

ANTIFUNGÁLNÍ PROTEINY ROSTLIN – KLASIFIKACE, CHARAKTERISTIKA, MOŽNOSTI VYUŽITÍ

VERONIKA HEŘMANOVÁ^{a,b}, JAN BÁRTA^a
a VLADISLAV ČURNÝ^b

^aKatedra rostlinné výroby, ^bBiotechnologické centrum,
Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Studentská 13, 370 05 České Budějovice
vhermanova@centrum.cz

Došlo 26.5.05, přijato 30.6.05.

Klíčová slova: antifungální proteiny, stresové proteiny rostlin, rostlinné β -glukanasy, rostlinné chitinasy

Obsah

1. Úvod
2. Reakce rostliny na infekční agens
3. Klasifikace antifungálních proteinů
 - 3.1. Proteiny PR-1
 - 3.2. Proteiny PR-2 (β -glukanasy)
 - 3.3. Proteiny PR-3 (chitinasy)
 - 3.4. Proteiny PR-4 (proteiny vázající se na chitin)
 - 3.5. Proteiny PR-5 (proteiny podobné thaumatinu)
 - 3.6. Defensiny, thioniny
 - 3.7. Proteiny podobné cyklofilinu
 - 3.8. Proteiny inaktivující ribosomy
 - 3.9. Proteiny přenosu lipidů
 - 3.10. Inhibitory proteas
 - 3.11. Ostatní
4. Možnosti využití antifungálních proteinů
5. Závěr

1. Úvod

Antifungální proteiny jsou specifické stresové obranné proteiny, které mají schopnost omezovat až inhibovat růst hub. U vyšších organismů jsou tyto proteiny přirozenou součástí sekundárního obranného systému – vrozené imunity. Výskyt těchto proteinů není ovšem omezen pouze na vyšší organismy, ale obdobné proteiny byly nalezeny i u hmyzu, rostlin a mikroorganismů^{1,2}.

Studium antifungálních proteinů nabývá v posledních letech na významu. Vzhledem k tomu, že tyto proteiny jsou součástí přirozených obranných systémů člověka, ale i živočichů a rostlin, existuje možnost jejich využití proti houbovým patogenům. Zájem o antifungální proteiny pro-

jevily jak obory humánní a veterinární medicíny, tak i obory zemědělské či potravinářské¹.

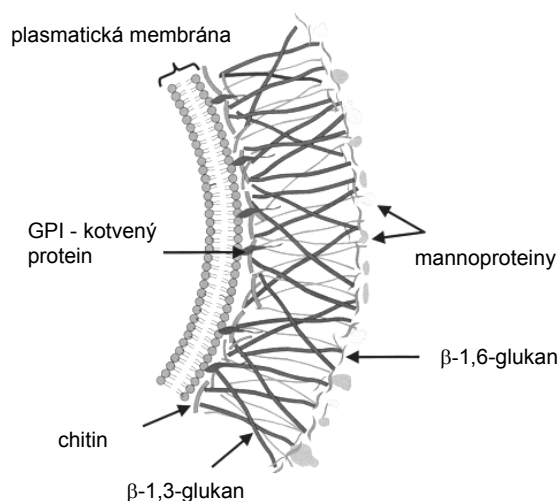
2. Reakce rostliny na patogenní organismy

Mezi rostlinami a fytopatogeny se vytvořily v průběhu koevoluce velmi spletité vzájemné vztahy. U patogenů se vyvinuly systémy, pomocí kterých napadají rostliny; rostliny získaly schopnost se účinně bránit infekčním agens. Průnik patogenů do buněk je ztížen řadou mechanických bariér (krycí pletiva, vosky, kutikula, buněčná stěna), avšak ani tyto struktury nejsou pro specializované patogeny nepřekonatelnou překážkou³. Z pohledu metabolismu a genové exprese dochází při kontaktu buňky s patogenem k řadě změn, jejichž cílem je omezit působení infekčního organismu v rostlině. Látka spouštějící tuto obrannou reakci na buněčné úrovni je tzv. elicitor^{3,4}, kterým bývá specifický metabolit identifikovatelný receptorem hostitelské rostliny. Většina obranných reakcí rostlin je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu. Přenos od aktivovaných receptorů k DNA je možný více systémy. Jedná se především o fosfoinositidový systém, při kterém jsou hydrolyzou lipidů plasmatické membrány rostlinné buňky generovány dvě signální sloučeniny (inositol-1,4,5-trisfosfát a diacylglycerol), které za účasti iontů vápníku aktivují proteinkiny a posléze i expresi genů⁴. Následná obranná reakce zahrnuje tvorbu nekrotů (hypersenzitivní reakce), syntézu sloučenin s antibiotickým účinkem (fytoncidů) a syntézu specifických stresových proteinů^{2,5}. Hypersenzitivní reakce patří mezi neúčinnější obranné mechanismy⁶. V napadené buňce během krátké doby naroste koncentrace vysoce reaktivních volných radikálů a peroxidu vodíku, což vede k rychlé zkáze napadené buňky⁴. Hypersenzitivní reakce je pro okolní buňky často spouštěcím mechanismem pro syntézu fytoncidů a stresových proteinů PR (zkratka pochází z anglického označení „pathogenesis-related proteins“), nebo-li proteinů souvisejících s patogenezí^{6,7}. Mezi fytoicidy se řadí nejrůznější flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy^{3,4}. Proteiny PR jsou definovány jako stresové proteiny, jejichž syntéza je indukovaná přítomností specifického infekčního organismu^{2,4,6,8}. PR proteiny tvoří velmi početnou a různorodou skupinu. V současnosti jsou rostlinné proteiny PR klasifikovány do 14 skupin⁶.

