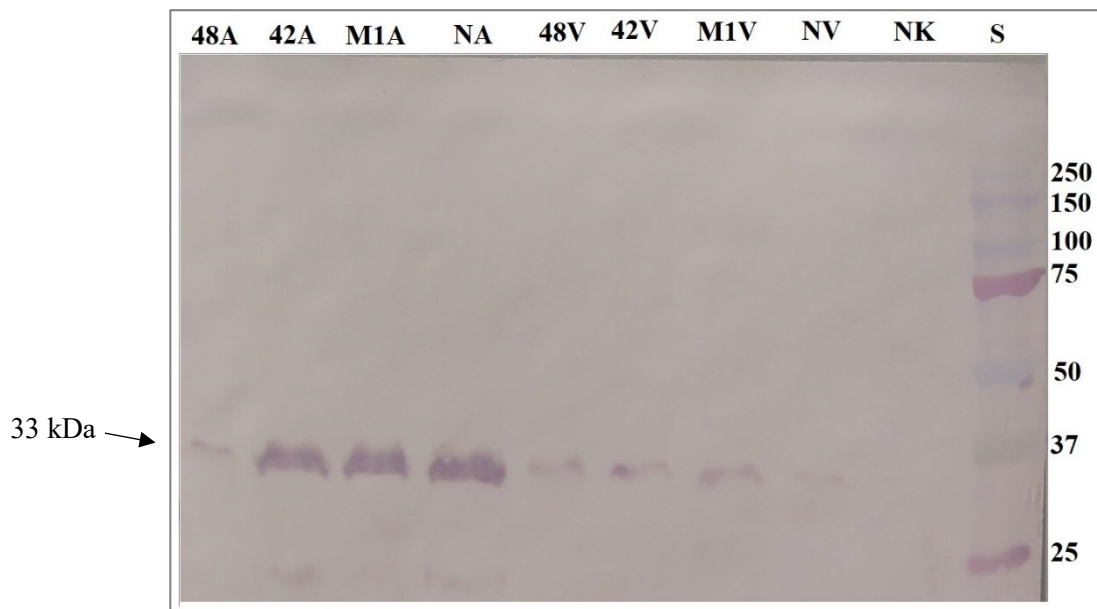


Obr. č. 26 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení relativních intenzit jednotlivých proteinů HSP90 rostlin řepky programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

4.6. Sledování přítomnosti PR proteinů v izolátech z řepky olejně

4.6.1. PR-2

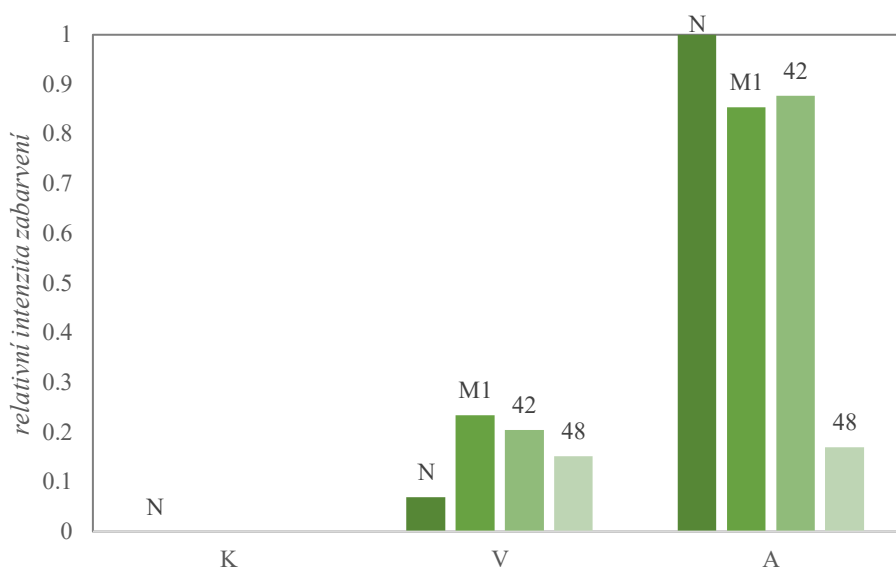
Detekce PR-2 proteinů ve všech experimentálních skupinách řepky olejně ukazuje Obr. č. 27 a denzitometrické vyhodnocení na Obr. č. 28, na následující straně.



Obr. č. 27 - Imunochemická detekce proteinů PR-2 u izolátů z řepky: Nitrocelulosová membrána zobrazuje pravou skupinu, K, značící kontrolní izoláty. Prostřední skupinu, V, značící skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Levou skupinu, A, značící skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí neošetřené izoláty, M1, 42 a 48 značí specifické izoláty ošetřené různými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

Z denzitometrického stanovení lze sledovat nulové zastoupení PR-2 proteinů v kontrolní, neošetřené, rostlině. Naproti tomu, neošetřené izoláty infikované patogeny vykazují zvýšené vlivy infekce, sice lze sledovat obrovský rozdíl v expresi PR-2 proteinů na rozdílné patogeny. Rostliny ošetřené oomycetou *P. oligandrum* a infikované *A. brassicola*, vykazují významné zvýšení PR-2, zvýšení i když výrazně nižší platí i pro infekci houbou

V. longisporum. U izolátů infikovaných houbou *V. longisporum*, lze sledovat zvýšení zastoupení PR-2 proteinů u všech izolátů, v porovnání s infikovaným a neošetřeným izolátem, NV. Nejvyšší zvýšení lze sledovat u izolátu M1, a to tři-krát vyšší než u neošetřeného izolátu. U izolátů infikovaných *A. brassicola* lze sledovat o mnoho vyšší nárůst proteinů než u izolátů infikovaných *V. longisporum*. Zde, lze sledovat nejvyšší zastoupení u neošetřeného izolátu a následně u izolátů M1 a 42, které obsahují o 20% méně proteinů.



