

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Úloha signálních drah oxidu dusnatého a kyseliny salicylové v odpovědi rostlin rajčete na teplotní stres a infekci patogeny

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Eva Formánková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 26.4.2018

Bc. Eva Formánková

Děkuji svému školiteli panu doc. Mgr. Marku Petřivalskému, Dr. za odborné vedení a poskytnutí konzultací potřebných k vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat paní doc. RNDr. Barboře Mieslerové, Ph.D. za poskytnutí patogenu rajčatového padlí. Poděkování patří také celému kolektivu Katedry biochemie, zejména Mgr. Tereze Tiché, Ph.D za pomoc a cenné rady při experimentech v laboratoři.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Eva Formánková
Název práce	Úloha signálních drah oxidu dusnatého a kyseliny salicylové v odpovědi rostlin rajčete na teplotní stres a infekci patogeny
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Diplomová práce je zaměřena na studium vztahů mezi signálními molekulami ROS a RNS a hladinami heat-shock proteinů v reakci na stres vyvolaný zvýšenou teplotou, biotrofním patogenem a ošetření kyselinou salicylovou (SA) u rostlin *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Literární rešerše shnuje aktuální poznatky o rostlinných odpovědích a obraně rostlin proti teplotnímu stresu, se zaměřením na úlohu HSP v rostlinách.

Ke studiu této obsáhlé problematiky bylo využito metod Western blot k detekci heat-shock proteinů, měření aktivit enzymů podílejících se na metabolismu ROS a RNS a lokalizace ROS a RNS v listech mikroskopickými metodami s využitím příslušných barviv a fluorescenčních sond. V praktické části bylo zjištěno, že postřik roztokem SA v přítomnosti teplotního stresu zvyšuje produkci HSP70 oproti působení samotného teplotního stresu. Kyselina salicylová má také pozitivní vliv na nárůst hladin konstitutivních HSP70 a dokáže zintenzivnit produkci NO a ROS.

Signální dráhy ROS a RNS hrají roli v aktivaci akumulace HSP a spolu s SA se podílejí na obranné odpovědi rostlin vůči abiotickým a biotickým stresům.

Klíčová slova	Teplotní stres, rostliny, oxid dusnatý, kyselina salicylová, heat-shock proteiny, reaktivní formy kyslíku, patogen
Počet stran	103
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Eva Formánková
Title	The role of signalling pathways of nitric oxide and salicylic acid in responses of tomato plants to heat stress and pathogen infection
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2018

Abstract

The diploma thesis is directed to studies of relations between signal molecules ROS and RNS and levels of heat-shock proteins in reaction to stress of increased temperature, biotrophic pathogen and treatment with salicylic acid (SA) in plants of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom. A literary research includes actual knowledge about plant defence response to heat stress, mainly by accumulation of HSPs in plants.

Methods of Western blot for detection of heat-shock proteins, measuring of activities of enzymes involved in metabolism of ROS and RNS and microscopy for localization of ROS and RNS in leafs with corresponding stains and fluorescent probes were used in the experimental part. It was found out that spraying plants with a solution of SA in the present of heat stress increases production of HSP70 in comparison to effects of heat stress alone. Salicylic acid also positively influences accumulation of constitutive HSP70 and it can intensify production of ROS and RNS.

Signalling pathways of ROS and RNS play a role in activation of accumulation of HSPs and together with SA are involved in plant defence response to abiotic and biotic stresses.

Keywords	Heat stress, plants, nitric oxide, salicylic acid, reactive oxygen species, heat-shock proteins, pathogen
Number of pages	103
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	1
1.1	Význam teplotního stresu u rostlin	1
2	Současný stav řešené problematiky	4
2.1	Rostlinné heat-shock proteiny (HSP)	4
2.1.1	Nomenklatura a rozdělení HSP do rodin	4
2.1.2	Regulace exprese genů HSP	5
2.1.3	Strukturní vlastnosti HSP	9
2.1.4	HSP jako molekulární chaperony	11
2.1.5	Odpověď rostlin na teplotní stres	15
2.1.6	Funkce HSP při patogenezi	17
2.1.6.1	Signální dráhy regulující tvorbu rostlinných HSP při patogenním stresu	21
2.1.7	Kyselina salicylová (SA)	23
2.1.7.1	Využití transgenních nahG rostlin při studiu úlohy SA	25
2.1.8	Úloha reaktivních forem kyslíku (ROS) při teplotním stresu	27
2.1.9	Úloha reaktivních forem dusíku (RNS) při teplotním stresu	28
3	Experimentální část	33
3.1	Použité chemikálie	33
3.2	Materiály a přístrojové vybavení	34
3.3	Biologický materiál	35
3.3.1	Pěstování rostlinného materiálu	35
3.3.2	Působení stresových podmínek	36
3.4	Použité metody	37
3.4.1	Příprava pufrů	37
3.4.1.1	Pufr pro extrakci pro SDS-polyakrylamidovou elektroforézu (SDS-PAGE)	37

3.4.1.2	Pufr do zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE	37
3.4.1.3	Pufr do dělicího gelu pro SDS-PAGE	37
3.4.1.4	Vzorkový pufr pro SDS-PAGE	37
3.4.1.5	Elektrodový pufr pro SDS-PAGE	37
3.4.1.6	Blotovací pufr	38
3.4.1.7	TBS pufr	38
3.4.1.8	TBS-T pufr	38
3.4.1.9	Pufr pro detekci alkalickou fosfatase	38
3.4.1.10	Pufr pro extrakci a měření aktivity askorbátperoxidasy (APX)	38
3.4.1.11	Pufr pro extrakci – měření aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR)	39
3.4.1.12	Eluční pufr pro přečištění extraktů a měření aktivity GSNOR	39
3.4.2	Roztoky	39
3.4.3	Příprava rostlinných vzorků	40
3.4.3.1	Příprava rostlinných vzorků pro SDS-PAGE	40
3.4.3.2	Příprava rostlinných vzorků pro měření aktivity APX	40
3.4.3.3	Příprava rostlinných vzorků pro měření aktivity GSNOR	40
3.4.4	SDS-PAGE	40
3.4.4.1	Detekce proteinů barvivem Coomassie Brilliant Blue R-250	41
3.4.5	Western blot	42
3.4.5.1	Tank blot	42
3.4.5.2	Imunochemická detekce proteinů na membráně	42
3.4.6	Stanovení koncentrace celkových proteinů metodou Bradforda	43
3.4.7	Měření aktivity APX	43
3.4.8	Příprava S-nitrosoglutathionu	44
3.4.9	Měření aktivity GSNOR	44
3.4.10	Provedení statistické analýzy výsledků	45

3.4.11	Histochemická lokalizace peroxidu vodíku a superoxidu	45
3.4.12	Histochemická lokalizace oxidu dusnatého	45
4	Výsledky	47
4.1	Optimalizace metody Western blot pro detekci HSP	47
4.1.1	Ředění primární protilátky k detekci HSP70	47
4.1.2	Výběr primárních protilátek pro detekci smHSP	48
4.1.3	Výběr koncentrace dělicího gelu	48
4.2	Analýza hladin HSP v listech rajčete při vystavení teplotnímu stresu, kyselině salicylové a infekci biotrofním patogenem	49
4.2.1	Hladiny HSP v listech rajčete vystavených teplotnímu stresu	49
4.2.2	Hladiny HSP v listech rajčete vystavených kyselině salicylové	52
4.2.3	Vliv současného působení kyseliny salicylové a teplotního stresu na hladiny HSP	54
4.2.3.1	Vliv kyseliny salicylové na expresi HSP70 při teplotním stresu	56
4.2.4	Hladiny HSP v listech infikovaných patogenem	57
4.2.5	Vliv současného působení kyseliny salicylové a patogenu na hladiny HSP	59
4.2.6	Vliv současného působení patogenu a teplotního stresu na hladiny HSP	60
4.3	Měření aktivity enzymů APX a GSNOR	61
4.3.1	Měření aktivity APX	61
4.3.2	Měření aktivity GSNOR	63
4.4	Vliv teplotního stresu, kyseliny salicylové a infekce patogenem na produkci ROS a RNS v listech rajčete	64
4.4.1	Histochemická detekce peroxidu vodíku	64
4.4.2	Histochemická detekce superoxidu	69
4.4.3	Histochemická detekce NO	73
5	Diskuze	81

5.1	Optimalizace metody Western blot pro stanovení hladiny HSP v listech rajčete	81
5.2	Vliv působení teplotního stresu, kyseliny salicylové a infekce patogenem na hladiny HSP	82
5.3	Vliv působení teplotního stresu, kyseliny salicylové a infekce patogenem na aktivitu enzymů metabolismu ROS a RNS	86
5.4	Vliv působení teplotního stresu, kyseliny salicylové a infekce patogenem na hladiny ROS a NO	91
6	Závěr	94
7	Literatura	96
8	Seznam použitých zkratk	101

Cíle práce:

V teoretické části diplomové práce bylo cílem vypracování literární rešerše shrnující aktuální poznatky o rostlinných odpovědích a obraně proti teplotnímu stresu, se zaměřením na úlohu tzv. heat-shock proteinů (HSP) v rostlinách.

Cílem experimentální části diplomové práce bylo optimalizovat stanovení HSP metodou Western blot pro genotyp rajčete *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom. Dalším cílem bylo studium hladin reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) ve vztahu ke změnám akumulace specifických forem HSP v listech rajčat vystavených teplotnímu stresu, kyselině salicylové a biotrofnímu patogenu.