3. Klasifikace antifungálních proteinů rostlin

Antifungální proteiny tvoří rozsáhlou a různorodou skupinu. Do současnosti bylo izolováno několik set těchto

proteinů a lze říci, že nové jsou objevovány téměř denně². Velký počet antifungálních proteinů, jejich různorodost i fakt, že jsou stále objevovány nové, ztěžuje jejich klasifikaci. Antifungální proteiny mohou být klasifikovány na základě struktury, enzymových vlastností, podobnosti s dříve popsanou skupinou proteinů, molekulové hmotnosti, sérologických vlastností^{2,6} nebo mechanismu účinku¹. Přehlednou klasifikaci antifungálních proteinů uvádějí ve své práci Selitrennikoff (2001), nebo Theis a Stahl (2004). Většina autorů^{1–3} se shoduje na rozdělení nejvýznamnějších antifungálních proteinů rostlin do pěti skupin. Toto členění odpovídá pěti základním třídám proteinů PR (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5), u nichž byla prokázána antifungální aktivita. Každá z těchto pěti skupin je dělena na základě odlišného isoelektrického bodu na další dvě podtřídy. Kyselé antifungální proteiny se nacházejí v extracelulárním prostoru, zatímco bazické proteiny jsou přítomny v buněčných vakuolách⁶. Obdobné antifungální proteiny byly izolovány i z jiných než rostlinných zdrojů. Takové proteiny se označují jako proteiny podobné rostlinným PR proteinům, nebo-li PR-1/5-like proteiny¹. K základním pěti skupinám rostlinných antifungálních proteinů jsou dnes řazeny další skupiny – defensiny, thioniny, proteiny podobné cyklophilinu (angl. „cyclophilin-like proteins“, CLPs), proteiny inaktivující ribosomy (angl. „ribosome-inactivating proteins“, RIPs), proteiny přenosu lipidů (angl. „lipid-transfer proteins“, LTPs) a inhibitory proteas^{1,2,6}. Z doposud známých skupin antifungálních proteinů byl mechanismus účinku zcela popsán pouze u skupiny PR-2 a PR-3 proteinů², které narušují základní stavební strukturu buněčné stěny hub (viz obr 1). PR-2 proteiny (β -glukanasy) hydrolyzují strukturu β -glukanů, PR-3 (chitinasy) narušují chitinové polymery buněčné stěny.



Obr. 1. Schéma stavby buněčné stěny hub (GPI – glykofosfatidylinositol); převzato a upraveno z lit.²

3.1. Proteiny PR-1

Proteiny PR-1 vykazují podobnost vůči skupině proteinů bohatých na cystein. Jedná se o významnou skupinu PR proteinů, které se často využívají jako markery pro studium indukované rezistence rostlin⁶. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 15–17 kDa (cit.²). Proteiny PR-1 byly poprvé izolovány z tabáku (*Nicotiana tabacum* L.)⁹, později byly nalezeny u mnoha dalších rostlin (např. *Oryza sativa* L., *Triticum aestivum* L., *Arabidopsis thaliana* L.)^{6,10,11}. Antifungální aktivita byla u těchto proteinů prokázána proti řadě houbových patogenů – *Uromyces fabae*, *Phytophthora infestans*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora parasitica* a *Peronospora tabaci*¹¹. Stabilitní struktura většiny proteinů PR-1, odolná proteasové degradaci, je zajištěna přítomností šesti cysteinových zbytků, které zajišťují tvorbu sulfidických můstků⁶. Mechanismus účinku proteinů PR-1 není znám. Předpokládá se, že mechanismus antifungální aktivity rostlinných proteinů PR-1 je obdobný jako v případě proteinu označovaného helothermin². Helothermin je živočišný antifungální protein (PR-1-like protein), který u cílových buněk interaguje s proteiny membránových kanálků a inhibuje tak propouštění vápenatých iontů, následkem čehož dochází k lyzi buněk¹².