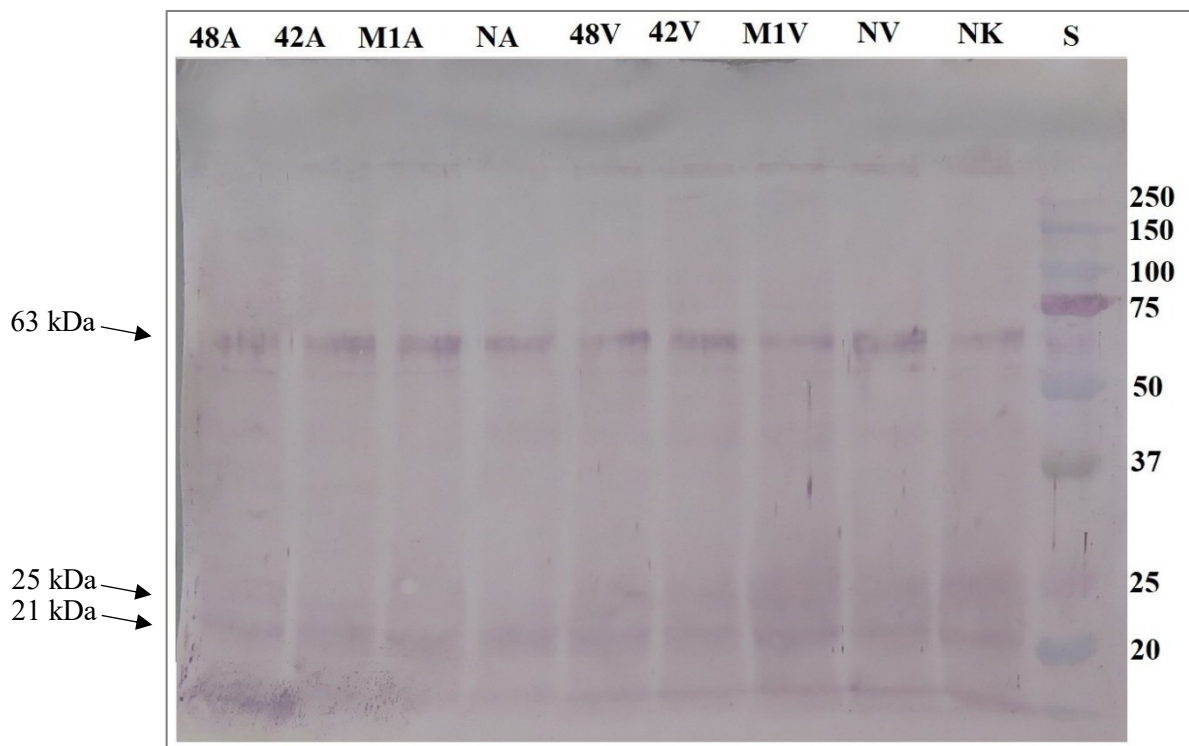
Obr. č. 28 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení součtu relativních intenzit proteinů PR-2 rostlin řepky programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

4.6.2. PR-3

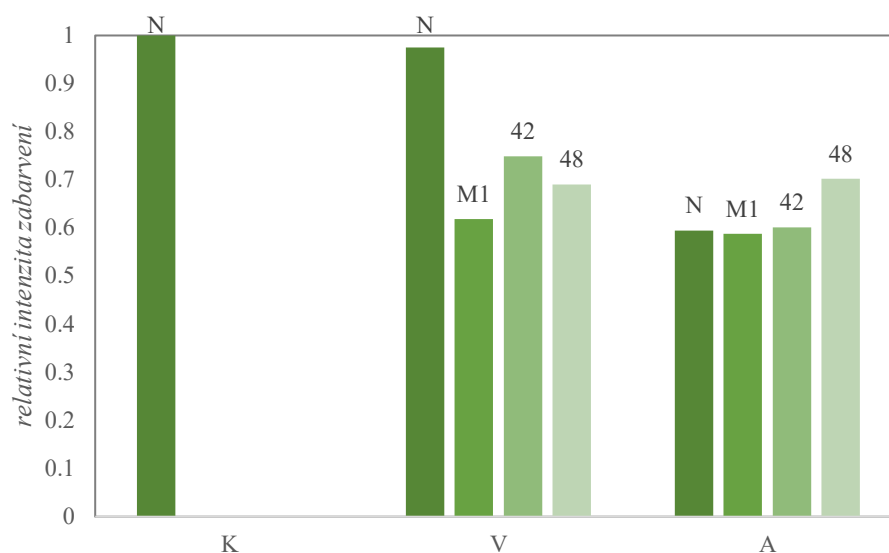
Poslední vyhodnocená nitrocelulosová membrána izolátů z řepky olejné je na Obr. č. 29, na následující straně. Lze sledovat expresi tří typů PR-3 proteinů v rozmezí molekulových hmotností od 21 kDa do 63 kDa.

Na Obr. č. 30, na str. 56, je zobrazené denzitometrické vyhodnocení součtu všech PR-3 proteinů detekovaných protilátkami proti PR-3. Zde, lze sledovat nejvyšší zastoupení PR-3

proteinů u izolátu neošetřeného i neinfikovaného žádným patogenem. Neošetřený izolát infikovaný houbou *V. longisporum*, obsahuje téměř stejné zastoupení PR-3 proteinů, ale u neošetřeného izolátu infikovaného houbou *A. brassicola*, již lze sledovat pokles o 40%, v porovnání s neinfikovaným N izolátem. U ošetřených izolátů infikovaných *V. longisporum*, v porovnání s neošetřeným, lze sledovat pokles proteinů a to o 40% u izolátu M1, 25% u izolátu 42 a 30% u izolátu 48. Naproti tomu, izoláty infikované patogenem *A. brassicola*, neprojevily žádné změny v expresi PR-3 proteinů, kromě izolátu 48, u kterého lze sledovat navýšení o 16%.