ÚVOD

1.1 Význam teplotního stresu u rostlin

Rostliny jsou jako přisedlé organismy vystaveny trvale měnícím se vnějším podmínkám, vůči kterým musí reagovat úpravou svého metabolismu procesem zvaným aklimatizace (Mittler *et al.*, 2012). Stres v rostlinách je vyvolaná nefyziologická situace vzniklá působením nepříznivých vnějších faktorů nebo jejich změn v okolním prostředí (Reis *et al.*, 2012). Mezi zdroje stresu patří sucho, salinita, působení chemikálií a těžkých kovů, extrémní teploty, UV záření, mechanické poškození a útoky patogenů a škůdců (Gould *et al.*, 2003).

Teplota je jedním z hlavních fyzikálních parametrů, které ovlivňují život na Zemi. Výsledkem je, že téměř všechny živé organismy vyvinuly signální dráhy k vnímání mírných změn teploty v okolí a k upravení jejich metabolismu a buněčných funkcí, aby nedošlo k poškození teplotním stresem. Reakce rostlin i jiných organismů na zvýšenou teplotu zahrnují změny transkriptomu, proteomu, metabolomu a lipidomu, aby se vytvořil nový ustálený stav metabolických procesů, který umožní organismu fungovat, přežít, a dokonce reprodukovat při vyšší teplotě (Mittler *et al.*, 2012).

Klimatické změny a globální oteplování jsou i přesto stálou hrozbou pro zdraví rostlin. Kontinuální nárůst teploty, řadící se mezi abiotické stresy, představuje výrazný negativní vliv na růst rostlin, produkci plodin a výnosy (Zafar *et al.*, 2016), které např. u rýže poklesnou o 10 % při každém zvýšení o 1 °C nad optimální teplotu (Timperio *et al.*, 2008). Obecně platí, že přechodné zvýšení teploty, obvykle o 10 až 15 °C nad běžnou teplotu, je považováno za teplotní šok nebo stres. Teplotní stres je komplexní funkcí teploty ve stupních, doby trvání, a tempa růstu teploty (Wahid *et al.*, 2007). Je očekáváno, že vysoké teploty se budou vyskytovat v budoucnu častěji v důsledku skleníkového efektu (Zafar *et al.*, 2016). Plynné emise v důsledku lidské činnosti jsou v podstatě příspěvkem ke stávajícím koncentracím skleníkových plynů, zejména oxidu uhličitého, methanu a oxidů dusíku (Wahid *et al.*, 2007).

Vysoké teploty inhibují bobtnání pylových zrn během kvetení a přispívají k jejich špatnému uvolňování, omezují růst rostlin (Zafar *et al.*, 2016). Stres vysokou teplotou ovlivňuje stabilitu různých proteinů, RNA a cytoskeletárních struktur, zvyšuje fluiditu membrán, mění účinnost enzymatických reakcí v buňce, což narušuje stav metabolické dráhy (Mittler *et al.*, 2012). Je příčinou ztráty kvartérní struktury proteinových komplexů, vyskytujících se v různých metabolických drahách, z nichž většina zahrnuje přenos elektronů. Dochází k rozpojení drah a k přechodu elektronů na molekuly kyslíku

za vzniku toxických ROS (Timperio *et al.*, 2008), a následné peroxidaci fosfolipidů, remodelaci membránových fosfolipidů, oxidativnímu poškození proteinů či poškození jaderné a mitochondriální DNA (Qu *et al.*, 2013). Ukazatelem oxidativního poškození membrán je zvýšená hladina malonaldehydu (Larkindale a Knight, 2002).

Nicméně mírné teplotní změny nemusí být pro rostliny vždy škodlivé. Teplotní změny mohou regulovat pohyby, jako je otevírání a zavírání květu, hrají roli při resetování vnitřních hodin a denní synchronizaci (Ruelland a Zachowski, 2010).

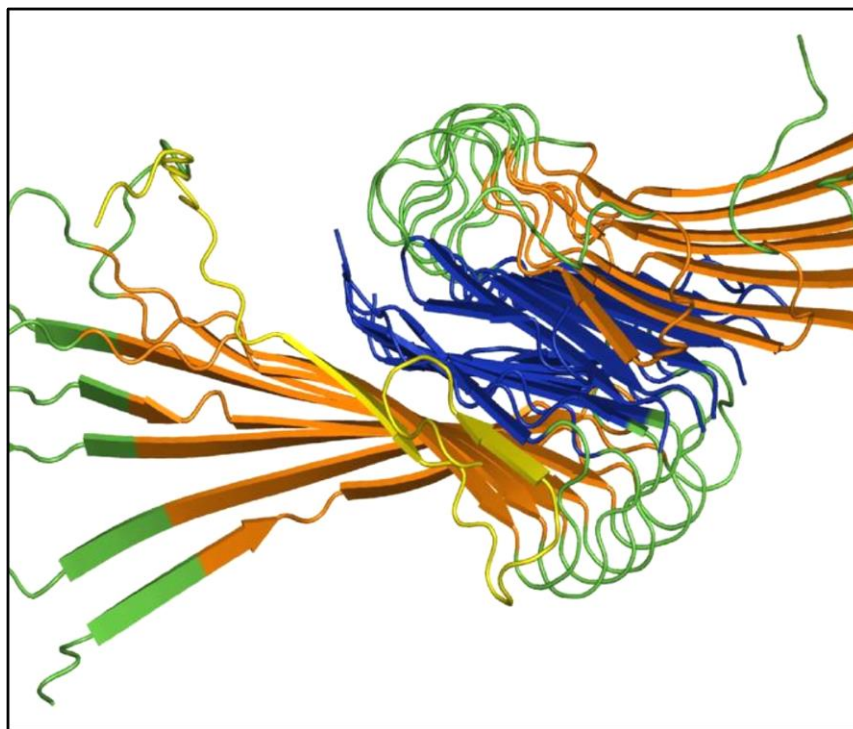
Odezva na teplotní šok je charakterizována dramatickými a rychlými změnami v transkripci a translaci. Mezi dráhy odpovědi na teplotní stres patří rychlá akumulace proteinů teplotního šoku (HSP), které mají důležitou ochrannou roli při různých stresech (Zafar *et al.*, 2016). Jejich produkce se zvyšuje u rostlin, které pociťují náhlé nebo postupné zvyšování teploty, i když některé HSP jsou vyvolány i při nízkých teplotách (Kubienová *et al.*, 2013a). Indukce HSP se zdá být univerzální odpovědí teplotního stresu a je pozorována ve všech organismech. Hlavní třídy HSP jsou vysoce homologní mezi odlišnými organismy (Wahid *et al.*, 2007).

Rovněž i jiné procesy, než indukce HSP jsou potřebné k přežití rostliny po vystavení teplotnímu stresu. Pro odolávání vysokým teplotám je produkováno mnoho obranných enzymů, antioxidantů a hormonů, které tvoří síť odpovědi na teplotní stres (Qu *et al.*, 2013).

Rostlinné hormony (kyselina salicylová, kyselina abscisová, ethylen), reaktivní formy kyslíku i vápník přispívají k signalizaci během teplotního stresu a chrání rostliny před teplotně indukovaným oxidačním poškozením. Bylo prokázáno, že inhibitory signálních drah vápníku a inhibitory kalmodulinu omezují přežití a zvyšují únik elektrolytu přes poškozené membrány při působení teplotního stresu v kukuřici. Vápník může být zapojen v některých signálních drahách pro vnímání teplotního stresu a získání termotolerance. Transgenní rostliny obsahující nižší hladiny ethylenu (ETR-1), kyseliny abscisové (Abi-1) či kyseliny salicylové (NahG) vykazují zvýšenou citlivost na teplotu. Vápenaté ionty, kyselina salicylová, abscisová a ethylen jsou označováni jako druzí poslové v signalizacích různých stresů (Larkindale a Knight, 2002).

Proteomická tvárnost remodelující se během období vývojových změn umožňuje rostlinám reagovat na různé podmínky životního prostředí, abiotické i biotické stresy, jež snižují průměrné výnosy většiny zemědělských plodin o více než 50 % (Timperio *et al.*, 2008). Udržení proteinů v jejich funkční nativní konformaci a zabránění agregace poškozených proteinů (Obr. 1) je důležité pro přežití buněčného stresu (Park a Seo, 2015).

Pochopení molekulárního mechanismu reakce teplotního stresu a chov teplotně tolerantních rostlin jsou nezbytné kroky pro zajištění kvalitních výnosů plodin a následnou produkci potravin. Z tohoto důvodu je v poslední době mechanismu odpovědi na teplotní stres v rostlinách – zejména v plodinách, a pěstování teplotně tolerantních odrůd věnováno mnoho pozornosti (Qu *et al.*, 2013).



