

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Petr Machek**

Protein HSP90 a jeho funkce v rostlinné buňce  
Heat shock protein 90 and its functions in plant cells

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jana Krtková, Ph.D.

Praha, 2018



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16.8. 2018

.....  
Petr Machek

## Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Janě Krtkové, Ph.D. za její shovívavost a trpělivost, a především děkuji své přítelkyni Karolíně Březové za její nekonečnou trpělivost.

# Obsah

Abstrakt .....	6
Abstract .....	6
1. Úvod.....	7
2. Domény a struktura proteinu Hsp90 .....	7
2.1. Přejchody mezi otevřeným a zavřeným komplexem.....	8
2.2. Specifické inhibitory.....	9
2.3. Izoformy Hsp90 v rostlinných genomech .....	9
3. Chaperonová funkce .....	10
3.1. Chaperonová aktivita Hsp90 .....	10
3.2. Teplotní šok.....	10
4. Úloha Hsp90 v signalizaci .....	13
5. Úloha Hsp90 v imunitních reakcích rostlinných buněk.....	14
5.1. Maturace NLR proteinů .....	15
5.2. Role ve virové infekci .....	16
6. Transportní funkce .....	17
7. Závěr .....	18
8. Použitá literatura .....	19

## Seznam použitých zkratek

ADP	Adenosindifosfát
AFB2	Auxin response F-box 2
ATP	Adenosintrifosfát
BR	Brassinosteroid
BES1	BRI1-EMS-suppressor 1
BIN2	Brassinosteroid insensitive 2
ETI	Effector-triggered immunity
GDA	Geldanamycin
HSE	Heat shock element
HSF	Heat shock factor
HSR	Heat shock reaction
HSP70	Heat shock protein 70
HSP90	Heat shock protein 90
HtpG	High temperature protein G
RAR1	Required for <i>Mla12</i> resistance
ROF1, ROF2	Regulator of fluffy (1, 2)
RD	radicicol
sHSP	Short heat shock protein
SGT1	Suppressor of G2 allele of SKP1
TIR1	Transport inhibitor response 1
TPR	Tetratricopeptide repeat
TYLCV	Tomato yellow leaf curl virus, virus žluté kadeřavosti listů rajčete

## **Abstrakt**

Heat shock protein 90 (Hsp90) je chaperonový protein, který se účastní mnoha buněčných funkcí. V práci je stručně popsána jeho struktura, a jeho role v teplotním šoku. Dále je popsána úloha v imunitních reakcích, signalizaci v rostlinné buňce a jeho úloha v transportu některých proteinů.

**Klíčová slova:** Hsp90, rostlinná buňka, rostlinná imunita, stres

## **Abstract**

Heat shock protein 90 (Hsp90) is a chaperone protein, that is involved in many cell functions. This work briefly describes its structure and its role in heat shock. It's role in plant immunity, signalization and transport of selected proteins is also summarized.

**Keywords:** Hsp90, plant cell, plant immunity, stress

# 1. Úvod

Heat shock protein 90 (Hsp90) je protein evolučně konzervovaný a přítomný u širokého spektra eukaryotických organismů, který má svůj homolog i u prokaryotních organismů (high-temperature protein G, HtpG). U eukaryotních buněk vykonává nezastupitelné funkce v udržování drah signální transdukce, reakce na stres a imunitní odpovědi. Přítomnost Hsp90 je nezbytná pro přežití i mimo stresové podmínky. Za fyziologických podmínek tvoří přibližně 1 % všech proteinů obsažených v buňce a při stresových podmínkách tento podíl dramaticky vzrůstá. Jelikož je struktura Hsp90 v rostlinných i živočišných buňkách velmi podobná, mnohé poznatky na úrovni struktur a domén lze považovat za přenositelné mezi jednotlivými studovanými organismy. Mnohé role Hsp90 jsou ovšem specifické pro rostlinnou buňku, kvůli odlišným signalizačním partnerům, rozdílnému významu teplotního stresu a významným rozdílům mezi imunitou živočichů a rostlin.

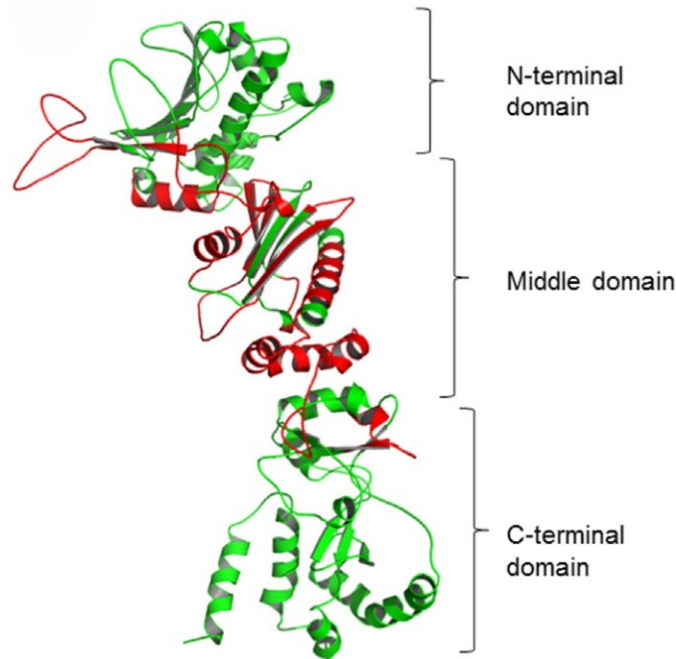
Cílem této bakalářské práce je určení funkce proteinů rodiny Hsp90 v rostlinných buňkách, zvláště pak funkcí, které jsou pro rostliny specifické. Dále pak vysvětlit tyto funkce na molekulární úrovni.