3.2. Proteiny PR-2 (β -glukanasy)

Společným znakem proteinů této skupiny je β -1,3-endoglukanasová aktivita. Vzhledem k enzymové aktivitě PR-2, spočívá jejich mechanismus účinku v hydrolyze struktury β -1,3-glukanů přítomných v buněčných stěnách hub. Postupné oslabování buněčných stěn vede následně k lyzi buněk. V primární struktuře β -glukanas je vždy přítomná oblast dvou reziduí kyseliny glutamové. Tato oblast je považována za aktivní místo, umožňující navázání na strukturu β -glukanu a štěpení β -glykosidických vazeb¹. Na základě analýzy aminokyselinové sekvence jsou PR-2 proteiny děleny do tří skupin^{2,13,14}. První skupina představuje bazické, intracelulární proteiny s velikostí přibližně 33 kDa, druhá a třetí skupina zahrnuje kyselé extracelulární proteiny o velikosti 36 kDa. Bazické PR-2 proteiny jsou produkovány ve formě prekurzorů, jejichž enzymová aktivita je dána posttranslačními úpravami¹⁵. Bazické isoformy vykazují 50 až 250 krát vyšší aktivitu než kyselé isoformy PR-2 proteinů¹⁶. Antifungální aktivita byla zjištěna již na mikromolární úrovni ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) proti celé řadě organismů – např. *Rhizoctonia solani*, *Candida albicans* nebo *Aspergillus fumigatus*². Proteiny PR-2 byly nalezeny u řady rostlin^{15–18}. Exprese proteinů PR-2 je u rostlin tabáku indukována jak přítomností viru mozaiky tabáku¹⁶, tak i na základě infekce inkompatibilními rasami patogenních druhů *Pseudomonas tabaci* nebo *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*¹⁹. U rostlin bramboru (*Solanum tuberosum* L.) byla zjištěna β -1,3-glukanasová aktivita u zásobního proteinu hlíz, patatinu¹⁵. Následně byla dokázána antifungální aktivita tohoto proteinu vůči patogenu *Phytophthora infestans*¹³.

3.3. Proteiny PR-3 (chitinasy)

Jedná se o skupinu proteinů PR, které vykazují endochitinasovou aktivitu. Tato aktivita je u bazických chitinas pětikrát vyšší než u kyselých¹⁶. Hmotnost většiny proteinů PR-3 se pohybuje v rozmezí 26–43 kDa. Rostlinné chitinasy jsou na základě struktury děleny do čtyř skupin¹. Chitinasy I třídy obsahují *N*-terminální doménu bohatou na cystein, která se skládá ze 40 aminokyselin (aglutininová doména obilného klíčku), a heveinu podobnou doménu (tzv. „hevein-like“ doménu), která má schopnost vazby na chitin. Proteiny PR-3 třídy II jsou podobné chitinasam první skupiny, ale postrádají *N*-terminální doménu a jejich hmotnost je 27–28 kDa. Třída III nevykazuje podobnost vůči žádné ze skupin chitinas. Velikost je 28–30 kDa. Třída IV je podobná proteinům první třídy, ale proteiny jsou z důvodu čtyřnásobné delece prokazatelně menší^{1,2}. Proteiny PR-3 byly izolovány z celé řady rostlin – tabáku, okurky, fazolu, hrachu, obilovin, ale i z mnoha dalších^{20–22}. Antifungální aktivitu vykazují proti řadě houbových organismů – *Alternaria solani*, *A. radicina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, *Botrytis cinerea*^{21,23,24}. Mechanismus účinku proteinů PR-3 je dán jejich enzymovou aktivitou. Jedná se o endochitinasy, které narušují chitin přítomný v buněčné stěně hub²⁵. Antifungální aktivita rostlinných endochitinas je *in vitro* synergisticky zvyšována přítomností proteinů PR-2 (cit.²⁶).