Obr. 1: Proteinový agregát. K agregaci dochází u nesložených proteinů, které podlely denaturaci. U správně složených proteinů jsou hydrofobní centra tvořena hydrofobními aminokyselinami a obklopena hydrofilními aminokyselinami. Po teplotní denaturaci jsou hydrofobní centra proteinů vystavena do okolního prostoru a mají tak možnost interagovat s hydrofilními aminokyselinami jiných proteinů a proteiny se tak vzájemně těmito interakcemi shlukují (převzato z: Fawzi *et al.*, 2007).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Rostlinné heat-shock proteiny (HSP)

2.1.1 Nomenklatura a rozdělení HSP do rodin

Proteiny teplotního šoku (HSP) jsou skupinou konzervovaných proteinů, které jsou indukovány nebo nadměrně exprimovány u prokaryot a eukaryot při zvýšených, ale i nižších teplotách oproti normální teplotě, při mechanických poraněních, infekcích patogeny, působení chemických látek a při oxidačním stresu (Cronje a Bornman, 1999).

Produkty genů HSP jsou u rostlin děleny do pěti skupin/rodin podle jejich molekulové hmotnosti. I když proteiny teplotního šoku mají mnoho společných vlastností, každá skupina představuje zvláštnosti týkající se mechanismu jejich účinku, substrátové specificity, závislosti či nikoli na ATP, intracelulární lokalizace a typu stresu, ve kterém mohou být zapojeny (Wirth *et al.*, 2002).

Ekvivalentní rodiny HSP se označují odlišnými názvy u eukaryot a u bakteriálního modelu reprezentujícího prokaryota – *Escherichia coli*. Proteiny teplotního šoku s molekulovou hmotností kolem 100 kDa se označují jako HSP100 u eukaryot, jako ClpB u *E. coli*. Proteiny teplotního šoku s molekulovou hmotností 90 kDa se v nomenklatuře eukaryot označují HSP90, v nomenklatuře *E. coli* HtpG (Wahid *et al.*, 2007). Skupina HSP, která je nejčastěji spojena s ochranou, je nejvíce studována v souvislosti s teplotním stresem a je nejhojnější, má molekulovou hmotnost 70 kDa. U eukaryot je nazývána HSP70, u *E. coli* jako DnaK rodina. Rodina HSP70 je nejkonzervovanější rodinou HSP s 50 % identických residuí mezi *E. coli* a eukaryoty (Wirth *et al.*, 2002). Další dobře prostudovanou skupinou jsou proteiny s molekulovou hmotností pohybující se kolem 60 kDa, nazývané také chaperoniny, které se u eukaryot označují HSP60, u *E. coli* GroEL. Poslední skupina jsou malé proteiny teplotního šoku (smHSP) (Wahid *et al.*, 2007). Tyto HSP mají molekulovou hmotnost od 16 do 30 kDa (Kotak *et al.*, 2007).

Poté jsou ještě jako zvláštní skupina uznávány proteiny o molekulové hmotnosti 40 kDa, nazývané HSP40 v nomenklatuře eukaryot, DNAJ rodina v nomenklatuře *E. coli*. Působí jako kochaperony tím, že stabilizují interakci HSP70 s jinými proteiny (Pegoraro *et al.*, 2011).

Živočišné HSP se rozlišují taktéž do pěti hlavních skupin. HSP u myši, modelového organismu savců, jsou děleny podle molekulové hmotnosti na HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP 25-30 a HSP47 (Wirth *et al.*, 2002).

Jednotlivé rodiny jsou členěny do dalších podrodin na základě lokalizace členů těchto podrodin v buňce. HSP100 rodina se člení na dvě třídy. První třída zahrnuje ClpB, ClpA/C a ClpD proteiny, které se nacházejí v cytosolu a mitochondriích a obsahují dvě vazebné domény. Druhá třída obsahuje ClpM, ClpN, ClpX a ClpY proteiny, které jsou lokalizovány v chloroplastech a obsahují pouze jednu vazebnou doménu (Pegoraro *et al.*, 2011).

HSP90 rodina zahrnuje podle lokalizace čtyři členy. Jsou jimi AtHsp90-1 s lokalizací v cytosolu, AtHSP90-5 s lokalizací v chloroplastu, AtHSP90-6 s lokalizací v mitochondriích a AtHSP90-7 s lokalizací v endoplasmatickém retikulu (Wang *et al.*, 2004).

Rozmanitost HSP70 genů je částečně přičítána přítomnosti odlišných HSP70 homologů v cytoplasmě, v lumenu endoplazmatického retikula, v mitochondriích a chloroplastech. HSP70 umístěný v endoplazmatickém retikulu je nazýván vazebný protein (BIP) (Pegoraro *et al.*, 2011). Někteří členové rodiny HSP70 jsou konstitutivně exprimováni i za příznivých podmínek a jsou často označováni jako HSC70 (70 kDa heat-shock cognate). Tyto proteiny jsou často zapojeny do skládání de novo syntetizovaných polypeptidů, importu a translokace prekurzorových proteinů a nejsou příliš ovlivněny změnou teploty. Ostatní členové rodiny jsou exprimovány pouze tehdy, když je organismus vystaven stresovým faktorům a jsou označovány jako HSP70 (Wang *et al.*, 2004).

Rodina chaperoninů neboli HSP60 zahrnuje dvě podrodiny, z nichž reprezentativní člen rodiny první je Cpn60, který se vyskytuje v chloroplastech a mitochondriích a člen druhé skupiny je CCT, který je lokalizován v cytosolu (Wang *et al.*, 2004).

Malé HSP jsou děleny do šesti podrodin proteinů lišící se svou lokalizací. V rostlinách jsou tyto proteiny kódovány v jádře a jsou rozděleny do šesti tříd, tři třídy (CI, CII a CIII) jsou lokalizovány v cytosolu nebo v jádře a další tři (CIV, CV, a CVI) v plastidech, endoplazmatickém retikulu a mitochondriích (Pegoraro *et al.*, 2011).

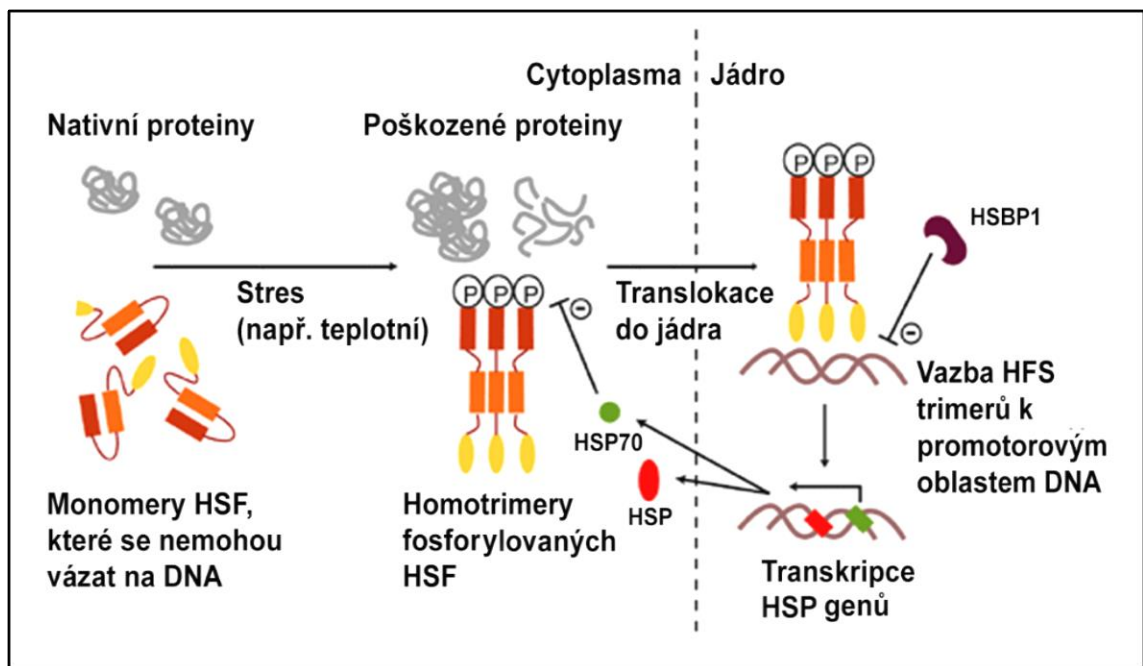
2.1.2 Regulace exprese genů HSP

Reakce na vysoké teploty se vyznačuje velmi rychlou indukcí transkripce genů souvisejících s teplotním šokem, a zároveň strmým poklesem transkripce většiny ostatních genů. Odezva je navíc zvýšena selektivní translací hsmRNA (mRNA syntetizovaná za teplotního šoku), což vede k selektivní a rychlé (10-15 minut u bakterií,

několik hodin u většiny vyšších eukaryot) akumulaci HSP. Maximálního množství hsmRNA je dosaženo po 1-2 hodinách působení teplotního stresu, následuje postupný pokles hladin mRNA. Navzdory tomuto poklesu, většina z těchto mRNA zůstává detekovatelná na Northern blotu i po 12 hodinách nepřetržitého teplotního stresu, z čehož vyplývá, že hsmRNA jsou poměrně stabilní i při vysokých teplotách (Gurley a Key, 1991).