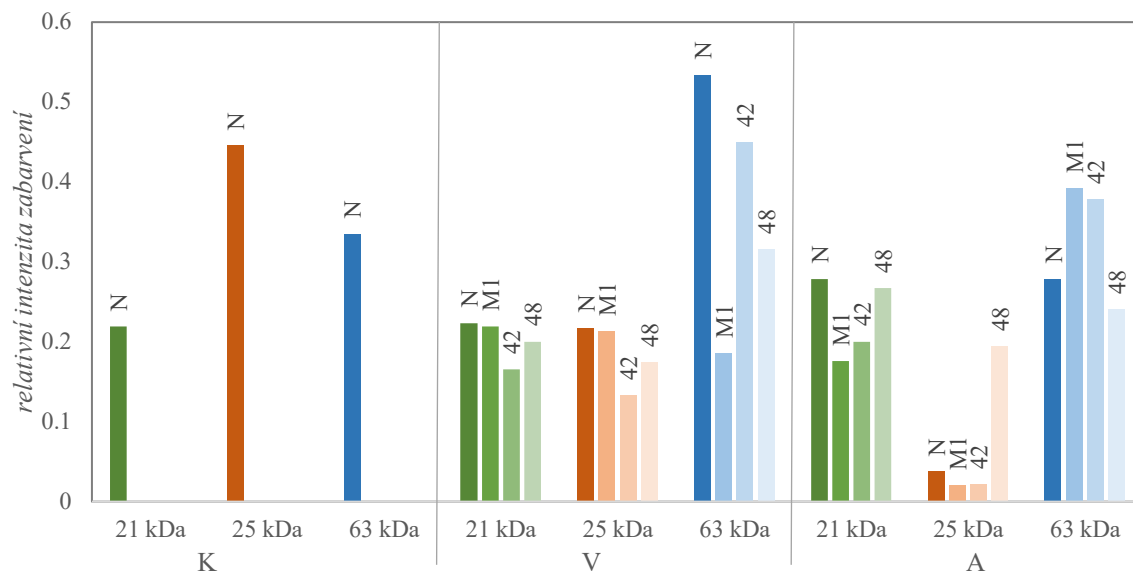
Obr. č. 29 - Imunochemická detekce proteinů PR-3 u izolátů z řepky: Nitrocelulosová membrána zobrazuje pravou skupinu, K, značící kontrolní izoláty. Prostřední skupinu, V, značící skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Levou skupinu, A, značící skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí neošetřené izoláty, M1, 42 a 48 značí specifické izoláty ošetřené různými kmeny oomycety *P. oligandrum*.



Obr. č. 30 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení součtu relativních intenzit proteinů PR-3 rostlin řepky programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

Při detailnějším provedené denzitometrického vyhodnocení, lze pozorovat rozdílné distribuce jednotlivých tříd PR-3 proteinů v závislosti na patogenu. Toto denzitometrické vyhodnocení je zobrazeno na Obr. č. 31, na následující straně. U neošetřeného a neinfikovaného kontrolního izolátu, lze pozorovat nejvyšší zastoupení u PR-3 proteinů o molekulové hmotnosti 25 kDa, co tvoří přibližně polovinu z detekovaných proteinů. Zbylé neošetřené izoláty obsahují úplně jinou kompozici. U neošetřeného izolátu infikovaného patogenem *V. longisporum*, lze pozorovat nejvyšší zastoupení u 63 kDa izoformy, která tvoří více než 50%. Na druhou stranu, u neošetřeného izolátu infikovaného patogenem *A. brassicola*, lze pozorovat nejvíce zastoupené izoformy o velikostech 21 a 63 kDa, které tvoří 90%. Izoláty infikované patogenem *V. longisporum*, obsahují téměř stejné zastoupení izoform o velikostech 21 a 25 kDa, jako neošetřený izolát NV, přičemž u izolátu 42 lze i u těchto izoform pozorovat mírný pokles. U proteinů o velikostech 63 kDa, lze pozorovat pokles u všech izolátů. U izolátu 42 se jedná o nejmenší pokles, o přibližně 15%, kdež to u izolátu 48 se jedná o 40% a u izolátu M1 o 65%. Izoláty infikované patogenní houbou *A. brassicola*, obsahují rozdílné zastoupení izoform PR-3 proteinů, kdežto celková koncentrace se zachovává téměř stejná. U izoformy o velikosti 21 kDa, lze pozorovat pokles u všech izolátů, kde největší pokles je u izolátu M1 a to o 40%, v porovnání s NA. U izoformy o velikosti 25

kDa, která u neošetřeného izolátu tvořila jenom 10% celkových proteinů, lze pozorovat pětinásobný nárůst u izolátu 48. A při izoformě o velikosti 63 kDa, lze zas pozorovat nárůst koncentrace u izolátů M1 a 42, a to o 40% u izolátu M1 a o 35% u izolátu 42.



Obr. č. 31 – Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení relativních intenzit jednotlivých proteinů PR-3 rostlin řepky programem GelAnalyzer: Levá skupina, K, značí kontrolní, neinfikovanou, skupinu. Prostřední skupina, V, značí skupinu infikovanou patogenem *V. longisporum*. Pravá skupina, A, značí skupinu infikovanou patogenem *A. brassicola*. Zkratky, v rámci skupin, značí jednotlivé izoláty, kde N, značí izoláty neošetřené oomycetami *P. oligandrum*, M1, 42 a 48 značí izoláty ošetřené specifickými kmeny oomycety *P. oligandrum*.

5. Diskuze

Vliv fytopatogenů v rostlinách rajčat a řepky olejné na přítomnost heat shock proteinů

Je známo, že proteiny, které patří do velké rodiny heat shock proteinů, ovlivňují řadu metabolických procesů⁹. Bylo zjištěno, že exprese HSP se mění v souvislosti s mnoha typy abiotického stresu, v posledních letech je věnována pozornost i biotickému stresu¹⁴. V této bakalářské práci jsme se zabývali přítomností HSP70 a HSP90 v rostlinách rajčete jedlého a řepky olejné ošetřenými několika různými kmeny oomycety *Pythium oligandrum*. Tento organismus patří mezi prostředky biologické ochrany rostlin, který působí jednak jako mykoparazit, ale i „priming“ rostliny, tedy přípravu na rychlejší a silnější nástup obranných reakcí. Vedle těchto účinků *P. oligandrum* poskytuje rostlině také tryptamin, prekurzor auxinu, který podporuje růst rostliny¹²⁷.