3.4. Proteiny PR-4 (proteiny vázající se na chitin)

Jedná se o významnou skupinu proteinů PR majících schopnost vazby na chitin buněčných stěn hub. Molekulová hmotnost je od 3,1 do 20 kDa (cit.¹). Pro kyselé proteiny PR-4 je nejčastěji uváděno 13–14,5 kDa (cit.^{2,3}). Proteiny PR-4 vykazují vysokou odolnost vůči extrémnímu pH a degradaci proteasami²⁷. Skupina proteinů PR-4 je na základě struktury klasifikována do dvou tříd¹. Proteiny PR-4 třídy I mají *N*-terminální doménu vázající se na chitin, která je podobná doméně přítomné u heveinu²⁸. Z tohoto důvodu se tato třída řadí do nadtřídy lektinů vázajících se na chitin. Do této skupiny patří např. proteiny Win 1 a Win 2, které byly izolovány z brambor (*Solanum tuberosum* L.)²⁹. Proteiny PR-4 třídy II na chitin se vázající doménu neobsahují. PR-4 proteiny byly opět izolovány z celé řady rostlin^{14,30,32}. Spektrum houbových organismů, vůči kterým vykazují antifungální aktivitu, je velmi široké – např. *Trichoderma harzianum*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *Botrytis cinerea*². Mechanismus účinku proteinů PR-4 není zcela objasněn. Proteiny PR-4 třídy I mají schopnost vázat se na β -chitin vznikající buněčné stěny²⁷, a tím narušovat polaritu a růst buněk¹⁴. Mechanismus účinku proteinů PR-4 třídy II, které postrádají vazebnou doménu, je nejasný².

3.5. Proteiny PR-5 (proteiny podobné thaumatinu)

Tyto antifungální proteiny o velikosti 24–25 kDa (cit.^{2,3,33}) vykazují vysokou podobnost primární struktury s thaumatinem (angl. „thaumatin-like protein“, TLPs). Thaumatin je sladce chutnající protein izolovaný z jihoafrické rostliny *Thaumatococcus danielli* Benth². Proteiny PR-5 byly nalezeny u celé řady rostlin – např. *Hordeum vulgare* L.³⁴, *Zea mays* L.³⁵, *Nicotiana tabacum* L.³⁶, ale i mnoha dalších. Přítomnost 16 cysteinových zbytků, které tvoří 8 disulfidických můstků, poskytuje proteinům PR-5 vysokou stabilitu vůči změnám teploty, pH a degradaci proteasami⁸. Struktura byla doposud determinována pouze u thaumatinu (*T. danielli*)³⁷, zeamatinu (*Zea mays*)³⁵ a PR-5d proteinu (*N. tabacum*)³⁶. Mechanismus účinku těchto antifungálních proteinů není doposud znám. Různá pozorování více či méně objasňují působení proteinů PR-5. Některé proteiny PR-5 způsobují změny v permeabilitě buněčných membrán – zeamatin způsobuje rychlou lyzi buněk houby *Neurospora crassa*, a to i při 4° C (cit.³⁸). U ostatních proteinů PR-5 byla zjištěna β -1,3-glukanasová aktivita a schopnost vázat se na β -glukan buněčných stěn³⁴. Osmotin (zdroj *N. tabacum*) způsobuje chaos při stavbě buněčné stěny hub³⁹. Proteiny PR-5 jsou účinné proti širokému spektru houbových patogenů. Nejznámějším proteinem PR-5 je zeamatin, o jehož využití se vážně uvažuje i v lékařství, a to z důvodu jeho účinnosti proti kvasinkám *Candida albicans* a *C. vaginitis*⁴⁰.

3.6. Defensiny a thioniny

Defensiny a thioniny jsou variabilní skupina malých (5 kDa; 45–54 aminokyselinových zbytků), proteinů bohatých na cystein^{2,3}. Antimikrobiální aktivita rostlinných thioninů je známa již od začátku 40. let, kdy byly získány pšeničné thioniny⁴¹. Rostlinné defensiny byly poprvé získány z pšenice (*Triticum aestivum* L.). Vzhledem k strukturální podobnosti s thioniny byly zpočátku defensiny označeny jako γ -thioniny a staly se podskupinou thioninů⁴². Později byla skupina γ -thioninů přejmenována na rostlinné defensiny⁴³. Rostlinné thioniny a defensiny byly do současnosti izolovány z mnoha rostlin^{3,44,45}. Inhibiční aktivita byla prokázána proti řadě houbových patogenů – *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicola*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Candida albicans*². Stabilní strukturu těmto proteinům poskytuje přítomnost sulfidických můstků. Nejčastěji se jedná o čtyři až pět sulfidických můstků^{43,45}. Thioniny jsou syntetizovány ve formě větších prekurzorů (15 kDa), které jsou uvnitř vlastních buněk neaktivní. Odštěpením terminální sekvence se stávají toxickými³. Mechanismus účinku této skupiny proteinů není zcela znám. Při ošetření houby *N. crassa* defensiny Rs-AFP2 (*Raphanus sativus* L.) a DM-AMP1 (*Dahlia merckii* L.) byla zjištěna schopnost vazby na specifické

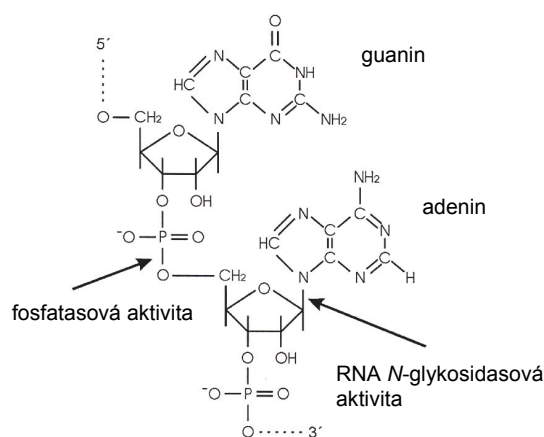
membránové receptory, následkem čehož docházelo k ztrátě iontů K^+ a lyzi buněk⁴⁴.