## 2. Domény a struktura proteinu Hsp90

Proteiny *Hsp90* se skládají ze tří strukturních domén, konkrétně z N-koncové domény, střední M domény a C-koncové domény, a linkeru nabitých aminokyselin, který propojuje M doménu a N-koncovou doménu a který je důležitý pro vazbu některých klientních proteinů. N-koncová doména váže adenosintrifosfát (ATP) a má ATPázovou aktivitu. M doména flexibilně spojuje N- a C-koncovou doménu a účastní se vazby kochaperonů. C-koncová doména představuje rozhraní pro vzájemnou vazbu dvou Hsp90 v homodimeru a obsahuje konzervovanou skupinu pěti aminokyselin MEEVD, která je nezbytná pro interakce s kochaperony, které se váží přes své tetratricopeptide repeat (TPR) domény (da Silva et al. 2013).

Sekvenci proteinu Hsp90 typicky tvoří 690-770 aminokyselin. Většina sekvence je evolučně zachována mezi jednotlivými druhy rostlin a je zde i vysoká sekvenční identita napříč říšemi a doménami. Hsp90 izolované ze *Saccharum spontaneum* má sekvenční identitu přes 85% s orthologními Hsp90 v rostlinách, 64% s Hsp82 ze *Saccharomyces cerevisiae* a 37% s HtpG z *Escherichia coli* (da Silva et al. 2013).





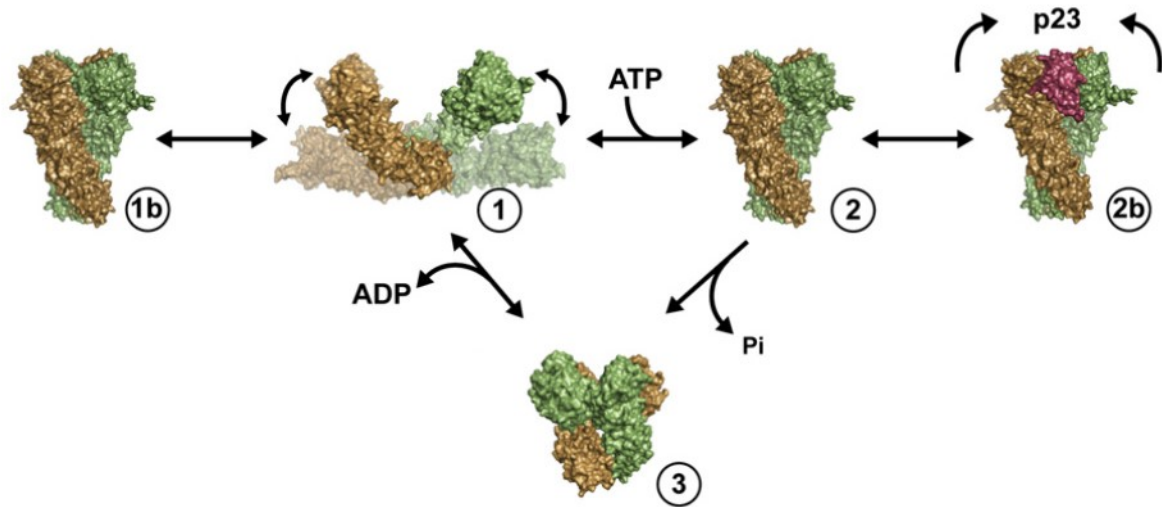
Obrázek 1 - Struktura proteinu Hsp90 (monomer), převzato z da Silva et al. 2013

N-koncová doména obsahuje „pokličku“, která se zavírá při vazbě ATP a umožňuje N-koncovým doménám dimerizovat. K ATPázové aktivitě Hsp90 přispívá i M doména, ve které se nalézá smyčka s postranními řetězci aminokyselin důležitými pro katalytickou reakci. Linker mezi N-koncovou a M doménou je velmi flexibilní a z přibližně 50 aminokyselin, které obsahuje, je 20-30 nabitých. Střední segment obsahuje hydrofobní oblast důležitou pro vazbu klientních proteinů (Meyer et al. 2003).

## 2.1. Přechody mezi otevřeným a zavřeným komplexem

Dimer Hsp90 se může nacházet ve třech stavech, mezi kterými cyklicky přechází. Otevřený stav bez navázaného ATP, zavřený stav s navázaným ATP a kompaktní stav s navázaným adenosindifosfátem (ADP). Navázání ATP do obou podjednotek způsobuje dimerizaci N-koncových domén, které se spojí a utvoří prstenec kolem substrátového proteinu a překříží se v těsnější konformaci. V této konformaci nemusí okamžitě dojít k hydrolyze ATP, vazba regulačního proteinu může tuto konformaci stabilizovat. Takovým regulačním proteinem může být kupříkladu p23, který se naváže mezi N-koncové domény a zabrání rozštěpení ATP. V případě že žádný regulační protein nebrání konformační změně, je ATP hydrolyzováno a dimer Hsp90 přejde do kompaktního stavu. Z tohoto stavu ADP rychle disociuje a dimer přechází opět do otevřené konformace, což dokončuje cyklus konformačních změn. Dimer

může dosáhnout uzavřené konformace i spontánně bez navázání ATP, ale z této konformace přechází jen zpět do otevřeného stavu (Southworth and Agard 2008).