Bylo zjištěno, že v rostlinách rajčete ošetřených kmeny *P. oligandrum* se zvyšuje zastoupení proteinů, které interagovaly s protilátkami proti HSP70 (Obr. č. 9). Je zajímavé, že podíl proteinů o relativní molekulové hmotnosti 73 kDa byl poměrně malý, zvláště v případě některých izolátů. Rostliny rajčat ošetřené kmeny M1 a 42 *P. oligandrum* měly nejvíce proteinů o relativní molekulové hmotnosti 33 kDa. Je možné, že se jedná o doménu HSP70 nebo degradační produkty těchto proteinů. Experimenty, které sledovaly vliv infekce fytopatogenními houbami, ukázaly, že HSP70 jsou rovněž zapojeny do metabolismu rostlin rajčete za těchto podmínek. Výraznější zvýšení zastoupení těchto proteinů bylo zjištěno v případě infekce houbou *Alternaria brassicicola* méně infekce *Verticillium longisporum*, nárůst se týkal opět především proteinů o velikosti 33 kDa. V případě rostlin řepky olejné byl nalezen jediný protein o velikosti 33 kDa, jeho zastoupení opět zvýšila infekce *A. brassicicola*, méně *V. longisporum*. Zdá se, že metabolismus HSP70 se liší mezi jednotlivými rostlinnými druhy, avšak protein o velikosti 33 kDa se pravděpodobně účastní metabolismu za podmínek infekce houbovými patogeny.

Podobné trendy byly zjištěny také pro jednotlivé skupiny HSP90. V rámci ošetření rostlin rajčat pomocí *P. oligandrum*, se ukázalo zvýšení proteinu 80 kDa a 45 kDa po ošetření kmenem 42, a 35 kDa po ošetření kmenem M1. Vliv patogenních hub je také více patrný v případě infekce *A. brassicicola*, zvýšení zastoupení proteinů 80 kDa, 57 kDa, 45 kDa a 35

kDa a to především v rostlinách neošetřených oomycetou *P. oligandrum*. Zvýšení je vidět i pro protein 35 kDa a izoláty 48 a 42 (Obr. č. 14). Vliv *V. longisporum* na proteiny HSP90 je menší. V rostlinách řepky bylo také nalezeno více proteinů, které interagovaly s protilátkami proti HSP90, a to 43 kDa, 38 kDa a 31 kDa, avšak žádný v oblasti kolem 90 kDa. Pro rostliny řepky neošetřené *P. oligandrum* platí podstatné snížení všech tří proteinů vlivem hub *A. brassicicola* a *V. longisporum*. Zvýšení HSP90 v rostlinách řepky ošetřené *P. oligandrum* bylo zjištěno jen pro některé kombinace (*A. brassicicola*, kmen 48, 43 kDa a kmen 42, 31 kDa; *V. longisporum*, kmen M1, 43 kDa a kmen 42, 31 kDa). Z těchto dat vyplývá, že i skupina proteinů HSP90 se podílí na metabolismu rostlin v podmínkách houbové infekce, avšak komplexním způsobem a v závislosti na rostlinném druhu.

Vliv fytopatogenů v rostlinách rajčat a řepky olejné na přítomnost PR proteinů

S biotickým stresem, tedy s patogenezí souvisí „pathogenesis related proteins“, tzv. PR proteinů. I když jejich funkce není zcela jasná, mnohé mají enzymovou aktivitu, patří mezi chitinasy, glukanasu nebo peroxidasy. V této bakalářské práci bylo sledováno zastoupení PR-1, PR-2 a PR-3 proteinů v experimentálních skupinách rajčat a řepky olejné. Byl sledován vliv moření semen rostlin prostředky na bázi kmenů *P. oligandrum* a vliv houbových fytopatogenů na přítomnost těchto PR proteinů. Z literatury nejsou známy podobné pokusy, které by sledovaly expresi PR proteinů v rostlinách ošetřených oomycetou *Pythium oligandrum*. Satková et al. (2017) sledovala v rostlinách rajčete po aplikaci elicitoru oligandrinu mRNA pro chitinasy a glukanasu. Zjistila významné změny v jejich zastoupení, podobně jako po infekci *Oidium neolyopersici* ¹²⁸.

Přítomnost PR-1 proteinů byla testována pomocí protilátek proti PR-1 proteinu. Jeho zastoupení bylo velmi nízké, v rostlinách řepky nedetekovatelné, v rajčatech byla nízká přítomnost zjištěna v rostlinách infikovaných houbou *A. brassicicola*.

PR-2 proteiny byly patrné ve všech rostlinách rajčat, jak ošetřených kmeny *P. oligandrum*, tak infikované *A. brassicicola* a *V. longisporum*. Ošetření rostlin rajčat kmeny *P. oligandrum* znamenalo spíše snížení PR-2 proteinů, infekce *A. brassicicola* a *V. longisporum* zastoupení třídy I a II PR-2 proteinů příliš neovlivnilo. Tento výsledek byl značně překvapivý, neboť mnoho typů biotického stresu vede ke zvýšené expresi PR-2 proteinů ⁹⁸. Z dosavadních výsledků vyplývá, že v rostlinách rajčat by mohla být exprese PR-2 proteinů konstitutivní.

Množství PR-2 proteinů se v průběhu infekce a úspěšnými obrannými reakcemi může vracet jejich koncentraci na základní hladinu. Jiná situace byla zjištěna pro rostliny řepky olejné, kde v neinfikovaných kontrolních rostlinách nebyl PR-2 protein nalezen, nižší hodnoty byly v rostlinách řepky infikované houbou *V. longisporum* a vyšší hodnoty v zastoupení PR-2 proteinů po infekci *A. brassicicola*.

PR-3 proteiny v rajčatech byly detekovány ve formě třídy II, IV, a V, avšak všechny byly nalezeny i v neinfikovaných kontrolách, zvýšení bylo patrné jen pro třídu V a infekci *A. brassicicola*. Podobná situace byla i v případě rostlin řepky olejné.