3.7. Proteiny podobné cyklofilinu

Tyto rostlinné antifungální proteiny (nejčastěji 18 kDa)^{46,47} jsou strukturálně podobné cyklofilinům (angl. „cyclophilin-like proteins“, CLPs), tedy proteinům, které představují intracelulární receptory pro cyklosporin^{2,48}. Poprvé byly tyto proteiny z rostlin izolovány v roce 1990, kdy byla nalezena cDNA těchto proteinů v rostlinách *Lycopersicon esculentum* Mill., *Zea mays* L., a *Brassica napus* L.⁴⁸. Zástupcem této skupiny jsou proteiny mungin (*Phaseolus mungo* L.) a CLAP (*Cicer arietinum* L.)⁴⁷. Proteiny CL jsou aktivní proti řadě houbových patogenů – *R. solani*, *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *Coprinus comatus*. Mechanismus účinku těchto proteinů nebyl dostatečně objasněn, mungin *in vitro* inhibuje α -amylasu a vykazuje β -glukosidasovou aktivitu⁴⁶.

3.8. Proteiny inaktivující ribosomy

Proteiny inaktivující ribosomy (angl. „ribosome-inactivating proteins“, RIPs) jsou *N*-glykosidasy, které odbourávají purin z rRNA, což způsobuje rozpad ribosomů a zastavení syntézy proteinů (viz. obr. 2)^{1,2}. Jedná se o skupinu proteinů, které se nacházejí v podstatě u všech organismů. Rostlinné RIPs byly nalezeny např. u druhů *Mirabilis expansa* Ruiz & Pavon⁴⁹, *Pisum sativum* L.⁵⁰, *Zea mays* L., *Ricinus communis* L.⁵¹. Proteiny inaktivující ribosomy jsou rozděleny do tří skupin. Třída I zahrnuje jednořetězové *N*-glykosidasy s hmotností 11–30 kDa. Proteiny třídy II obsahují dva řetězce, a to lektin (B řetězec), který se váže na buňky a *N*-glykosidasu (A řetězec). Mole-



Obr. 2. Působení proteinů inaktivujících ribosomy; proteiny inaktivující ribosomy vykazují fosfatasovou aktivitu narušující fosfodiesterové vazby a RNA *N*-glykosidasovou aktivitu, která deadenyluje rRNA. Převzato a upraveno z lit.¹

kulová hmotnost je přibližně 60 kDa (cit.^{1,2}). Do této třídy patří např. ricin, ebulin a nigrin. Proteiny třídy III jsou složeny ze čtyř řetězců, které jsou organizovány jako dva dimery shodné s typem třídy II. Antifungální aktivita byla doposud popsána pouze u malého počtu zástupců proteinů RI (cit.²). Řetězec B (lektin) se váže na buňky hub a vytváří v buněčné stěně kanálky, pomocí kterých *N*-glykosidasový řetězec A proniká do buněk, kde poškozuje ribosomy⁵². Není známo, jakým způsobem do buněk pronikají proteiny třídy I, které neobsahují řetězec B (cit.²). Kromě antifungálního účinku vykazují tyto proteiny i silnou toxicitu vůči živočišným buňkám⁵².

3.9. Proteiny přenosu lipidů

Proteiny této skupiny (8–9 kDa) zajišťují přenos fosfolipidů mezi membránami (angl. „lipid-transfer proteins“, LTPs)⁵³. Struktura těchto proteinů je zcela specifická. Jsou stabilizovány čtyřmi disulfidickými můstky a vytvářejí centrální dutinu v podobě jakéhosi tunelu. Tyto proteiny jsou aktivní vůči řadě bakterií a hub, ale mechanismus účinku není znám⁵¹. Existují hypotézy, které tvrdí, že tyto proteiny mají schopnost začlenit se do buněčné membrány hub tak, že centrální hydrofóbní dutina vytvoří póry, které umožní odliv intracelulárních iontů a v konečném důsledku způsobí smrt buňky. Jaký je vztah mezi tímto účinkem a funkcí přenosu lipidů není jasné².