Obrázek 2 - Konformační změny dimeru Hsp90. Převzato ze Southworth and Agard 2008

1) Otevřená konformace, bez vazby ATP, 1b) Spontánně dosažená uzavřená konformace bez vazby ATP, 2) Uzavřená konformace s navázaným ATP, 2b) Uzavřená konformace s navázaným ATP a regulačním proteinem p23, 3) Kompaktní konformace s navázaným ADP

## 2.2. Specifické inhibitory

Častým nástrojem studia proteinu Hsp90 je jeho specifický inhibitor, geldanamycin (GDA). Ten svojí Hsp90 inhibiční aktivitou funguje jako antibiotikum a potlačuje rozvoj některých tumorů, zřejmě vyčerpáním kináz z drah signální transdukce, na jejichž nadměrné expresi nebo deregulaci je rozvoj tumoru závislý (Stebbins et al. 1997). GDA se váže do ATP vazebné oblasti Hsp90 a blokuje tak přístup pro ATP, na němž je chaperonová aktivita závislá (Prodromou et al. 1997). Dalším často používaným specifickým inhibitorem Hsp90 je radicicol (RD), který se podobně jako GDA svojí strukturou blíží struktuře ATP. Další inhibitory Hsp90 jsou v současnosti cílem studia pro použití v léčbě rakoviny (Sidera and Patsavoudi 2014).

## 2.3. Izoformy Hsp90 v rostlinných genomech

Hsp90 se v rostlinných genomech vyskytuje zpravidla v několika kopiích. U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (Huseníček rolní) je známo 7 kódujících genů Hsp90 označovaných *AtHsp90.1-7*, které lze rozdělit do skupin podle jejich evoluční příbuznosti. Skupina I se sestává z cytosolických proteinů s dvěma nebo třemi introny (*AtHsp90.1, 2, 3, 4*), zatímco skupinu II tvoří organelární Hsp90 s 13-19 introny (*AtHsp90.5* lokalizovaný v chloroplastu, *AtHsp90.6* lokalizovaný v mitochondrii a *AtHsp90.7* lokalizovaný v endoplasmatickém retikulu (ER)).

Naproti tomu genom *Oryza sativa* (Rýže setá) obsahuje osm kopií a genom *Populus trichocarpa* (Topol chlupatoplodý) obsahuje deset kopií *Hsp90* rozložených na 9 chromosomech. Jednotlivé varianty genu se odlišují funkčně i buněčnou lokalizací a jejich exprese v průběhu vývoje rostliny i v odpovědi na stres je odlišná. V některých funkcích ale fungují zaměnitelně (Zhang et al. 2013).

Vícenásobný výskyt genu *Hsp90* v genomu umožňuje jak vyšší odolnost k poškození mutacemi, tak šanci pro evoluční specializaci variant pro odlišné funkce a přesnější odpovědi na stresové podněty (Zhang et al. 2013).

### **3. Chaperonová funkce**

Chaperony jsou takové proteiny, které pomáhají dalším proteinům v dosažení nebo udržení určité konformace. Jsou zapotřebí pro běžnou funkci buňky kvůli chybně sbaleným proteinům, proteinům, které vyžadují asistenci pro správné sbalení, či proteinům, které byly poškozeny. Protože k takovým poškozením může docházet nepříznivou teplotou nebo následkem působení infekce, je pochopitelné, že se chaperonové proteiny účastní i reakcí na tyto stresové podmínky a plní zde svou roli v udržení stability vnitřního prostředí buňky.

#### **3.1. Chaperonová aktivita Hsp90**

Proteiny Hsp90 plní svoje funkce skrze chaperonovou aktivitu. Hsp90 brání shlukování proteinů při jejich částečném rozbalení i při vysokých koncentracích proteinů, kde by shluky vznikaly samovolně. Shlukování dokáže bránit i bez spotřeby ATP (Johnson et al. 2000). Klientní proteiny zřejmě nesdílí přesně daný strukturální motiv, ale mají po povrchu rozprostřené hydrofobní postranní řetězce aminokyselin, které se nekonzentrují do větších hydrofobních ploch. Jelikož Hsp70 (Heat shock protein 70) rozpoznává a pomáhá sbalit proteiny s většími hydrofobními oblastmi na povrchu proteinů, často jeho aktivita předchází aktivitě Hsp90, který správné sbalení proteinu dokončí. Hsp90 takto podporuje sbalení nově syntetizovaných proteinů, ale může i upravit konformaci již sbalených proteinů (Karagöz et al. 2014). Předání klientního proteinu z Hsp70 na protein Hsp90 je zajišťováno pomocí kochaperonu Hsp70/Hsp90 organizing protein (HOP) (Chen and Smith 1998).