6. Shrnutí

1. Byly zjištěny proteiny, které interagovaly s protilátkami proti HSP70. V případě rostlin rajčete jedlého měly relativní molekulovou hmotnost 73 kDa, 56 kDa, 38 kDa a 33 kDa, v rostlinách řepky olejně byl nalezen pouze protein o velikosti 33 kDa. Vlivem infekce patogenními houbami *Alternaria brassicicola* a *Verticillium longisporum* se zvýšilo zastoupení především proteinu 33 kDa.
2. Proteiny, které interagovaly s protilátkami proti HSP90, měly v rostlinách rostlin rajčat relativní molekulovou hmotnost 80 kDa, 57 kDa, 45 kDa a 35 kDa. Jejich zvýšení vlivem houbové infekce bylo zjištěno pro rostliny ošetřené některými kmeny *Pythium oligandrum*. V rostlinách řepky měly tyto proteiny velikost 43 kDa, 38 kDa a 31 kDa. Vlivem infekce *Alternaria brassicicola* a *Verticillium longisporum* došlo k podstatnému snížení těchto proteinů v rostlinách neošetřených kmeny *Pythium oligandrum*.
3. PR-1 proteiny byly v infikovaných rostlinách rajčat zastoupeny velmi slabě, v rostlinách řepky olejně byly nedetekovatelné.
4. PR-2 proteiny byly přítomny v rajčatech i v neinfikovaných kontrolách, vlivem infekce *Alternaria brassicicola* a *Verticillium longisporum* došlo spíše k jejich snížení. Jiná situace byla v rostlinách řepky olejně, PR-2 proteiny byly syntetizovány pouze vlivem infekce.
5. PR-3 proteiny byly zastoupeny v rostlinách i bez infekce, v rajčatech se vlivem *Alternaria brassicicola* zvyšuje pouze třída V.

7. Seznam použité literatury

1. Douberová V, Ryšlavá H. Roles of HSP70 in Plant Abiotic Stress. In: Gaur RK, Sharma P, eds. *Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress*. CRC Press Taylor & Francis Group; :44-66.
2. Gething M-J, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature*. 1992;355(6355):33-45. doi:10.1038/355033a0
3. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia*. 1962;18(12):571-573. doi:10.1007/BF02172188
4. Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*. 1974;84(3):389-398. doi:10.1016/0022-2836(74)90447-1
5. Lindquist S. The Heat-Shock Response. :44.
6. Nover L. *Heat Shock Response*. CRC Press; 1991.
7. Neumann D, Nover L, Parthier B, et al. Heat shock and other stress response systems of plants. *Results Probl Cell Differ*. 1989;16:1-155.
8. Baniwal SK, Bharti K, Chan KY, et al. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci*. 2004;29(4):471-487. doi:10.1007/bf02712120
9. Atkinson NJ, Urwin PE. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot*. 2012;63(10):3523-3543. doi:10.1093/jxb/ers100
10. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 1996;381(6583):571-580. doi:10.1038/381571a0
11. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell*. 1998;92(3):351-366. doi:10.1016/S0092-8674(00)80928-9
12. Liu D, Zhang X, Cheng Y, Takano T, Liu S. rHsp90 gene expression in response to several environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol Biochem PPB*. 2006;44(5-6):380-386. doi:10.1016/j.plaphy.2006.06.011
13. Boston RS, Viitanen PV, Vierling E. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol Biol*. 1996;32(1-2):191-222. doi:10.1007/bf00039383
14. Tiwari S, Thakur R, Shankar J. Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi. Biotechnology Research International. doi:https://doi.org/10.1155/2015/132635
15. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(8):545-555. doi:10.1038/nrm2938
16. Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(1):4-19. doi:10.1038/nrm.2017.73

17. Ali A, Bharadwaj S, O'Carroll R, Ovsenek N. HSP90 Interacts with and Regulates the Activity of Heat Shock Factor 1 in *Xenopus* Oocytes. *Mol Cell Biol*. 1998;18(9):4949-4960. doi:10.1128/MCB.18.9.4949
18. Calderwood SK, Xie Y, Wang X, et al. Signal Transduction Pathways Leading to Heat Shock Transcription. *Signal Transduct Insights*. 2010;2:13-24. doi:10.4137/STI.S3994
19. Xia W, Voellmy R. Hyperphosphorylation of Heat Shock Transcription Factor 1 Is Correlated with Transcriptional Competence and Slow Dissociation of Active Factor Trimers. *J Biol Chem*. 1997;272(7):4094-4102. doi:10.1074/jbc.272.7.4094
20. Scharf K-D, Berberich T, Ebersberger I, Nover L. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech*. 2012;1819(2):104-119. doi:10.1016/j.bbagr.2011.10.002
21. Driedonks N, Xu J, Peters JL, Park S, Rieu I. Multi-Level Interactions Between Heat Shock Factors, Heat Shock Proteins, and the Redox System Regulate Acclimation to Heat. *Front Plant Sci*. 2015;6:999. doi:10.3389/fpls.2015.00999
22. Waters ER, Lee GJ, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot*. 1996;47(3):325-338. doi:10.1093/jxb/47.3.325
23. Vierling E. The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1991;42(1):579-620. doi:10.1146/annurev.pp.42.060191.003051
24. Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, et al. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ Sci Pollut Res*. 2014;21(7):4847-4860. doi:10.1007/s11356-013-1807-6
25. Al-Wahaibi MH. Plant heat-shock proteins: A mini review. *J King Saud Univ - Sci*. 2011;23(2):139-150. doi:10.1016/j.jksus.2010.06.022
26. Wimmer B, Lottspeich F, Klei I van der, Veenhuis M, Gietl C. The glyoxysomal and plastid molecular chaperones (70-kDa heat shock protein) of watermelon cotyledons are encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94(25):13624-13629. doi:10.1073/pnas.94.25.13624
27. Chen Z, Zhou T, Wu X, Hong Y, Fan Z, Li H. Influence of cytoplasmic heat shock protein 70 on viral infection of *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol*. 2008;9(6):809-817. doi:10.1111/j.1364-3703.2008.00505.x
28. Schroda M, Kropat J, Oster U, et al. A role for molecular chaperones in assembly and repair of photosystem II? *Biochem Soc Trans*. 2001;29:413-418. doi:10.1042/BST0290413
29. Parsell DA, Lindquist S. Heat shock proteins and stress tolerance. *Biol Heat Shock Proteins Mol Chaperons*. Published online January 1, 1994:457-494.
30. Frydman J. Folding of Newly Translated Proteins In Vivo: The Role of Molecular Chaperones. *Annu Rev Biochem*. 2001;70(1):603-647. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.603
31. Guy CL, Li Q-B. The Organization and Evolution of the Spinach Stress 70 Molecular Chaperone Gene Family. *Plant Cell*. 1998;10(4):539-556. doi:10.1105/tpc.10.4.539