3.10. Inhibitory proteas

Inhibitory proteas patří k nejčastěji se vyskytujícím antifungálním proteinům rostlin¹. Cysteinové inhibitory proteas byly izolovány z velkého počtu rostlin^{2,54,55} a vytvářejí čtvrtou skupinu cystatinů, tzv. fyto-cystatiny. Fyto-cystatiny jsou jednoduché polypeptidy o velikosti 10 až 12 kDa (cit.²), které vykazují antifungální aktivitu vůči řadě zástupců fytopatogenních hub – *Claviceps*, *Helminthosporium*, *Curvularia*, *Alternaria* a *Fusarium*⁵⁶. Princip antifungální aktivity inhibitorů proteas není znám². Z hlediska ochrany rostlin je významná i schopnost těchto proteinů inhibovat trávicí enzymy hmyzích škůdců – především trypsin a α -amylasu. U inhibitorů proteas byla popsána bifunkčnost – inhibice trávicích enzymů i antifungální aktivita. Nejpodrobněji byla antifungální aktivita bifunkčních proteinů popsána u proteinu zeamatinu (*Z. mays* L.)³⁸. Inhibitory proteas, izolované např. z ječmene nebo pšenice, nebyly z hlediska antifungální aktivity studovány.

3.11. Ostatní

Existuje celá řada rostlinných antifungálních proteinů, které nelze zařadit do žádné z výše uvedených skupin. Snakin-1 byl izolován z brambor (*Solanum tuberosum* L.), má velikost 6,9 kDa a je účinný již při koncentraci 10 μ M (cit.⁵⁷). Antifungální účinky vykazuje i 30 kDa velký glykoprotein izolovaný z rostliny *Engelmannia pinnatifida*

Nutt.⁵⁸ Ani u jednoho z těchto proteinů není znám mechanismus účinku.

4. Možnosti využití antifungálních proteinů

Možností využít antifungální proteiny jako zajímavou alternativu chemických fungicidních látek se zabývá mnoho oborů. Podle údajů¹ z roku 2004 bylo v osmi evropských zemích povoleno používání nisinu ke konzervaci potravin. Nisin je antimikrobiální protein produkovaný kmeny bakterie *Lactococcus lactis*⁵⁹. Další oblast využití antifungálních proteinů je farmacie. Ve fázi klinických testů se v současnosti nachází živočišný antifungální protein heliomycin izolovaný z organismu *Heliothis virescens*⁶⁰ a uvažuje se o využití kukuřičného proteinu zeamatinu při léčbě kandidózy způsobené kvasinkou *Candida albicans*^{33,40}. U skupiny proteinů inaktivující ribosomy (RIPs) byla zjištěna rozdílná toxicita vůči nádorovým a normálním buňkám člověka. Existuje teoretická možnost využití těchto proteinů jako selektivních protinádorových léků a imunotoxinů^{61,52}.

Vzhledem k tomu, že rostliny vytvářejí antifungální proteiny jako vlastní obranný systém, nabízí se využití těchto proteinů při ochraně zemědělských plodin. Detekce změn v přítomnosti a množství specifických PR proteinů (zejména PR-1 proteinů, β -glukanas, chitinas) se využívá při studiu indukované rezistence rostlin – proteiny PR se v tomto případě označují jako tzv. ISR („induced systemic resistance“) markery⁵. Možností zvýšit rezistenci rostlin expresí genů antifungálních proteinů v transgenních rostlinách se zabývá mnoho prací. Zvýšené rezistenci bylo dosaženo např. u rostlin tabáku vůči patogenu *Alternaria alternata* po vnesení *tlp* genů rýže⁶², vůči padlí (*Sphaerotheca panosa*) u rostlin růží po vnesení genu *Ace-AMP1* (syntéza proteinů podobných thaumatinu)⁶³, nebo u transgenních linií pšenice vůči fytopatogenní houbě *Fusarium graminearum* po vnesení genů kódujících chitinasy, β -glukanasy a TL proteiny⁶⁴. Zvyšování rezistence rostlin vůči rostlinným patogenům s využitím specifických rostlinných proteinů je v současnosti nejvýznamnější oblastí využití antifungálních proteinů.

5. Závěr

Antifungální proteiny rostlin jsou v současné době řazeny do 11 tříd. Tyto specifické proteiny jsou významnou součástí obranného systému všech rostlin. Antifungální vlastnosti těchto proteinů mohou být v budoucnosti významným nástrojem v boji proti patogenním organismům v mnoha oborech. Přestože jsou nové rostlinné antifungální proteiny objevovány téměř denně, víme o těchto výjimečných proteinech velmi málo. Budoucí využití antifungálních proteinů je podmíněno znalostí jejich specifických vlastností. Jedná se především o významné vlastnosti jako jsou selektivita, synergismus, imunologické vlastnos-

ti, možné křížové reakce s receptory hostitele (člověka), nebo vznik rezistence u cílového patogenu. U většiny antifungálních proteinů je také nutné doplnit chybějící informace o mechanismu účinku jejich působení.