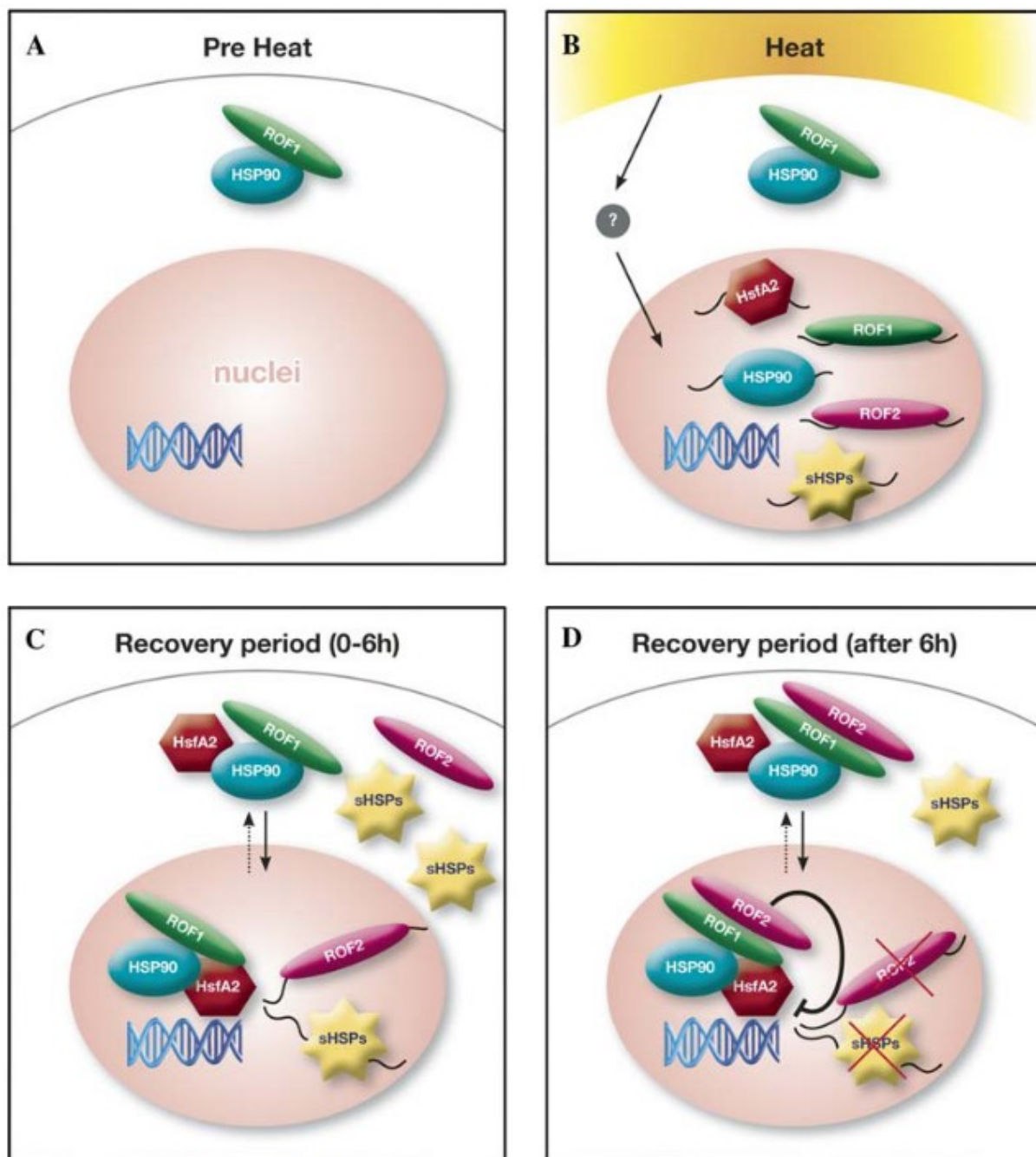
#### **3.2. Teplotní šok**

Veškeré organismy na Zemi zažívají určité formy stresu a ani rostliny nejsou výjimkou. Rostliny jako sesilní organismy mají jen velmi málo možností, jak se vyhnout nepříznivým

podmínkám. Mají proto rozvinuté mechanismy, které jim pomáhají těmto podmínkám čelit a udržet stálost vnitřního prostředí. Mezi významné stresory rostlin patří zvýšená teplota. Ta může způsobovat rozpad konformace proteinů, jejich rozvolnění a shlukování do agregátů a v konečném důsledku i smrt buňky. Rostlinám pomáhá Hsp90 tak, že ovlivňuje celou řadu procesů, které dávají rostlině možnost odolávat teplotním šokům. Proteiny jsou různě citlivé k vysokým teplotám, které mohou způsobovat jejich rozbalení z nativní konformace a odhalení hydrofobních reziduí, která se za normálních podmínek ukrývají v jádru proteinu. Při delším působení vysoké teploty se pak takto rozbalené proteiny mohou shlukovat a vytvářet agregáty. Ke smrti buňky však stačí i denaturace malého počtu zásadních proteinů (Leuenerberger et al. 2017).

Buněčná odpověď na teplotní šok (heat stress response, HSR) je na úrovni transkripce spouštěna Heat shock factor (HSF) proteiny, které se váží na DNA do míst takzvaných heat shock elements (HSE) a regulují zde transkripci. Touto cestou se aktivuje i transkripce *Hsp90* a dalších heat shock proteinů (HSP), které napomáhají zvládat problémy spojené s vysokou teplotou – denaturaci a agregaci proteinů. Chemická inhibice aktivity Hsp90 geldanamycinem či radicicolem způsobuje obdobnou reakci, jako teplotní šok. Aktivace teplem ovšem zasahuje více genů než aktivace geldanamycinem (Yoshida et al. 2011).

V následujícím obrázku je názorně ukázána role Hsp90 v odpovědi na teplotní šok. Ke správnému pochopení obrázku je třeba představit zúčastněné proteiny a zjednodušeně přiblížit jejich funkci. ROF1 a ROF2 jsou kochaperony také označované jako FKBP62 a FKBP65 ze skupiny FK506-binding proteins (FKBPs), které mají peptidyl prolyl cis-trans izomerázovou aktivitu, kterou napomáhají chaperonové aktivitě Hsp90 (Aviezer-Hagai et al. 2007). Short heat shock proteins (sHSP) jsou malé proteiny o hmotnosti 15-42 kDa, které rozpoznávají destabilizované proteiny, tvoří oligomery o 9–50 podjednotkách a mají různou chaperonovou funkci – od bránění vzniku shluků proteinů po správné balení proteinů. Heat shock transcription factor A2 (HsfA2) je transkripční faktor ovlivňující řadu teplotním šokem spouštěných genů (Yoshida et al. 2011).