32. Sung D-Y, Kaplan F, Guy CL. Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiol Plant*. 2001;113(4):443-451. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1130402.x
33. Zhang Y, Zuiderweg ERP. The 70-kDa heat shock protein chaperone nucleotide-binding domain in solution unveiled as a molecular machine that can reorient its functional subdomains. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(28):10272-10277. doi:10.1073/pnas.0401313101
34. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2005;62(6):670-684. doi:10.1007/s00018-004-4464-6
35. Fernández-Fernández M, Valpuesta J. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. *F1000Research*. 2018;7:1497. doi:10.12688/f1000research.15528.1
36. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*. 2016;353(6294). doi:10.1126/science.aac4354
37. Lin BL, Wang JS, Liu HC, et al. Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones*. 2001;6(3):201-208. doi:10.1379/1466-1268(2001)006<0201:gaoths>2.0.co;2
38. Zhang X-P, Glaser E. Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci*. 2002;7(1):14-21. doi:10.1016/S1360-1385(01)02180-X
39. Schroda M, Vallon O, Wollman F-A, Beck CF. A Chloroplast-Targeted Heat Shock Protein 70 (HSP70) Contributes to the Photoprotection and Repair of Photosystem II during and after Photoinhibition. *Plant Cell*. 1999;11(6):1165-1178. doi:10.1105/tpc.11.6.1165
40. Tsugeki R, Nishimura M. Interaction of homologues of Hsp70 and Cpn60 with ferredoxin-NADP⁺ reductase upon its import into chloroplasts. *FEBS Lett*. 1993;320(3):198-202. doi:10.1016/0014-5793(93)80585-i
41. Qi Y, Wang H, Zou Y, et al. Over-expression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice. *FEBS Lett*. 2011;585(1):231-239. doi:10.1016/j.febslet.2010.11.051
42. Craig EA, Huang P, Aron R, Andrew A. The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2006;156:1-21. doi:10.1007/s10254-005-0001-0
43. Pobre KFR, Poet GJ, Hendershot LM. The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J Biol Chem*. Published online December 18, 2018;jbc.REV118.002804. doi:10.1074/jbc.REV118.002804
44. Cho EK, Choi YJ. A nuclear-localized HSP70 confers thermoprotective activity and drought-stress tolerance on plants. *Biotechnol Lett*. 2009;31(4):597-606. doi:10.1007/s10529-008-9880-5
45. Krishna P, Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones*. 2001;6(3):238-246.
46. Schröder G, Beck M, Eichel J, Vetter HP, Schröder J. HSP90 homologue from Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): cDNA sequence, regulation of protein expression and

- location in the endoplasmic reticulum. *Plant Mol Biol.* 1993;23(3):583-594.
doi:10.1007/bf00019305
47. Pearl LH, Prodromou C. Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr Opin Struct Biol.* 2000;10(1):46-51. doi:10.1016/s0959-440x(99)00047-0
 48. Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A. The HSP90 family of genes in the human genome: Insights into their divergence and evolution. *Genomics.* 2005;86(6):627-637.
doi:10.1016/j.ygeno.2005.08.012
 49. Cadepond F, Jibard N, Binart N, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I, Baulieu EE. Selective deletions in the 90 kDa heat shock protein (hsp90) impede hetero-oligomeric complex formation with the glucocorticosteroid receptor (GR) or hormone binding by GR. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994;48(4):361-367. doi:10.1016/0960-0760(94)90076-0
 50. Buchner J. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci.* 1999;24(4):136-141.
doi:10.1016/s0968-0004(99)01373-0
 51. Hessling M, Richter K, Buchner J. Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(3):287-293. doi:10.1038/nsmb.1565
 52. Weikl T, Muschler P, Richter K, Veit T, Reinstein J, Buchner J. C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle 1 Edited by R. Huber. *J Mol Biol.* 2000;303(4):583-592. doi:10.1006/jmbi.2000.4157
 53. Röhl A, Rohrberg J, Buchner J. The chaperone Hsp90: changing partners for demanding clients. *Trends Biochem Sci.* 2013;38(5):253-262. doi:10.1016/j.tibs.2013.02.003
 54. Jackson SE, Queitsch C, Toft D. Hsp90: from structure to phenotype. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(12):1152-1155. doi:10.1038/nsmb1204-1152
 55. Terasawa K, Minami M, Minami Y. Constantly Updated Knowledge of Hsp90. *J Biochem (Tokyo).* 2005;137(4):443-447. doi:10.1093/jb/mvi056
 56. Felts SJ, Owen BA, Nguyen P, Trepel J, Donner DB, Toft DO. The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *J Biol Chem.* 2000;275(5):3305-3312. doi:10.1074/jbc.275.5.3305
 57. Toft DO. Recent Advances in the Study of hsp90 Structure and Mechanism of Action. *Trends Endocrinol Metab.* 1998;9(6):238-243. doi:10.1016/S1043-2760(98)00060-5
 58. Flores-Pérez Ú, Jarvis P. Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2013;1833(2):332-340.
doi:10.1016/j.bbamcr.2012.03.019
 59. Botër M, Amigues B, Peart J, et al. Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity. *Plant Cell.* 2007;19(11):3791-3804. doi:10.1105/tpc.107.050427
 60. Ye R, Wang W, Iki T, et al. Cytoplasmic Assembly and Selective Nuclear Import of Arabidopsis ARGONAUTE4/siRNA Complexes. *Mol Cell.* 2012;46(6):859-870.
doi:10.1016/j.molcel.2012.04.013