Expresí HSP genů u eukaryot je regulována především na transkripční úrovni, a to faktory teplotního stresu (HSF). V rostlinách byly HSF poprvé identifikovány v rajčeti jedlém (*Solanum lycopersicum*), poté bylo několik HSF identifikováno u houseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a řady dalších druhů plodin, včetně rýže, pšenice a sójových bobů (Zafar *et al.*, 2016). U *S. lycopersicum* je do současnosti známo více než 21 HSF, u *A. thaliana* celkem 15 (Snyman a Cronje, 2008). Transkripční faktory teplotního stresu existují jako neaktivní proteiny lokalizované převážně v cytoplasmě. Po působení stresu tvoří faktory teplotního šoku trimery, které jsou fosforylovány (Piterková *et al.*, 2013). HSF trimery jsou následně díky jejich jadernému lokalizačnímu signálu, tvořenému bipartilními shluky bazických aminokyselin translokovány do jádra (Baniwal *et al.*, 2004). V jádře se trimery váží na elementy odpovědi teplotního šoku (HSE) v promotorové oblasti genů kódujících HSP (Piterková *et al.*, 2013) (Obr. 2). Transkripční faktory teplotního šoku a promotorové elementy teplotního šoku patří mezi nejvíce vysoce konzervované transkripční regulační elementy v přírodě (Reis *et al.*, 2012). V DNA dochází také k navázání histonacetyltransferas, což přispívá ke snížení obsazení promotorů inhibičními histony (Mittler *et al.*, 2012).

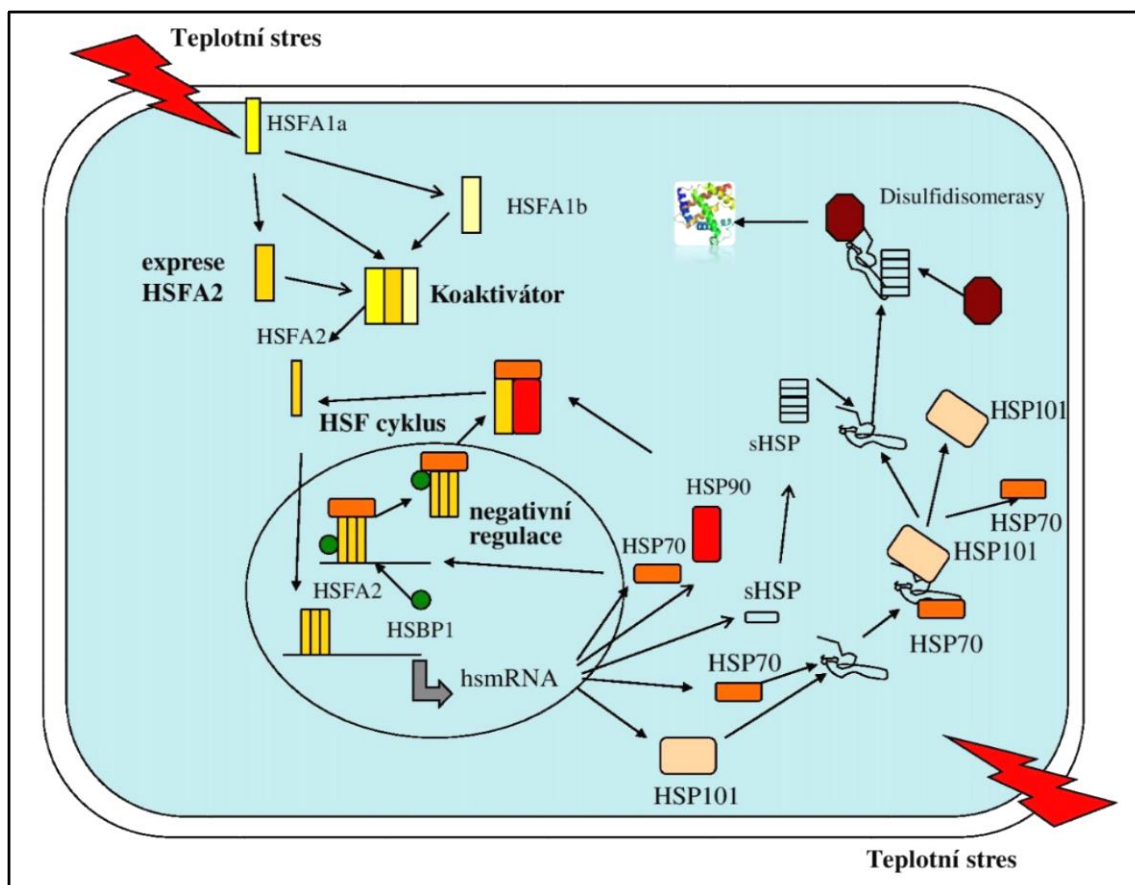
Genové studie lokalizace HSF genů u *A. thaliana* ukázaly, že geny HSF jsou nerovnoměrně rozděleny napříč všemi osmi chromozomy. Analýza struktury genomu ukázala, že geny HSF převážně obsahují pouze jeden intron. U poměrně malého množství genů HSF byly zachovány dva introny, které naznačují zisk intronu v průběhu evolučního procesu (Zafar *et al.*, 2016).



Obr. 2: Regulace transkripce HSP pomocí HSF. HSF proteiny jsou přítomny v cytoplasmě jako neaktivní monomery. Za stresových podmínek přítomnost poškozených proteinů (nefunkční, se sklonem k agregaci, citlivých na proteasy) vede k fosforylaci a tvorbě trimerů HSF. Tyto trimery jsou translokovány do jádra, váží se na promotorové oblasti genů teplotního šoku a dochází k aktivaci genové transkripce. Aktivita HSF trimerů se snižuje vlivem zvýšené hladiny HSP (např. HSP70) a vazebného proteinu teplotního šoku (HSBP1), který je lokalizován v jádře (upraveno podle Pockley, 2001).

Funkce jednotlivých HSF nejsou stále dokonale pochopeny. Rostlinné HSF zahrnují tři konzervované evoluční třídy: A, B a C. HSFA byl poměrně dobře prostudován. HSFA1a je klíčový regulátor odpovědi na teplotní šok a HSFA2 je hlavní teplotní stresový faktor v odpovědích teplotního stresu u rajčat (Obr. 3). U *A. thaliana*, HSFA4a a HSFA8 působí jako senzory reaktivních forem kyslíku (ROS) produkovaných na základě sekundárního stresu v průběhu reakce teplotního stresu. Třída HSFB pravděpodobně působí jako útlumová pro HSFA (Kotak *et al.*, 2007).

HSBP1 interaguje s HSP70 a tvoří se desintegrační komplex s aktivními homotrimery, které jsou převedeny na neaktivní monomery, čímž je inhibována hlavní regulační funkce HSFA1a a je přerušen signál teplotní stresové reakce. Po dalším působení teplotního stresu je celý cyklus znovu zahájen (Qu *et al.*, 2013) (Obr. 3).



Obr. 3: Význam HSF a HSBP1 v regulaci exprese HSP. HSFA1a spouští reakci na teplotní stres pomocí indukce exprese HSFA1b a HSFA2, který tvoří koaktivátor s oběma proteiny. HSFA2 indukuje expresi různých HSP. HSP70, HSP101 a sHSP se podílejí se na opravě poškozených proteinů. HSBP1 a HSP70 se podílejí na negativní regulaci, kdy se odpověď na teplotní stres zmenšuje při potřebě ji vypnout. V průběhu tohoto procesu jsou aktivní homotrimery HSFA2 převedeny na neaktivní monomery, které se v případě potřeby mohou zase přeměnit na aktivní trimery, čímž se uzavírá celý cyklus aktivace a deaktivace HSF (upraveno podle Qu *et al.*, 2013).

HSE sekvence jsou umístěné v 5'-koncové oblasti DNA, která byla prvně identifikována v octomilce (*Drosophila melanogaster*). Slouží jako vazebné místo pro trimery HSF zprostředkovávajících aktivaci transkripce HSP genů. HSE má schopnost působit i na velkou vzdálenost jako enhancer, tedy zesiluje odpověď teplotního šoku. Existují důkazy pro zapojení CCAAT boxu a AT-bohaté sekvence v HSE (Wahid *et al.*, 2007). V živočišných systémech je přítomen minimálně jeden HSE, který postačuje pro expresi HSP, avšak uděluje pouze mírnou účinnost. Plná aktivace transkripce obvykle vyžaduje alespoň dva HSE (Gurley a Key, 1991). U rostlin bylo pozorováno, že nejméně tři repetice HSE jsou vyžadovány pro aktivaci transkripce in vivo při vazbě HSF (Zafar *et al.*, 2016).

Někteří členové, náležící do stejné rodiny HSP, jsou si strukturně mezi sebou velmi podobní, což je jev způsobený duplikací genu. Například v rodině proteinů sHSP, HSP17,5 a HSP18 jsou si velmi podobné a stejná situace platí i pro členy rodiny HSP90 a HSP82. Dříve se předpokládalo, že duplicitní geny nejsou schopny vyvinout nové funkce, protože původní funkce byla udržována starší kopií. Nicméně v současnosti je již dobře známo, že genová duplikace je zdrojem nových genů s novou funkcí (Pegoraro *et al.*, 2011).

Zajímavé jsou rostlinné geny smHSP. U vyšších rostlin bylo definováno šest rodů jaderných genů kódujících smHSP, zatímco ostatní eukaryota mají typicky jeden až čtyři jednotlivé geny pro smHSP. Každá genová rodina smHSP u rostlin kóduje proteiny nacházející se v odlišném buněčném oddílu, včetně cytosolu, chloroplastu, ER a mitochondrií. Evoluční analýza naznačuje, že rodiny genů smHSP vznikly duplikací a divergencí genů (Waters *et al.*, 1996).