Obrázek 3: Převzato z Meiri et al 2010

A) Stav před teplotním šokem, Hsp90 se v cytosolu váže s ROF1 B) Stav při vystavení teplotnímu šoku, produkce proteinů HsfA2, ROF1, ROF2, HSP90 a sHSP C) Zotavení se z teplotního šoku, HsfA2 se naváže na Hsp90 a vzniká komplex ROF1-HSP90.1-HsfA2, který translokuje do jádra. Tento komplex transkripčně aktivuje produkci sHSP a ROF2. D) Pozdější fáze zotavení, část ROF2 translokuje do jádra, váže se na ROF1 a způsobí zastavení transkripční aktivity HsfA2. Meiri et al. navrhuje model, ve kterém ROF2 působí jako senzor sHSP transkripce a negativní zpětnou vazbou ukončí aktivitu HsfA2.

HSF trimery se váží do HSE, což je specifická DNA sekvence (nGAAn), která se může 3krát opakovat pro lepší interakci s HSF (Schöffl, Prandl, and Reindl 1998). V podmínkách mimo teplotní šok se chaperony Hsp70 a Hsp90 inhibují. Hsp70 reprimuje aktivitu HsfA1 a brání mu jak ve vazbě na DNA, tak ve vazbě s HsfB1. Hsp90 ovlivňuje hladinu HsfA2 a HsfB1 modulací degradace *HsfA2* transkriptu. HsfB1 se váže s Hsp90 a aktivuje heat shock element (HSE) a je po vazbě s Hsp90 degradováno (Hahn et al. 2011)

Produkce ROF2 je u *Arabidopsis thaliana* také vyvolána jako odpověď na mírné okyselení cytosolu. Zvýšená exprese ROF2 aktivuje příjem  $K^+$  iontů, depolarizaci plasmatické membrány a následně aktivaci elektrogenní  $H^+$  pumpy. Tato depolarizace také umožňuje odolávat toxickým kationtům, které by do buňky jinak vnikaly díky membránovému potenciálu (Bissoli et al. 2012).

Za teplotně příznivých podmínek Hsp70 a Hsp90 negativně regulují HsfA1d. Plnohodnotná odpověď na teplotní šok je spouštěna spoluprací mnoha transkripčních faktorů (rodiny HsfA2, HsfA3) a přestože proteiny rodiny HsfA1 aktivují významný podíl HS genů, jejich konstitutivní aktivace nemá stejný výsledek, jako samotný teplotní šok (Ohama et al. 2015). Celý průběh HSR u rostlinných buněk není dosud objasněn a modely navrhované různými autory se v detailech odlišují.

## 4. Úloha Hsp90 v signalizaci

Rostlinné hormony řídí rychlost a směr růstu stonku i kořenů a jejich koordinace je nezbytná pro vývoj rostliny.

Hsp90 stimuluje růst za příznivých teplotních podmínek. Inhibice Hsp90 pomocí specifických inhibitorů vede na pomalejší růst za příznivých teplot a menší vznik primárních kořenů. Zrychlení růstu je následkem zvýšené biosyntézy auxinu, ale zpomalení růstu navozené inhibitorem Hsp90 není způsobeno nižší produkcí auxinu, nýbrž potlačenou reakcí Hsp90 s auxinovým koreceptory Auxin response F-box 2 (AFB2) a Transport inhibitor response 1 (TIR1), které jsou chaperonem stabilizovány. K této funkci je vyžadován i protein Suppressor of G2 allele of SKP1 (SGT1), který se účastní stabilizačního komplexu. Pokusy s inhibitory ukázaly, že Hsp90 je potřebný nejen při stresu, ale i pro normální fungování auxinové signalizační dráhy (Wang et al. 2016).

Regulátor brassinosteroidové (BR) signalizace, kináza Brassinosteroid insensitive 2 (BIN2), díky Hsp90 mění svojí buněčnou lokalizaci. Před aktivací BR receptoru BIN2 v jádře

fosforyluje transkripční faktory (BZR1 a BES1) spojené s BR signalizací a tím je deaktivuje. Po aktivaci BR receptoru na cytoplazmatické membráně translokují Hsp90 s BIN2 ven z jádra, transkripční faktory jsou defosforylovány a jejich aktivací je spuštěna odpověď na BR (Samakovli et al. 2014). Transkripční faktory Brassinazole resistant 1 (BZR1) a BRI1-EMS-suppressor 1 (BES1) jsou paralogy a pouze BES1 je klientem Hsp90. Blízká příbuznost těchto genů umožnila porovnat rychlost vzniku mutací a bylo zjištěno, že klientní BES1 prochází větším počtem evolučních změn v porovnání s BZR1. Podobný trend byl pozorován i u dalších genů, což naznačuje, že další funkcí Hsp90 je umožnění rychlejšího rozvoje klientních proteinů (Lachowiec et al. 2013). Tato vlastnost Hsp90 se zdá být výhodná obzvláště v souvislosti s imunitní funkcí Hsp90.

## 5. Úloha Hsp90 v imunitních reakcích rostlinných buněk

Součástí imunitního systému rostlin jsou takzvané nucleotide-binding and leucine-rich repeat-containing (NLR) proteiny, které jsou schopny rozpoznat přítomnost patogenních efektorů v buňce. Ty obsahují N-terminální coiled-coil (CC) nebo Toll/interleukin-1 receptor (TIR), centrální nucleotide-binding (NB) doménu, která váže ATP či ADP, v závislosti na stavu proteinu a leucine-rich repeat (LRR) doménu. Jejich senzorická funkce závisí na správné konformaci (El Kasmí and Nishimura 2016).

NLR se nalézají u rostlin i zvířat. U rostlin rodiny NLR čítají až stovky genů, podstatně více než u savců, kteří mají adaptivní imunitu a buňky specializované pro imunitní funkce. Zvířecí NLR rozeznávají buď pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) charakteristické pro mikroby, nebo damage-associated molecular patterns (DAMPs) které jsou původem z buněk hostitele, ale vyvolané patogenem. Rostlinné NLR slouží k rozpoznání efektorů zpravidla mikrobiálního původu a způsobují odpověď nazývanou effector-triggered immunity (ETI), která vede na programovanou buněčnou smrt (Jones and Dangl 2006).