61. Craig EA, Gambill BD, Nelson RJ. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev.* 1993;57(2):402-414.
62. Zuehlke A, Johnson JL. Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers.* 2010;93(3):211-217. doi:10.1002/bip.21292
63. Ali S, Ganai B, Kamili A, et al. Pathogenesis-Related Proteins and Peptides as Promising Tools for Engineering Plants with Multiple Stress Tolerance. *Microbiol Res.* 2018;212. doi:10.1016/j.micres.2018.04.008
64. Antoniwi JF, Ritter CE, Pierpoint WS, Van Loon LC. Comparison of Three Pathogenesis-related Proteins from Plants of Two Cultivars of Tobacco Infected with TMV. *J Gen Virol.* 1980;47(1):79-87. doi:10.1099/0022-1317-47-1-79
65. Van Loon LC. Regulation of Changes in Proteins and Enzymes Associated with Active Defence against Virus Infection. In: Wood RKS, ed. *Active Defense Mechanisms in Plants.* NATO Advanced Study Institutes Series. Springer US; 1982:247-273. doi:10.1007/978-1-4615-8309-7_14
66. Green TR, Ryan CA. Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism against Insects. *Science.* 1972;175(4023):776-777. doi:10.1126/science.175.4023.776
67. Vera P, Conejero V. Pathogenesis-Related Proteins of Tomato: P-69 as an Alkaline Endoproteinase. *Plant Physiol.* 1988;87(1):58-63. doi:10.1104/pp.87.1.58
68. Métraux JP, Streit L, Staub Th. A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiol Mol Plant Pathol.* 1988;33(1):1-9. doi:10.1016/0885-5765(88)90038-0
69. Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M, Rothstein S. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84(21):7542-7546. doi:10.1073/pnas.84.21.7542
70. Somssich IE, Schmelzer E, Bollmann J, Hahlbrock K. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1986;83(8):2427-2430. doi:10.1073/pnas.83.8.2427
71. Melchers L, Apotheker-de Groot M, van der Knaap J, et al. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. - Abstract - Europe PMC. Accessed April 1, 2020. <https://europepmc.org/article/med/8012401>
72. Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, et al. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell.* 1995;7(5):573-588. doi:10.1105/tpc.7.5.573
73. Epple P, Apel K, Bohlmann H. An Arabidopsis thaliana Thionin Gene Is Inducible via a Signal Transduction Pathway Different from That for Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiol.* 1995;109(3):813-820. doi:10.1104/pp.109.3.813
74. García-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* 1995;3(2):72-74. doi:10.1016/S0966-842X(00)88879-4

75. Zhang Z, Collinge DB, Thordal-Christensen H. Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J.* 1995;8(1):139-145. doi:10.1046/j.1365-313X.1995.08010139.x
76. Wei Y, Zhang Z, Andersen CH, et al. An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol.* 1998;36(1):101-112. doi:10.1023/A:1005955119326
77. Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol.* 2000;42(3):479-488. doi:10.1023/A:1006393326985
78. Van Loon LC, Van Kammen A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology.* 1970;40(2):199-211. doi:10.1016/0042-6822(70)90395-8
79. Bol JF, Linthorst HJM, Cornelissen BJC. Plant Pathogenesis-Related Proteins Induced by Virus Infection. *Annu Rev Phytopathol.* 1990;28(1):113-138. doi:10.1146/annurev.py.28.090190.000553
80. van Baarlen P, van Belkum A, Summerbell RC, Crous PW, Thomma BPHJ. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31(3):239-277. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00065.x
81. Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem PPB.* 2008;46(11):941-950. doi:10.1016/j.plaphy.2008.06.011
82. Edreva A. PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS: RESEARCH PROGRESS IN THE LAST 15 YEARS. Published online May 27, 2005:20.
83. HEIL M, BOSTOCK RM. Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Ann Bot.* 2002;89(5):503-512. doi:10.1093/aob/mcf076
84. Dyakov Y, Dzhavakhiya V, Korpela T. *Comprehensive and Molecular Phytopathology.* Elsevier; 2007. doi:10.1016/B978-0-444-52132-3.X5000-7
85. Ali S, Mir Z, Tyagi A, et al. Identification and comparative analysis of *Brassica juncea* pathogenesis-related genes in response to hormonal, biotic and abiotic stresses. *Acta Physiol Plant.* 2017;39. doi:10.1007/s11738-017-2565-8
86. van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* 2006;44:135-162. doi:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425
87. Vidhyasekaran P. *Bacterial Disease Resistance in Plants: Molecular Biology and Biotechnological Applications.* CRC Press; 2002.
88. Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, et al. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90(15):7327-7331. doi:10.1073/pnas.90.15.7327

89. Niderman T, Genetet I, Bruyère T, et al. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 1995;108(1):17-27.
90. Vera P, Hernández-Yago J, Conejero V. 'Pathogenesis-related' P1(p14) Protein. Vacuolar and Apoplastic Localization in Leaf Tissue from Tomato Plants Infected with Citrus Exocortis Viroid; in vitro Synthesis and Processing. *J Gen Virol.* 1989;70(8):1933-1942. doi:10.1099/0022-1317-70-8-1933
91. Sessa G, Yang X-Q, Raz V, Eyal Y, Fluhr R. Dark induction and subcellular localization of the pathogenesis-related PRB-1b protein. *Plant Mol Biol.* 1995;28(3):537-547. doi:10.1007/BF00020400
92. Hoegen E, Strömberg A, Pihlgren U, Kombrink E. Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato†. *Mol Plant Pathol.* 2002;3(5):329-345. doi:10.1046/j.1364-3703.2002.00126.x
93. Dixon D c., Cutt J r., Klessig D f. Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts. *EMBO J.* 1991;10(6):1317-1324. doi:10.1002/j.1460-2075.1991.tb07650.x
94. Bortolotti C, Murillo I, Fontanet P, Coca M, San Segundo B. Long-distance transport of the maize pathogenesis-related PRms protein through the phloem in transgenic tobacco plants. *Plant Sci.* 2005;168:813-821. doi:10.1016/j.plantsci.2004.10.019
95. Cornelissen BJ, Hooft van Huijsduijnen RA, Van Loon LC, Bol JF. Molecular characterization of messenger RNAs for "pathogenesis related" proteins la, lb and lc, induced by TMV infection of tobacco. *EMBO J.* 1986;5(1):37-40.
96. PAYNE G, MIDDLESTEADT W, DESAI N, et al. Isolation and sequence of a genomic clone encoding the basic form of pathogenesis-related protein 1 from *Nicotiana tabacum*. *Isol Seq Genomic Clone Encoding Basic Form Pathog-Relat Protein 1 Nicotiana Tabacum.* 1989;12(5):595-596.
97. Sessa G, Meller Y, Fluhr R. A GCC element and a G-box motif participate in ethylene-induced expression of the PRB-1b gene. *Plant Mol Biol.* 1995;28(1):145-153. doi:10.1007/BF00042046
98. Kirubakaran SI, Sakthivel N. Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2007;52(1):159-166. doi:10.1016/j.pep.2006.08.012
99. Pan SQ, Ye XS, Kuć J. Direct detection of beta-1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *Anal Biochem.* 1989;182(1):136-140. doi:10.1016/0003-2697(89)90730-6
100. Simmons CR. The Physiology and Molecular Biology of Plant 1,3-β-D-Glucanases and 1,3;1,4-β-D-Glucanases. *Crit Rev Plant Sci.* 1994;13(4):325-387. doi:10.1080/07352689409701919
101. Adams DJ. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiol Read Engl.* 2004;150(Pt 7):2029-2035. doi:10.1099/mic.0.26980-0