SmHSP vykazují mnohem menší sekvenční podobnost ve srovnání s jinými HSP, kdy např. u HSP70 je až 50% identita sekvencí mezi prokaryoty a eukaryoty. Vysoká identita mezi sekvencemi je omezena C-terminální doménou, která se někdy nazývá doménou "teplotního šoku". Tato doména zahrnuje přibližně 100 aminokyselin, které se mezi jednotlivými smHSP poměrně liší (Waters *et al.*, 1996).

Důležitost HSP pro organismus se dokazuje mutacemi genů pro proteiny teplotního šoku, kdy mutantním rostlinám chybí onen zkoumaný gen a studují se vlivy nepřítomnosti proteinu na organismus. Hot1 mutant *A. thaliana* má mutaci v genu HSP101 a je defektní v toleranci na vysokou teplotu. Naopak transgenní rostliny, které nadměrně exprimují gen HSP101, vykazují toleranci na vysoké teploty (Pegoraro *et al.*, 2011).

2.1.3 Strukturní vlastnosti HSP

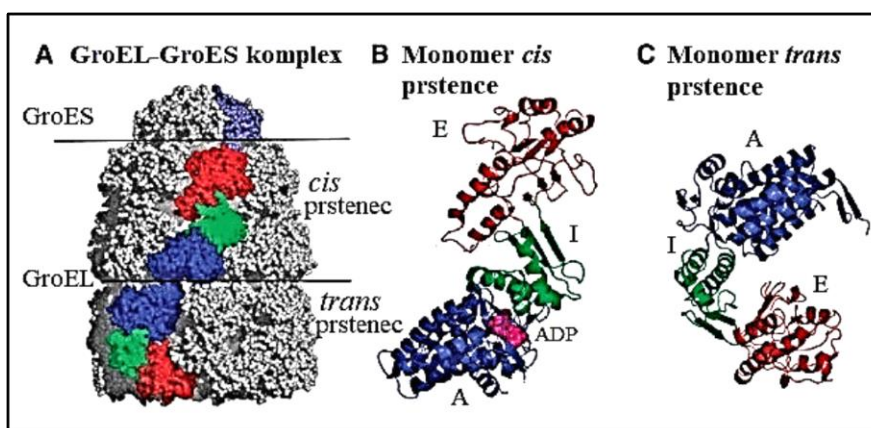
Členy rodiny HSP100 byly poprvé popsány jako složky bakteriálního dvou-podjednotkového CLP systému proteasy. Rodina je rozdělena do dvou hlavních tříd a různých podskupin těchto tříd. Členové první třídy (A, B, C, D) obsahují dvě nukleotid-vazebné domény (také nazývané ATP-vazebné domény), zatímco členové druhé třídy (M, N, X, Y) mají pouze jednu nukleotid-vazebnou doménu. Hsp100/CLP proteiny jsou strukturně hexamerní kroužky (Wang *et al.*, 2004). Další studie týkající se jejich struktury a funkce jsou stále v současné době v počátcích (Wirth *et al.*, 2002).

HSP90 proteiny obsahují dvě vysoce konzervované domény, jimiž jsou vazebná doména pro ATP na N-konci a vysoce nabitá oblast bohatá na kyselinu glutamovou (Pegoraro *et al.*, 2011).

Obdobně všichni členové HSP70 mají společnou strukturu, která se skládá z vysoce zachované N-terminální ATPasové domény o 44 kDa a C-terminální domény o 25 kDa, která váže peptidy (Wang *et al.*, 2004).

Protein teplotního šoku o 60 kDa byl poprvé identifikován v bakteriích jako GroEL, který je nezbytný pro růst a morfogenezi samotné bakterie. V rostlinách, byl jemu homologní protein identifikován v chloroplastu. Protein má cylindrický tvar a skládá se z komplexu dvou heptamerických prstenců *cis* a *trans*, každý o velikosti 60 kDa, tvořící válec ATPasy, jehož funkce je usnadnění skládání proteinů (Wirth *et al.*, 2002). Každý monomer HSP60 rozlišuje tři strukturální domény, A (apikální), I (intermediální) a E (ekvatoriální) (Pegoraro *et al.*, 2011) (Obr. 4). Působí v kombinaci s dalším 10kDa proteinem (HSP10 nebo GroES), a pravděpodobně s mitochondriální isoformou HSP70 (Wirth *et al.*, 2002).

HSP40/DNAJ se vyznačují přítomností různých typů domén, jako J-doménou, doménou zinkových prstů a C-koncovou doménou. J-doména je vysoce zachovaná, má přibližně 70 aminokyselin, strukturou je to α -šroubovicový řetězec. Doména zinkového prstu je rozdělena do klastrů. Každý klastr koordinuje jeden kation zinku. Tato doména je nezbytná pro vazbu k denaturovanému substrátu a pomáhá HSP70 skládat proteiny. Méně konzervativní doménou DNAJ proteinů je C-koncová doména a předpokládá se, že je důležitá pro zajištění specifčnosti vazby s HSP70 (Pegoraro *et al.*, 2011).



Obr. 4: Struktura komplexu GroES-GroEL. GroEL se skládá z komplexu dvou heptamerických prstenců *cis* a *trans*. Každý monomer HSP60 rozlišuje tři strukturální domény, A (apikální), I (intermediální) a E (ekvatoriální). Fungují v kombinaci s dalším 10 kDa proteinem, který tvoří GroES „víčko“ (upraveno podle Chennubhotla a Bahar, 2006).

smHSP sdílejí zachovanou C-terminální doménu o 90 aminokyselinách s názvem α -krystalinová doména (ACD), která je příbuzná doméně z α -krystalinových proteinů u obratlovců v oční čočce. ACD jsou organizovány jako trimery dimerů, tvořící dodekamerový dvojitý kruh, jak bylo zjištěno pomocí krystalové struktury pšenice Hsp16.9 (Wang *et al.*, 2004). SmHSP se nacházejí ve vysokomolekulárních komplexech v rozmezí 200-400 kDa, které se skládají z několika podjednotek smHSP (Waters *et al.*, 1996). Zvláštní vlastností komplexů smHSP je jejich schopnost sdružovat se do nerozpustných struktur větších než 1 MDa, které jsou označovány jako "granule teplotního šoku". Tvorba těchto velkých struktur se jeví jako reverzibilní a dochází k tomu především při vyšších teplotách. Důkazy naznačují, že tvorba těchto struktur je společná všem smHSP. Studie kompozice granulí teplotního šoku a možný funkční význam je komplikován jejich nerozpustností a jejich funkční význam zůstává zatím nejasný (Waters *et al.*, 1996).

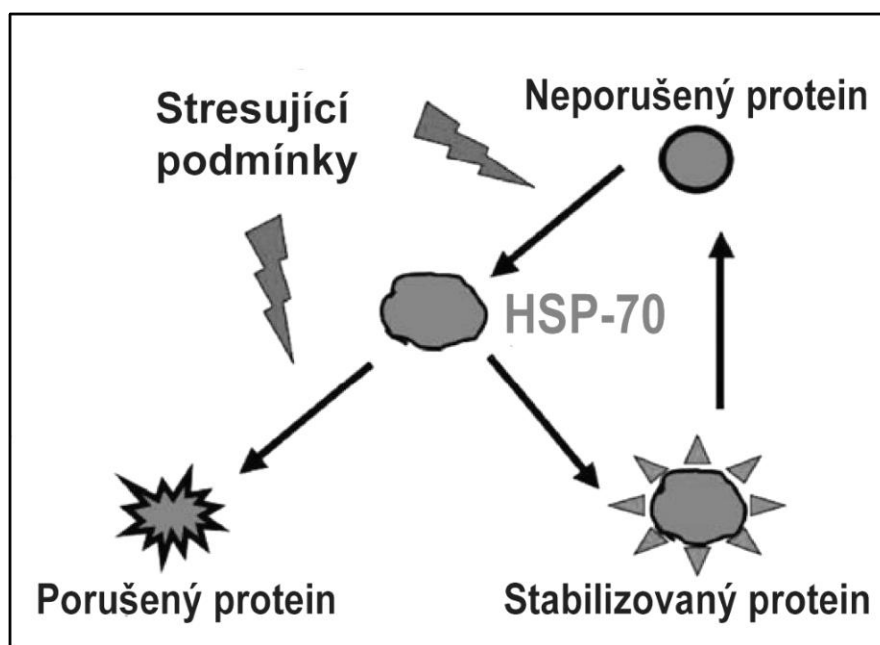
2.1.4 HSP jako molekulární chaperony

Sekvence aminokyselin vznikajícího polypeptidového řetězce poskytuje všechny informace potřebné k vytvoření konečného produktu. Fyzikální a chemické síly mají za následek složení a vytvoření trojrozměrného proteinu. Do doby objevu funkce HSP bylo mylně myšleno, že procesy skládání proteinu jsou pasivní a spontánní (Aufrecht, 2005). Pojem "chaperon" byl původně používán pro označení nukleoplasminů zapojených do transportu nukleo-cytoplazmatických proteinů. Stejný termín byl zvolen Johnem Ellisem a jeho kolegou v roce 1989 pro HSP60 (Wirth *et al.*, 2002).

Primární funkcí HSP proteinů jako chaperonů je řízení správného složení proteinů za podmínek zvýšené teploty. Chaperony se díky svým vlastnostem podílejí na ochraně organismu před teplotním šokem a zachování homeostázy (Reis *et al.*, 2012). Vazba chaperonu na proteinové substráty může také udržovat protein v rozložené konformaci za účelem usnadnění translokace proteinů přes membrány (Waters *et al.*, 1996).