Rozpoznávání patogenů zpravidla probíhá „jeden na jednoho“ v tom smyslu, že pro rozpoznání jednoho patogenního genu existuje jeden specifický NLR protein. Rozpoznání patogenu ovšem většinou neprobíhá pomocí přímé reakce NLR senzoru s patogenním proteinem, ale častěji senzor zjistí poškození endogenního proteinu rostliny. Nahromadění NLR může způsobit autoimunitní reakce. Hsp90, SGT1 a Required for *Mla12* resistance 1 (RAR1) jsou důležité pro udržení správné hladiny mnohých NLR, chaperonové funkce jsou proto důležité pro stabilitu NLR a tvorbu receptorových komplexů (Jones and Dangl 2006).

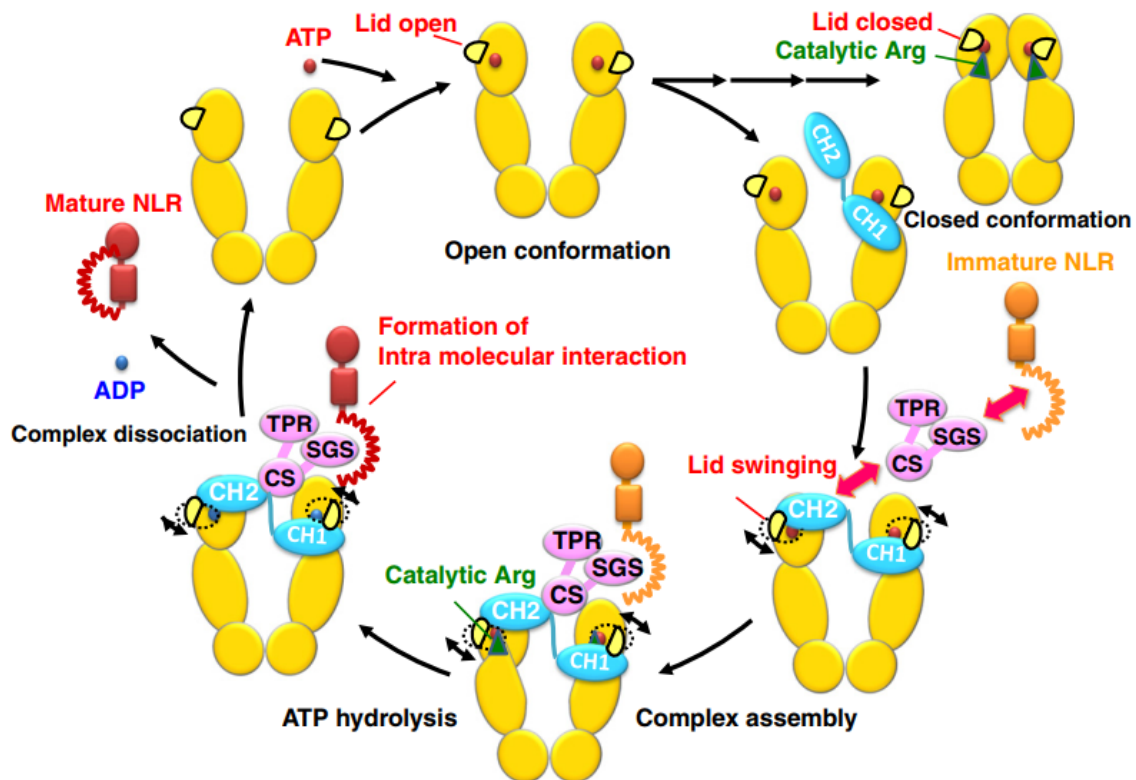
## 5.1. Maturace NLR proteinů

Na základě krystalografie proteinových domén, výzkumu reakční kinetiky a dalších nashromážděných poznatků o proteinech Hsp90, Sgt1 a Rar1 navrhli Kadota a Shirasu model sestavení komplexu, který maturuje NLR proteiny.

V otevřené konformaci se do Hsp90 dimeru naváží 2 molekuly ATP. Ve druhém kroku se naváže protein Rar1 svojí CHORD1 doménou na N-koncovou doménu jednoho z Hsp90 spojených v dimeru. Poté se již navázaný Rar1 naváže na N-koncovou doménu druhého Hsp90 svojí CHORD2 doménou a přidrží tak Hsp90 dimer v otevřené konformaci, což zabrání štěpení navázaného ATP. Sgt1 se naváže svou CS doménou na CHORD2 doménu Rar1 a dojde i k navázání NLR proteinu. Společná vazba Sgt1 a Rar1 opět umožní hydrolýzu ATP. S hydrolýzou ATP dochází i k maturaci NLR proteinu a poté k disociaci celého komplexu, nebo může komplex setrvat s navázaným ADP až do rozpoznání patogenu pomocí NLR receptoru. Pro upřesnění modelu zbývá dodat, že není stanoveno, zda dříve dojde k navázání samotného Rar1 k Hsp90 dimeru, nebo se Rar1 připojuje již navázaný s SGT1 (Kadota and Shirasu 2012).

Aktivita NLR proteinů je pravděpodobně závislá na interakci NB a LRR domény, kde neaktivní kompetentní stav nastává při kontaktu obou domén. Maturace NLR proteinu by mohla být analogická k maturaci steroidního receptoru u zvířat, kde dochází ke změně konformace uvnitř nukleotid vazebné domény (Kadota and Shirasu 2012).