Referát vznikl v rámci řešení projektu GA ČR č. 521/03/P036. Autoři děkují za finanční podporu.

LITERATURA

1. Theis T., Stahl U.: Cell. Mol. Life Sci. 6, 437 (2004).
2. Selitrennikoff C. P.: Appl. Environ. Microbiol. 67, 2883 (2001).
3. Terras F. R.: Dissertation. K. U. Leuven, Belgium 1994.
4. Gloser J., Prášil I. v knize: Fyziologie stresu (Procházka S., ed.) kap. 15. Academia, Praha 1998.
5. Heil M., Bostock R. M.: Ann. Bot. 89, 503 (2002).
6. van Loon L. C., van Strien E. A.: Physiol. Mol. Plant Pathol. 55, 85 (1999).
7. Kombrink E., Schmelzer E.: Eur. J. Plant Pathol. 107, 69 (2001).
8. Breiteneder H.: Allergy 59, 479 (2004).
9. van Loon L. C., Kammen A.: Virology 40, 1 (1970).
10. Agrawal G. K., Jwa N. S., Rakwal R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 274, 157 (2000).
11. Niederman T., Genetet I., Bruyere T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B., Mosinger E.: Plant Physiol. 108, 17 (1995).
12. Morrisette J., Kratzschmar J., Haendler B., El-Hayek R., Mochca-Morales J., Martin B. M., Patel J. R., Moss R. L., Schleuning W. D., Coronado R., Possani L. D.: Biophys. J. 68, 2280 (1995).
13. Tonon C., Guevara C., Daleo G., Oliva C.: J. Phytopathology 150, 189 (2002).
14. Nielsen K. K., Nielsen J. E., Madrid S. M., Mikkelsen J. D.: Plant Physiol. 113, 83 (1997).
15. Tonon C., Daleo G., Oliva C.: Plant Physiol. Bioch. 39, 849 (2001).
16. Linthorst H. J. M.: Crit. Rev. Plant Sci. 10, 123 (1991).
17. Zemanek A. B., Ko T-S., Thimmapuram J., Hamerschlag F. A., Korban S. S.: J. Plant Physiol. 8, 887 (2002).
18. Kim, Y. J., Hwang B. K.: Physiol. Mol. Plant Pathol. 50, 103 (1997).
19. Meins F. Jr., Ahl P.: Plant Sci. 61, 155 (1989).
20. Graham L. S., Sticklen M. B.: Can. J. Bot. 72, 1057 (1994).
21. Zavareh A. H., Tehrani A. S., Mohammadi M.: Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 69, 555 (2004).
22. Lee S. C., Hwang B. K.: Planta, v tisku (2005).
23. Taira T., Yamagami T., Aso Y., Ishiguro M., Ishihara M. 2001: Biosci. Biotechnol. Biochem. 65, 2710 (2001).
24. Kong L., Anderson J. M., Ohm H. W.: Genome 48, 29 (2005).