Proteiny teplotního šoku přispívají ke stabilizaci proteinů v buňkách (Park a Seo, 2015). Za fyziologických podmínek kontrolují buněčnou signalizaci, skládání nově syntetizovaných bílkovin, translokaci a degradaci, zatímco za teplotního stresu či jiných abiotických nebo biotických stresů brání chybnému skládání proteinů a jejich agregaci a chrání membrány udržením membránových proteinů v nativní konformaci (Mittler *et al.*, 2012).

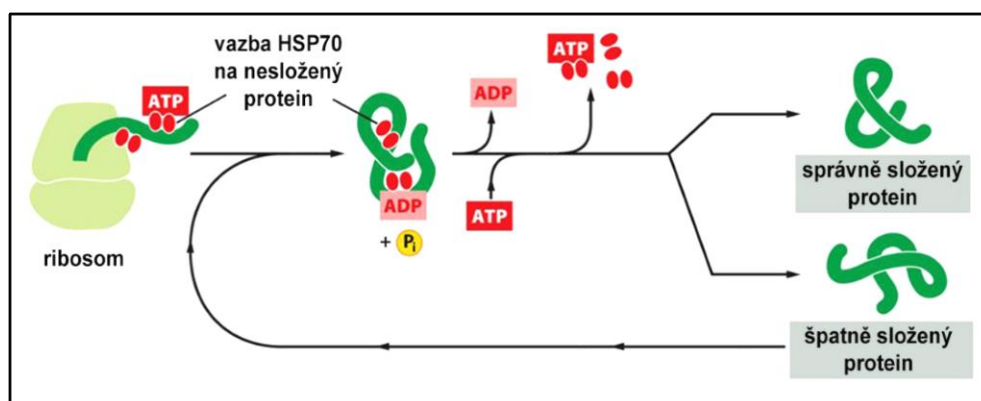
Zástupci rodiny HSP100 se účastní na degradaci nevratně poškozených polypeptidů. Ochranná funkce těchto chaperonů je výsledkem jejich schopnosti solubilizovat proteinové agregáty za účasti ATP ve spolupráci s chaperonovým systémem HSP70 (Park a Seo, 2015). Toto přetváření substrátu má mnoho funkcí, včetně regulace aktivity proteinových komplexů či rozkládání proteinů s cílem usnadnit funkci proteasam (Pegoraro *et al.*, 2011). Proteiny této rodiny jsou také studovány pro svou roli v termotoleranci (Park a Seo, 2015). Jestliže jsou rostlinné buňky vystaveny mírnému teplotnímu šoku, dostačujícímu ke zvýšení syntézy HSP a jejich akumulaci, jsou pak schopny odolat druhému teplotnímu šoku, který by byl pro ně jinak smrtelný. Dlouhodobé vystavení extrémním podmínkám sice může vést k buněčné smrti, avšak indukce HSP různými induktory může vést k toleranci k různým úrovním stresu a cytoprotekci (Wirth *et al.*, 2002). Přesný mechanismus, kterým HSP přispívají k termotoleranci, však není dosud jednoznačně objasněn (Wahid *et al.*, 2007).



Obr. 5: HSP70 jako molekulární chaperon. Za stresujících podmínek může dojít k poškození proteinu a může být buď agregován, a následně zlikvidován (vlevo dole), nebo může být stabilizován pomocí HSP70 molekulárního chaperonu (vpravo dole). Při aktivaci funkce HSP70 se těmto narušeným proteinům opět zlepší strukturální a funkční vlastnosti (upraveno podle Aufricht, 2005).

HSP90, jako nejhojnější zástupce cytosolové rodiny proteinů teplotního šoku u eukaryotických i prokaryotických buněk (Park a Seo, 2015) a jako jeden z nejhojnějších proteinů v buňce vůbec (1-2 % z celkových proteinů buňky) (Wahid *et al.*, 2007), je zodpovědný za znovusložení denaturované bílkoviny a za skládání nově syntetizovaných proteinů (Pegoraro *et al.*, 2011). Ke své funkci potřebuje ATP (Wang *et al.*, 2004). Je odlišný od mnoha jiných molekulárních chaperonů v tom, že většina jeho známých substrátů jsou signální transdukční proteiny, jako např. steroidní receptory a signální kinasy. HSP90 interaguje s 26S proteazomem a hraje hlavní roli v zajištění jeho terciální struktury (Wahid *et al.*, 2007).

Členové rodiny HSP70, jež je jednou z nejvíce konzervovaných tříd proteinů teplotního šoku, doprovázejí nově syntetizované proteiny, aby zabránili jejich předčasnému a špatnému skládání a jejich hromadění jako agregátů (Obr. 5). Zajišťují také správné složení proteinu během jejich přenosu do jejich cílové lokalizace (Park a Seo, 2015). U poškozených proteinů mají schopnost vázat se k hydrofobním a běžně skrytým doménám, které se postupnou denaturací proteinů odhalují, čímž zabraňují jejich shlukování. Vazba HSP70 na proteiny je podmíněna přítomností ATP. Jako kochaperony ve vazbě HSP70 na proteiny působí HSP40 (Obr. 6). Jsou zapojeny do degradace proteinů a do dalších buněčných signálních mechanismů. HSP70 je rozhodující pro buněčné přežití, což bylo dokázáno tím, že HSP70-knockoutovaná zvířata nejsou životaschopná (Aufrecht, 2005).



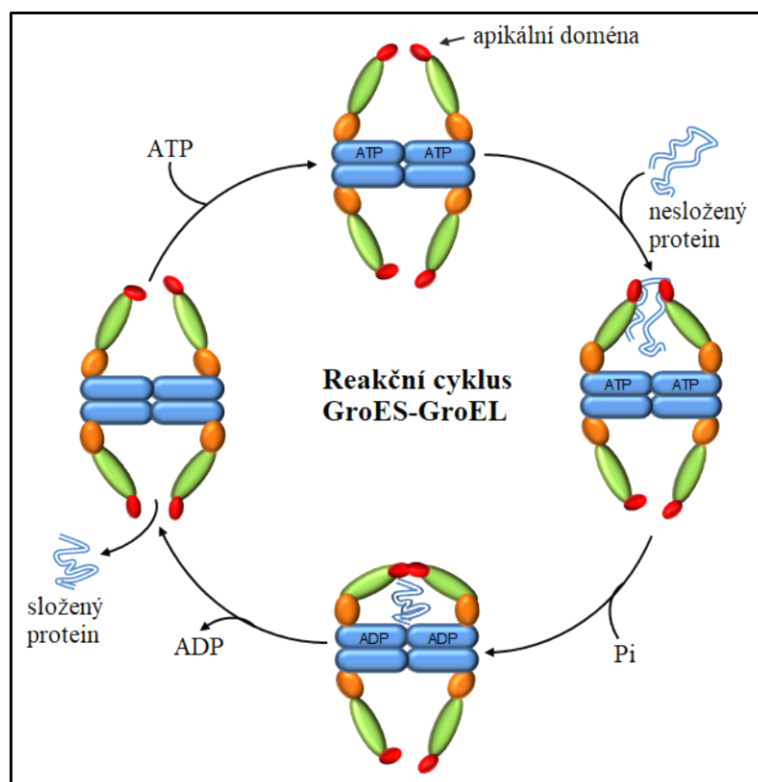
Obr. 6: Skládání proteinu pomocí HSP70. HSP70 proteiny rozpoznávají hydrofobní aminokyseliny na proteinu. Za pomoci menších HSP40, které nejsou znázorněny, se váže HSP70 za pomoci ATP na cílový protein, dochází k hydrolýze ATP na ADP a fosfát, což je doprovázeno konformačními změnami. Poté, co HSP40 oddisociují, se znovu rychle naváže ATP, což indukuje disociaci HSP70 a uvolnění ADP. Opakující se cykly navázání HSP a jejich uvolnění vedou ke správnému složení proteinu (upraveno podle Alberts, 2007).

HSP60 jsou chaperony, které napomáhají složení bílkovin a připojení podjednotek. Spolupracují s ostatními chaperony, zejména s HSP70 při buněčném transportu. Mitochondriální HSP60 jsou potřeba během klíčení nebo v jiných obdobích aktivního mitochondriálního dělení a vývoje, a chloroplastové HSP60 se zapojují do sestavy holoenzymu RUBISCO (Pegoraro *et al.*, 2011). Při jejich nedostatečné funkci nastává pomalý růst, opožděné kvetení, zakrnutí a listová chloróza (Wahid *et al.*, 2007). Jsou to chaperoniny složené z částí GroEL a GroES. Rozložené proteiny se svými hydrofobními zbytky váží na GroES, který protein enkapsuluje do hydrofobní dutiny a následuje velká konformační změna, kdy se váže GroEL. GroEL s GroES vytvoří uzavřený prostor, kde probíhá složení proteinu za pomoci ATP. Poté je protein z komplexu GroES-GroEL uvolněn (Yamamoto a Ando, 2016) (Obr.7).

Malé HSP (smHSP) proteiny jsou molekulární chaperony sloužící k prevenci nežádoucích vzájemných interakcí mezi proteiny a napomáhají opětovnému sbalení denaturovaných proteinů. smHSP zajišťují ochrannou funkci tím, že brání agregaci proteinů vyvolané zvýšenou teplotou (Park a Seo, 2015).