Experimentálně bylo ovšem zjištěno, že komplex Hsp90-Sgt1-Rar1 obsahuje dvě molekuly Sgt1. Je tedy pravděpodobné, že provádí maturaci dvou NLR proteinů v jednom cyklu a je možné, že slouží i k oligomerizaci NLR proteinů (Siligardi, Zhang, and Prodromou 2018).

## 5.2. Role ve virové infekci

Viry využívají hostitelské buňky jako zdroj energie i materiálu pro vlastní replikaci. Agresivní produkce virových proteinů vyčerpává zdroje buňky a zasahuje i do kontroly proteinové kvality, které se Hsp90 také účastní.

Hsp90 se váže na 3' nepřekládanou oblast Bamboo mosaic virus (BaMV) RNA. Hsp90 se tak účastní replikázového komplexu viru. Místo obrany buňky tak slouží k rozšíření virové infekce, což viru zároveň pomáhá oslabit imunitní odpověď (Huang et al. 2012).

U viru žluté kadeřavosti listů rajčete (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) při infekci vznikají agregáty proteinů. Ty vznikají nejdříve v cytosolu, ale později jsou pozorována v jádře nakažené buňky. V agregátech se hromadí chaperony Hsp70 a Hsp90, u kterých bylo testováním *in vitro* zjištěna proteolytická aktivita, mohly by tedy sloužit jako obranný mechanismus k odstranění infekce. Ošetření inhibitorem Hsp90 průběh infekce zhoršilo, což by teorii potvrdilo (Gorovits and Czosnek 2017).

## 6. Transportní funkce

Krom dalších jmenovaných funkcí se Hsp90 se uplatňuje i v transportu preproteinů do chloroplastu a mitochondrie. Preproteiny jsou transportovány v nesbaleném stavu a před dokončením jejich transportu jsou z nich odstraňovány N-koncové sekvence aminokyselin, které signalizují cílové umístění proteinu.

Studiem rostlin *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že transport do chloroplastu vyžaduje funkční AtHsp90.5, izoformu Hsp90 lokalizovanou v chloroplastu. Při potlačení aktivity pomocí inhibitorů dochází k poškození tvorby tylakoidů a tvorby fotosystému II (Rütgers and Schroda 2013).

Receptor Translocon of the outer envelope of chloroplasts 64 (Toc64) na povrchu rostlinných chloroplastů obsahuje TPR doménu, kterou zachytává Hsp90, rozpoznává tak skupinu preproteinů a umožňuje přesun chaperonovaného preproteinu pomocí Translocon of the outer envelope of chloroplasts 34 (Toc34). Tímto způsobem se do chloroplastu transportuje pouze část proteinů, některé jsou zřejmě směřovány rovnou na Toc34. Přestože TPR domény mohou zachytávat protein Hsp70, v tomto případě se zdá být transport Hsp90 specifický (Qbadou et al. 2006).

Koprecipitací bylo zjištěno, že Hsp90.5 interaguje s Tic110, Toc75, Tic22 a stromálními Hsp93 a Hsp70. Navíc se Hsp90.5 vyskytuje s proteiny mitochondriálního transportu a je nutný pro přežití přinejmenším u modelové *Arabidopsis thaliana*. Bylo pozorováno, že import proteinu skrze membrány se při inhibici geldanamycinem zastaví, což ukazuje na závislost chloroplastového importu na Hsp90.5 (Inoue, Li, and Schnell 2013)

Transport preproteinu směřující do mitochondrie rostlinné buňky využívá mtOM64, homolog Toc64 který má u *Arabidopsis thaliana* sekvenční identitu 67%. Protein mtOm64 funkčně zastupuje receptor Tom70, který se u rostlin nevyskytuje (Chew et al. 2004)

## 7. Závěr

Tato práce poskytuje základní náhled do úlohy proteinu Hsp90 v rostlinných buňkách, který je v současné době aktivně zkoumán a mnoho jeho funkcí již bylo objeveno v živočišných buňkách.

Proteiny Hsp90 plní v rostlinné buňce široké spektrum funkcí, které jsou kritické při stresových situacích i mimo ně. V této bakalářské práci byly shrnuty poznatky o Hsp90 se zaměřením na poznatky specifické pro rostlinnou buňku. Konkrétně byla popsána jeho struktura, jeho homology u několika modelových organismů. Byla popsána jeho aktivita při teplotním šoku, dále byly uvedeny jeho funkce nezbytné ke správnému fungování imunitních reakcí. V závěru práce je uvedena i jeho funkce v signalizaci a úloha v proteinovém transportu.

Poznatky o rostlinně specifických funkcích rychle přibývají a současná znalost o roli v odpovědi na stresové podmínky, imunitě i transportu z Hsp90 činí zajímavý cíl dalšího zkoumání.