102. Siddappa S, Arthikala MK, Sreevathsa R, et al. Enhanced protection against two major fungal pathogens of groundnut, *Cercospora arachidicola* and *Aspergillus flavus* in transgenic groundnut over-expressing a tobacco β 1–3 glucanase. *Eur J Plant Pathol*. 2010;126:497-508. doi:10.1007/s10658-009-9556-6
103. Mackintosh CA, Lewis J, Radmer LE, et al. Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to *Fusarium* head blight. *Plant Cell Rep*. 2007;26(4):479-488. doi:10.1007/s00299-006-0265-8
104. Beachy RN, Heinlein M. Role of P30 in replication and spread of TMV. *Traffic Cph Den*. 2000;1(7):540-544. doi:10.1034/j.1600-0854.2000.010703.x
105. Levy A, Guenoune-Gelbart D, Epel BL. β -1,3-Glucanases. *Plant Signal Behav*. 2007;2(5):404-407.
106. Bucher GL, Tarina C, Heinlein M, Serio FD, Meins F, Iglesias VA. Local expression of enzymatically active class I β -1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. *Plant J*. 2001;28(3):361-369. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.01181.x
107. Akiyama T, Pillai MA, Sentoku N. Cloning, characterization and expression of OsGLN2, a rice endo-1,3- β -glucanase gene regulated developmentally in flowers and hormonally in germinating seeds. *Planta*. 2004;220(1):129-139.
108. Datta SK, Muthukrishnan S, eds. *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press; 1999.
109. Doxey AC, Yaish MWF, Moffatt BA, Griffith M, McConkey BJ. Functional divergence in the *Arabidopsis* beta-1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Mol Biol Evol*. 2007;24(4):1045-1055. doi:10.1093/molbev/msm024
110. Klarzynski O, Plesse B, Joubert J-M, et al. Linear β -1,3 Glucans Are Elicitors of Defense Responses in Tobacco. *Plant Physiol*. 2000;124(3):1027-1038.
111. Mohammadi M, Karr AL. β -1,3-Glucanase and chitinase activities in soybean root nodules. *J Plant Physiol*. 2002;159(3):245-256. doi:10.1078/0176-1617-00702
112. Sela-Buurlage MB, Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Melchers LS, Van Den Elzen PJM, Cornelissen BJC. Only Specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Chitinases and [β]-1,3-Glucanases Exhibit Antifungal Activity. *Plant Physiol*. 1993;101(3):857-863.
113. Vögeli-Lange R, Fründt C, Hart CM, Nagy F, Meins F. Developmental, hormonal, and pathogenesis-related regulation of the tobacco class I β -1,3-glucanase B promoter. *Plant Mol Biol*. 1994;25(2):299-311. doi:10.1007/BF00023245
114. Sticher L, Hinz U, Meyer AD, Meins F. Intracellular transport and processing of a tobacco vacuolar β -1,3-glucanase. *Planta*. 1992;188(4):559-565. doi:10.1007/BF00197049
115. Ori N, Sessa G, Lotan T, Himmelhoch S, Fluhr R. A major stylar matrix polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. *EMBO J*. 1990;9(11):3429-3436. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb07550.x
116. Beffa RS, Neuhaus JM, Meins F. Physiological compensation in antisense transformants: specific induction of an “ersatz” glucan endo-1,3-beta-glucosidase in plants infected with necrotizing viruses. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90(19):8792-8796. doi:10.1073/pnas.90.19.8792

117. Jogaiah S, Sharathchandra R, Amruthesh K, Kumar A, Kumar A, Shetty S. Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response. In: ; 2012. doi:10.13140/2.1.2445.2163
118. Hart PJ, Pfluger HD, Monzingo AF, Hollis T, Robertus JD. The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 1995;248(2):402-413.
119. Holm L, Sander C. Structural similarity of plant chitinase and lysozymes from animals and phage. An evolutionary connection. *FEBS Lett.* 1994;340(1-2):129-132. doi:10.1016/0014-5793(94)80187-8
120. Shinshi H, Mohnen D, Meins F. Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(1):89-93.
121. Neuhaus JM, Sticher L, Meins F, Boller T. A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(22):10362-10366.
122. Sticher L, Hofsteenge J, Milani A, Neuhaus JM, Meins F. Vacuolar chitinases of tobacco: a new class of hydroxyproline-containing proteins. *Science.* 1992;257(5070):655-657. doi:10.1126/science.1496378
123. Beerhues L, Kombrink E. Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3-β-glucanase in potato. *Plant Mol Biol.* 1994;24(2):353-367. doi:10.1007/BF00020173
124. De Tapia M, Dietrich A, Burkard G. In vitro synthesis and processing of a bean pathogenesis-related (PR4) protein. *Eur J Biochem.* 1987;166(3):559-563. doi:10.1111/j.1432-1033.1987.tb13550.x
125. Lerner DR, Raikhel NV. The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and a chitinase. *J Biol Chem.* 1992;267(16):11085-11091.
126. Berglund L, Brunstedt J, Nielsen KK, Chen Z, Mikkelsen JD, Marcker KA. A proline-rich chitinase from *Beta vulgaris*. *Plant Mol Biol.* 1995;27(1):211-216. doi:10.1007/BF00019193
127. Benhamou N, le Floch G, Vallance J, Gerbore J, Grizard D, Rey P. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiol Read Engl.* 2012;158(Pt 11):2679-2694. doi:10.1099/mic.0.061457-0
128. Satková P, Starý T, Plešková V, et al. Diverse responses of wild and cultivated tomato to BABA, oligandrin and *Oidium neolycopersici* infection. *Ann Bot.* 2017;119(5):829-840. doi:10.1093/aob/mcw188