Je důležité zmínit, že chaperony neobsahují specifické informace pro správné skládání, ale spíše zabráňují neproduktivním interakcím. Zajišťují, že vznikající polypeptidy vycházející z ribozomu jsou uchovávány a skládány do příslušného stavu, dokud nebude k dispozici kompletní polypeptidová sekvence. Chaperonové proteiny však nejsou kovalentně vázány na svůj cíl, a nejsou součástí konečného produktu. Plně složené proteiny nemohou být translokovány přes membrány, proto jsou zapotřebí chaperony k udržení nebo vytvoření částečně rozložené formy proteinů určené pro přenos do mitochondrií a plastidů (Timperio *et al.*, 2008).

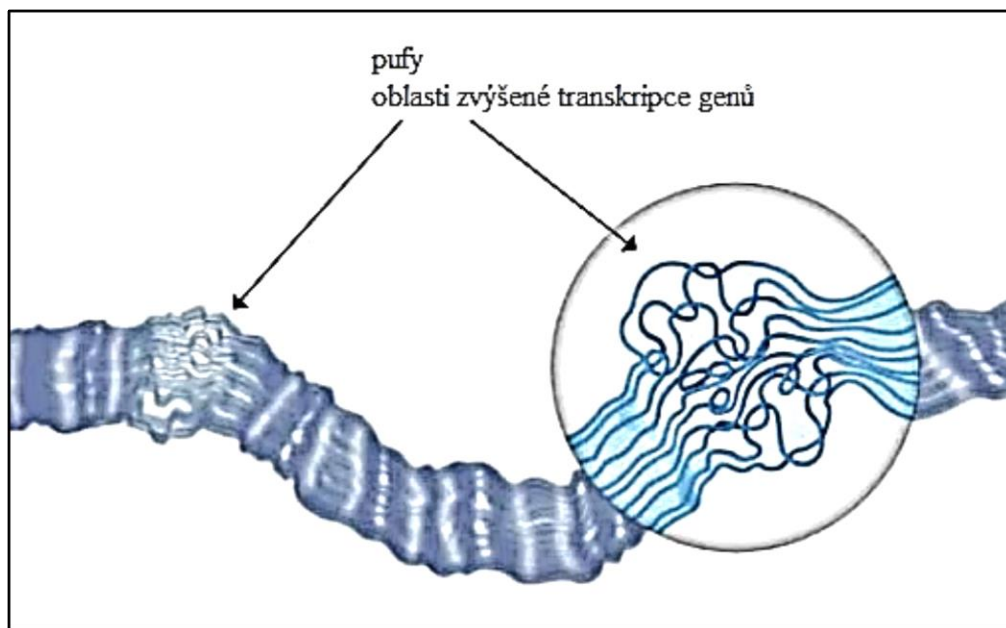
Jednotliví členové každé skupiny HSP mají zvláštní funkce, ale mnoho chaperonů působí společně a vytváří se tak síť HSP, které spolupracují při buněčné ochraně a hrají doplňkové a někdy překrývající se role v ochraně proteinů během stresových podmínek (Pegoraro *et al.*, 2011).



Obr. 7: Reakční cyklus proteinů GroES-GroEL. Rozbalené proteiny se svými hydrofobními zbytky váží na GroES, který protein enkapsuluje do hydrofobní dutiny a následuje velká konformační změna, kdy se váže GroEL. GroEL s GroES vytvoří uzavřený prostor, kde probíhá složení proteinu za pomoci ATP. Poté je protein z komplexu GroES-GroEL uvolněn (upraveno podle: <http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp60.php>).

2.1.5 Odpověď rostlin na teplotní stres

Reakce na stres byly studovány experimentálně už od poloviny 19. století, avšak důležitým mezníkem analýzy odpovědi na buněčný stres bylo v roce 1962 průkopnické dílo italského vývojového biologa Ferruccio Ritossa, který pracoval s octomilkou (*D. melanogaster*). Náhodně zvýšil při experimentech teplotu v inkubátoru a zaznamenal výrazné změny v pufech Balbianiho prstenců, tedy aktivity genů polytémních chromozomů v larválních slinných žlázách (Obr. 8). Ritossa objevil obecný systém odpovědi na teplotní stres (HSR), která je konzervovaná ve všech živých organismech od bakterií po eukaryota. V roce 1974, Tissieres a jeho spolupracovníci identifikovali proteiny teplotního šoku (Baniwal *et al.*, 2004).



Obr. 8: Ritossovy pufy. F. Ritossa sledoval místa zvýšené transkripce genů teplotního šoku (pufy) pod světelným mikroskopem na polyténických chromosomech v larválních slinných žlázách octomilky (*D. melanogaster*) (upraveno podle Morimoto, 2010).

HSR je tedy definována jako přechodné přeprogramování exprese genů v důsledku zvýšené teploty, kdy se začnou syntetizovat HSP, a následně organismus může získat vyšší úroveň termotolerance. Některé HSP mohou být indukovány také chladem (Reis *et al.*, 2012). HSR je v současnosti u rostlin intenzivně studována, avšak mnoho otázek zůstává stále nezodpovězených (Pegoraro *et al.*, 2011).

Tolerance tepla je obecně definována jako schopnost rostliny růst a produkovat hospodářský výnos za vysokých teplot a může jí být dosaženo předběžnou expozicí rostlin mírně zvýšeným teplotám (Larkindale a Knight, 2002). Tolerance založená na účinku HSP má za následek zlepšení fyziologických parametrů, jako jsou fotosyntéza, dělení, účinnost využívání vody a živin a stabilita membrány (Wahid *et al.*, 2007). Vývoj rostlin se zvýšenou tolerancí tepla je velmi důležitý vzhledem k současným a očekávaným klimatickým změnám, které mají způsobit postupný nárůst okolní teploty a zvýšit frekvenci a amplitudu teplotních období (Pegoraro *et al.*, 2011). U některých druhů rostlin, je tolerance tepla často spojována s některými nežádoucími zahradnickými nebo agronomickými vlastnostmi. U rajčat jsou pozorovány běžně dvě nežádoucí charakteristiky v teplotně tolerantních genotypích, kterými jsou malé plody a redukce listového vrchlíku (Wahid *et al.*, 2007).

2.1.6 Funkce HSP při patogenezi

Choroby rostlin způsobené virem dávají vzniknout obrovským nákladům pro pěstitele. Rostlinné patogenní viry způsobují řadu ekonomicky důležitých onemocnění u rostlin, a tím následně omezují produkci potravin a biopaliv po celém světě. Časté symptomy infekce virem u rostlin jsou chloróza a omezení fotosyntézy, nekróza, proliferace tkáně, zkroucení listů a další fyziologické změny (Alexander a Cilia, 2016).

Viry jsou závislé na replikaci hostitele, vnitrobuněčném a mezibuněčném pohybu. Jejich genomy jsou malé, někdy kódující méně než deset proteinů. Jejich úkolem je potlačovat obranu hostitele, využívat jeho proteosyntézu, protože jí samy nejsou schopny a zajistit příznivé prostředí pro svou replikaci. Vzhledem k bariéře buněčné stěny hostitelské buňky vyžadují rostlinné patogenní viry cizí pomoc, aby infikovaly svého nového hostitele. Mechanicky přenosné viry infikují nového hostitele prostřednictvím býložravců při kontaktu s ranou. Jiné viry vyžadují vektor pro svůj přenos do buňky. Mezi nejhojnější vektory přenášející rostlinné viry patří mšice, molice, a křískovití. Některé viry jsou přenášeny i brouky, háďátky, roztoči (Alexander a Cilia, 2016).

Po vstupu do rostlinné buňky, se musí virus přenést do replikačního místa, kterým může být jádro (pro viry s DNA genomy) nebo cytoplazmatická membrána (pro viry s RNA genomy). K přenosu do vzdálených oblastí rostlin a k dosažení systémové infekce využívají viry lýko (Alexander a Cilia, 2016).

Odpovědi hostitele na virové infekce se mohou obecně dělit na dva způsoby. Prvním způsobem dělení je na kompatibilní a nekompatibilní odpověď hostitelské buňky. Kompatibilní reakcí je úspěšná virová infekce, tedy replikace a rozšíření na jiné buňky. Nekompatibilní reakce nastane, když je virus rozpoznán hostitelem, což má za následek hypersenzitivní odpověď (HR), což je ve skutečnosti lokalizovaná programovaná buněčná smrt, která zabrání šíření viru. Odpověď hostitele se může také dělit v závislosti na tom, zda je vir schopen vyvolat onemocnění v daném hostiteli, tedy je-li hostitelská buňka citlivá či rezistentní vůči patogenu. Citlivá reakce vede k nemoci a replikaci viru a vzniku symptomů u hostitele. Rezistentní reakce nevede k tvorbě symptomů. Někdy může být hostitel částečně rezistentní, a to v případě, jestliže je virus schopen způsobit lehčí průběh nemoci ve srovnání s citlivými hostiteli (Alexander a Cilia, 2016).