## 8. Použitá literatura

- Aviezer-Hagai, Keren et al. 2007. "Arabidopsis Immunophilins ROF1 (AtFKBP62) and ROF2 (AtFKBP65) Exhibit Tissue Specificity, Are Heat-Stress Induced, and Bind HSP90." *Plant Molecular Biology* 63(2): 237–55.
- Bissoli, Gaetano et al. 2012. "Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase ROF2 Modulates Intracellular PH Homeostasis in Arabidopsis." *Plant Journal* 70(4): 704–16.
- Chen, Shiyong, and David F. Smith. 1998. "Hop as an Adaptor in the Heat Shock Protein 70 (Hsp70) and Hsp90 Chaperone Machinery." *Journal of Biological Chemistry* 273(52): 35194–200.
- Chew, Orinda et al. 2004. "A Plant Outer Mitochondrial Membrane Protein with High Amino Acid Sequence Identity to a Chloroplast Protein Import Receptor." *FEBS Letters* 557(1–3): 109–14.
- Gorovits, Rena, and Henryk Czosnek. 2017. "The Involvement of Heat Shock Proteins in the Establishment of Tomato Yellow Leaf Curl Virus Infection." *Frontiers in Plant Science* 8(March): 1–12. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00355/full>.
- Hahn, Alexander, Daniela Bublak, Enrico Schleiff, and Klaus-Dieter Scharf. 2011. "Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 Chaperones and Heat Stress Transcription Factors in Tomato." *The Plant Cell* 23(2): 741–55. <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.110.076018>.
- Huang, Ying Wen et al. 2012. "Hsp90 Interacts Specifically with Viral RNA and Differentially Regulates Replication Initiation of Bamboo Mosaic Virus and Associated Satellite RNA." *PLoS Pathogens* 8(5).
- Inoue, H., M. Li, and D. J. Schnell. 2013. "An Essential Role for Chloroplast Heat Shock Protein 90 (Hsp90C) in Protein Import into Chloroplasts." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(8): 3173–78. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1219229110>.
- Johnson, B. D. et al. 2000. "Hsp90 Chaperone Activity Requires the Full-Length Protein and Interaction among Its Multiple Domains." *Journal of Biological Chemistry* 275(42): 32499–507.
- Jones, Jonathan D G, and Jeffery L. Dangl. 2006. "The Plant Immune System." *Nature*

444(7117): 323–29.

- Kadota, Yasuhiro, and Ken Shirasu. 2012. “The HSP90 Complex of Plants.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1823(3): 689–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.016>.
- Karagöz, G. Elif et al. 2014. “Hsp90-Tau Complex Reveals Molecular Basis for Specificity in Chaperone Action.” *Cell* 156(5): 963–74.
- El Kasmi, Farid, and Marc T. Nishimura. 2016. “Structural Insights into Plant NLR Immune Receptor Function.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(45): 12619–21. <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1615933113>.
- Lachowiec, Jennifer et al. 2013. “The Protein Chaperone HSP90 Can Facilitate the Divergence of Gene Duplicates.” *Genetics* 193(4): 1269–77.
- Leuenberger, Pascal et al. 2017. “Cell-Wide Analysis of Protein Thermal Unfolding Reveals Determinants of Thermostability.” *Science* 355(6327).
- Meyer, Philippe et al. 2003. “Structural and Functional Analysis of the Middle Segment of Hsp90: Implications for ATP Hydrolysis and Client Protein and Cochaperone Interactions.” *Molecular Cell* 11(3): 647–58.
- Ohama, Naohiko et al. 2015. “The Transcriptional Cascade in the Heat Stress Response of <i>Arabidopsis</i> Is Strictly Regulated at the Expression Levels of Transcription Factors.” *The Plant Cell* 28(January): TPC2015–00435–RA. <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.15.00435>.
- Prodromou, Chrisostomos et al. 1997. “Identification and Structural Characterization of the ATP/ADP-Binding Site in the Hsp90 Molecular Chaperone.” *Cell* 90(1): 65–75.
- Qbadou, Soumya et al. 2006. “The Molecular Chaperone Hsp90 Delivers Precursor Proteins to the Chloroplast Import Receptor Toc64.” *EMBO Journal* 25(9): 1836–47.
- Rütgers, Mark, and Michael Schroda. 2013. “A Role of VIPP1 as a Dynamic Structure within Thylakoid Centers as Sites of Photosystem Biogenesis?” *Plant Signaling and Behavior* 8(11): 1–5.
- Samakovli, Despina et al. 2014. “Brassinosteroid Nuclear Signaling Recruits HSP90 Activity.” *New Phytologist* 203(3): 743–57.

- Schöffl, Fritz, Ralf Prandl, and Andreas Reindl. 1998. "Update on Signal Transduction Regulation of the Heat-Shock Response." *Plant physiology* 117(4): 1135–41.
- Sidera, Katerina, and Evangelia Patsavouidi. 2014. "HSP90 Inhibitors: Current Development and Potential in Cancer Therapy." *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 9: 1–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23312026>.
- Siligardi, Giuliano, Minghao Zhang, and Chrisostomos Prodromou. 2018. "The Stoichiometric Interaction of the Hsp90-Sgt1-Rar1 Complex by CD and SRCD Spectroscopy." *Frontiers in Molecular Biosciences* 4(January): 1–13. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2017.00095/full>.
- da Silva, Viviane C.H. et al. 2013. "Conformational and Functional Studies of a Cytosolic 90kDa Heat Shock Protein Hsp90 from Sugarcane." *Plant Physiology and Biochemistry* 68: 16–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.015>.
- Southworth, Daniel R., and David A. Agard. 2008. "Species-Dependent Ensembles of Conserved Conformational States Define the Hsp90 Chaperone ATPase Cycle." *Molecular Cell* 32(5): 631–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.024>.
- Stebbins, Charles E. et al. 1997. "Crystal Structure of an Hsp90-Geldanamycin Complex: Targeting of a Protein Chaperone by an Antitumor Agent." *Cell* 89(2): 239–50.
- Wang, Renhou et al. 2016. "HSP90 Regulates Temperature-Dependent Seedling Growth in Arabidopsis by Stabilizing the Auxin Co-Receptor F-Box Protein TIR1." *Nature Communications* 7: 1–10. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10269>.
- Yoshida, Takumi et al. 2011. "Arabidopsis HsfA1 Transcription Factors Function as the Main Positive Regulators in Heat Shock-Responsive Gene Expression." *Molecular Genetics and Genomics* 286(5–6): 321–32.
- Zhang, Jin et al. 2013. "Genome-Wide Analysis of the Populus Hsp90 Gene Family Reveals Differential Expression Patterns, Localization, and Heat Stress Responses." *BMC Genomics* 14(1): 1. BMC Genomics.