25. Sela-Burlage M. B., Ponstein A. S., Vlomans S. A., Melchers L. S., van den Elzen P. J. M., Cornelissen B. J. C.: *Plant Physiol.* 88, 936 (1993).
26. Jach G., Gornhardt B., Mundy J., Logemann J., Pinsdorf E., Leah R., Schell J., Maas C.: *Plant J.* 8, 97 (1995).
27. Bormann C., Baier D., Horr I., Raps C., Berger J., Jung G., Schwartz H.: *J. Bacteriol.* 181, 7421 (1999).
28. van Damme E. J., Charels D., Roy S., Tierens K., Barre A., Martins J. C., Rouge P., van Leuven F., Does M., Peumans W. J.: *Plant Physiol.* 119, 1547 (1999).
29. Friedrich L., Moyer M., Ward E., Ryals J.: *Mol. Gen. Genet.* 230, 113 (1991).
30. Caporale C., Facchiano A., Bertini L., Leonardi L., Chilosi G., Buonocore V., Caruso C.: *J. Mol. Model.* 9, 9 (2003).
31. Nielsen K. K., Nielsen J. E., Madrid S. M., J. D. Mikkelsen S. M.: *Plant Physiol.* 113, 83 (1997).
32. Koo J. C., Lee S. Y., Chun H. J., Cheong Y. H., Choi J. S., Kawabata S. I.: *Biochim. Biophys. Acta* 1382, 80 (1998).
33. Gavrović-Jankulović M., Ćirković T., Vučković O., Atanasković-Marković M., Petersen A., Golgić G.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 805 (2002).
34. Osmond R. I. W., Hrmova M., Fontaine F., Imberty A., Fincher G. B.: *Eur. J. Biochem.* 268, 4190 (2001).
35. Batalia M. A., Monzingo A. F., Ernst S., Roberts W., Robertus J. D.: *Nat. Struct. Biol.* 3, 19 (1996).
36. Koiwa H., Kato H., Nakatsu T., Oda J., Yamada Y., Sato F.: *J. Mol. Biol.* 286, 1137 (1999).
37. Ogata C. M., Gordon P. F., De Vos A. M., Kim S. H.: *J. Mol. Biol.* 228, 893 (1992).
38. Roberts W. K., Selitrennikoff C. P.: *J. Gen. Microbiol.* 136, 1771 (1990).
39. Yun D. J., Ibeas J. I., Lee H., Coca M. A., Narasimhan M. L., Uesono Y., Hasegawa P. M., Pardo J. M., Bressan R. A.: *Mol. Cell* 1, 807 (1998).
40. Stevens D. A., Calderon L., Martinez M., Clemons K. V., Wilson S. J., Selitrennikoff C. P.: *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 361 (2002).
41. Balls A. K., Hale W. S.: *Cereal Chem.* 17, 243 (1940).
42. Colilla F. J., Rocher R., Mendez E.: *FEBS Lett.* 270, 191 (1990).
43. Broekaert W. F., Terras F. R., Cammue B. P., Osborn R. W.: *Plant Physiol.* 108, 1353 (1995).
44. Thevissen K., Francois I. E., Takemoto J. Y., Ferket K. K., Meert E. M., Cammue B. P.: *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 169 (2003).
45. Lay F. T., Brugliera F., Anderson M. A.: *Plant Physiol.* 131, 1283 (2003).
46. Ye X. Y., Ng T. B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 1111 (2000).
47. Ye X. Y., Ng T. B.: *Life Sci.* 70, 1129 (2002).
48. Gasser C. S., Gunning D. A., Budelier K. A., Brown S. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9519 (1990).
49. Vivanco J. M., Savary B. J., Flores H. E.: *Plant Physiol.* 119, 1447 (1999).
50. Nielson K., Payne G. A., Boston R. S.: *Plant Physiol.* 119, 1447 (2001).
51. Park S. W., Lawrence C. B., Linden J. C., Vivanco J. M.: *Plant Physiol.* 130, 164 (2002).
52. Peumas W. J., Hao Q., Van Damme J. M.: *FASEB J.* 15, 1493 (2001).
53. Kader J. C.: *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 627 (1996).
54. Park K. S., Cheong J. J., Lee S. J., Suh M. C., Choi D.: *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 509 (2000).
55. Soares-Costa A., Beltramini L. M., Thiemann O. H., Henrique-Silva F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 1194 (2002).
56. Joshi B. N., Sainani M. N., Bastawade K. B., Gupta V. S., Ranjekar P. K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 382 (1998).
57. Segura A., Moreno M., Madueno F., Molina A., Garcia-Olmedo F.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 16 (1999).
58. Huynh Q. K., Borgmeyer J. R., Smith C. E., Bell L. D., Shah D. M.: *Biochem. J.* 15, 723 (1996).
59. Breukink E., De Kruijff B.: *Biochem. Biophys. Acta* 1462, 223 (1999).
60. Zasloff M.: *Nature* 415, 389 (2002).
61. Sandvig K., van Deurs B.: *EMBO J.* 19, 5943 (2000).
62. Velazhahan R., Muthukrishnan S.: *Bilogia Plantarum* 47, 347 (2003).
63. Li X., Gasic K., Cammue B., Broekaert W., Korban S. S.: *Planta* 218, 226 (2003).
64. Ahnand A., Zhou T., Trick H. N., Gill B. S., Bockus W. W., Muthukrishnan S.: *J. Exp. Bot.* 38, 1101 (2003).

V. Heřmanová^{a,b}, J. Bárta^a, and V. Čurn^b
^aDepartment of Plant Production, ^bBiotechnological Centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice): **Antifungal Plant Proteins – Classification, Characterization and Potential Applications**

This short review is focused on antifungal plant proteins, their classification and characterization. There are 11 groups of the proteins: PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5 proteins, defensins, thionins, CLPs, RIPs, LTPs, and protease inhibitors. The mechanisms of action of these proteins are as different as their sources and include degradation of fungal cell wall polymers, formation of membrane channels or damage of cellular ribosomes. The mode of action of many proteins remains unknown. The range of fungi that are inhibited by these proteins is very broad, including pathogens of many plants. The genes encoding antifungal proteins can be used to create transgenic plants with increased fungal field resistance. Some antifungal proteins (e.g. zeamatin) are tested for therapeutical use.