Po rozpoznání patogenu rostliny aktivují obranné mechanismy. Součástí obranných reakcí rostliny může být, kromě akumulace antimikrobiálních látek a proteinů souvisejících s patogenezi (PR-proteiny), složitá hypersenzitivní odpověď, která se

vyznačuje apoptózou a tvorbou nekrotických lézí k zajištění zadržení patogenů (Cronje *et al.*, 2004). Rostlinná HR sdílí mnoho cytologických rysů s apoptózou živočichů, nejvýrazněji v mitochondriálních změnách. Proces apoptózy a s ním asociované vápenaté influxy a oxidativní stres vedou k propustnosti pórů mitochondrií a uvolňování cytochromu c. U živočichů dochází k vazbě uvolněného cytochromu c na protein Apaf1. Cytochrom c/Apaf1 díky dATP oligomerizuje a vzniká složitý komplex – apoptosom. Apoptosom je schopen vázat prokaspasu 9 a převést ji do aktivního stavu. Kaspasa 9 následně aktivuje další kaspasy podílející se na buněčné smrti. U rostlin je však dosud spojení mezi uvolněním cytochromu c a mechanismem buněčné smrti nejasné, protože rostlinný genový homolog Apaf1, ani rostlinné kaspasy se zatím nepodařilo objevit. Nicméně existují nepřímé důkazy kaspasové aktivity v rostlinách, jelikož transgenní rostliny exprimující proteinové inhibitory kaspasy p35 vykazují potlačenou HR (Mur *et al.*, 2006). Mezi další charakteristické znaky apoptózy u zvířat i rostlin patří fragmentace DNA, cytoplazmatická a nukleární kondenzace či translokace fosfatidylserinu na vnější stranu plazmatické membrány (Cronje *et al.*, 2004).

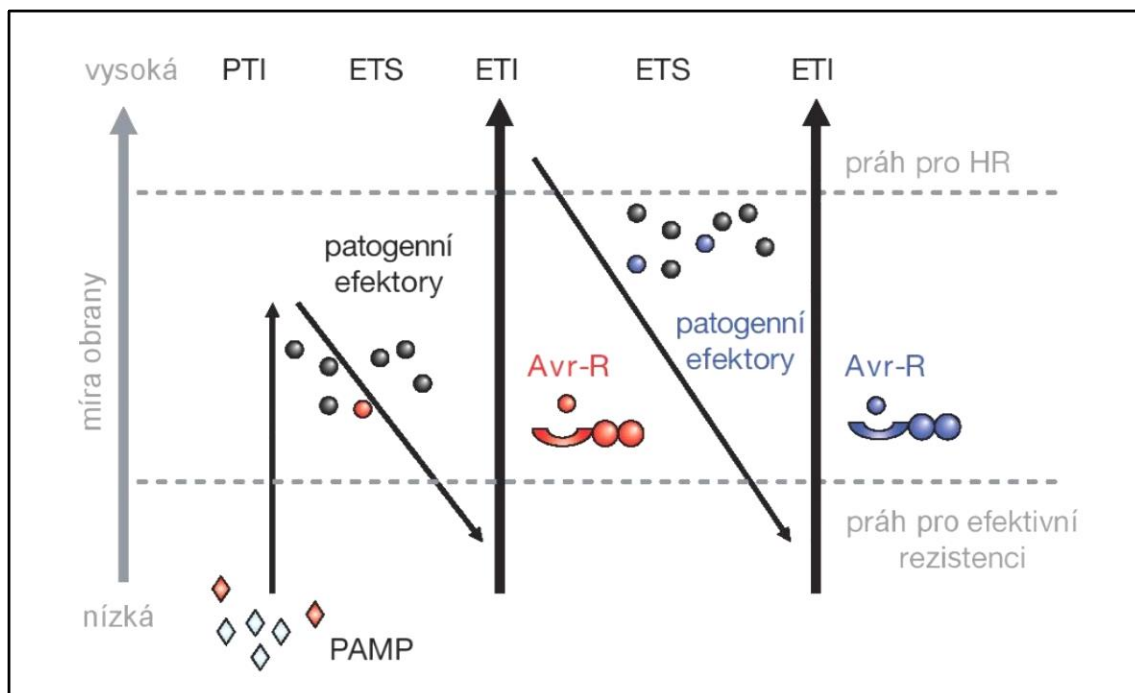
Během HR probíhá zvýšená syntéza proteinů spojených s odpovědí na patogenezí (PR-proteiny) v infikovaných listech. PR-proteiny jsou následně exprimovány i v nenakažených částech rostliny, souběžně s vývojem dlouhotrvající, široce založené rezistence známé jako systémová získaná rezistence (SAR). Zvýšená exprese PR-genů se často používá jako marker pro SAR (Klessig *et al.*, 2000). Níže je popsáno několik rodin těchto proteinů.

PR-2 proteiny, tedy beta-1,3-glukanasy, hydrolyzují kalosu, a fungují v obraně proti patogenům především tím, že regulují velikost plasmodesmat (Alexander a Cilia, 2016).

Další skupinou obranných proteinů jsou chitinasy, tedy enzymy, které štěpí chitin. Třídy PR-3, 4 a 8, zahrnují proteiny s chitinasovou aktivitou a mají hlavní funkci v obraně proti houbám a hmyzu (Alexander a Cilia, 2016).

PR-5 proteiny se řadí mezi thaumatiny s antimykotickými vlastnostmi, a jsou také spojeny s osmotickým stresem. I když dosud nebyla zjištěna žádná úloha těchto proteinů při virové infekci, je možné, že existuje neobjevená funkce, nebo že se může virová signalizace překrývat s antimykotickou signalizací (Alexander a Cilia, 2016).

PR-15, neboli oxalát oxidasy, katalyzují degradaci šťavelanu na peroxid vodíku. Jako poslední jsou uvedeny proteiny podobné germinu, spadající do třídy PR-16, neboli GLP, které mají role v obraně proti širokému spektru rostlinných patogenů (Alexander a Cilia, 2016).



Obr. 9: Rostlinný imunitní systém. Rostliny nejprve detekují patogenní molekulární vzorce (PAMP) pomocí receptorů PRR a je spuštěna patogenem vyvolaná imunita (PTI). V další fázi úspěšné patogeny produkují efekторы, proti kterým se rostliny brání R-proteiny, které reagují s produkty kódovanými geny avirulence (Avr-R). PTI – imunita vyvolaná patogenem, ETS – efekторы řízená vnímavost, ETI – imunita vyvolaná efekторы (upraveno podle Jones a Dangl, 2006).

Rostliny reagují na invazi patogenů pomocí dvou vrozených imunitních systémů, a to PAMP-vyvolané imunity (PTI), a dále pomocí efektořem spuštěné imunity (ETI). Rostliny obsahují receptory (PRR – pattern recognition particles), které rozpoznávají patogenní molekulární struktury typické pro povrch patogenních organismů (PAMP). Tyto rostlinné receptory spouští po napadení patogenem a jeho rozpoznání rostlinné obranné reakce, jimiž jsou imunitní odpověď PTI (imunita vyvolaná patogenem), která vede k širokospektrální rezistenci rostliny. Patogen se snaží obcházet tyto obranné reakce pomocí efektořů, což jsou molekuly patogenů, jejichž úkolem je zablokovat imunitní systém a snížit tak odolnost rostliny. V případě, že efektořer patogenu potlačí imunitní odpověď typu PTI, může nastat další odpověď imunitního systému rostliny ETI (imunita vyvolaná efektořer), díky níž se rostliny mohou bránit proti efektořer geny rezistence R, které reagují se specifickými geny avirulence (Avr) patogenu a zvýší opět odolnost rostliny (Obr. 9). R-proteiny v podstatě působí jako receptory pro vysoce variabilní efektořer patogenů. Většina R-genů kóduje intracelulární proteiny bohaté

na aminokyselinu leucin (Park a Seo, 2015). Selhání tohoto rozpoznávacího systému umožňuje rozvoj nemoci (Mur *et al.*, 2006).

Jestliže jsou viry schopny se úspěšně namnožit, pak využívají k přesunu z buňky do buňky své virové pohybové proteiny (MP). Jejich přemístění do zatím zdravé buňky probíhá přes specializovaná propojení mezi endoplasmatickými retikuly jednotlivých buněk, která se nazývají plasmodesmata. U přenosu viru mozaiky kvěťáku bylo pozorováno dokonce využití buněčného cytoskeletu, tedy dynamické sítě mikrotubulů a mikrovláken. Častěji jsou ovšem tyto přenosy pozorovány u živočišných virů (Alexander a Cilia, 2016).

V poslední době rostlinné HSP získaly značnou pozornost vzhledem ke své nové funkci v přirozené imunitě. Dnes je nejlépe charakterizována funkce HSP90 v rostlinné imunitě. Jako pozitivní regulátor rostlinné imunity může tento protein přímo interagovat s cytosolovými R-proteiny a aktivovat je (Park a Seo, 2015).

Vložením R-genů do náchylných kultivarů hostitelských rostlin lze dosáhnout rezistence rostliny proti patogenům produkujícím odpovídající efektor. R-geny jsou proto často přenášeny z planě rostoucích rezistentních rostlin do vhodných kultivarů téhož druhu, čímž je problém redukce výnosů díky patogenezí eliminován (Park a Seo, 2015).

V mnoha patosystémech bylo prokázáno, že hostitelská odolnost nebo citlivost může být ovlivněna teplotou. Působení teploty na hostitelské rostliny může vést k rozvoji rezistence. Teplo, a především chlad u hostitelských rostlin inhibuje patogenezí. V předchozích experimentech bylo prokázáno významné zpomalení vývoje patogenu (padlí) po předchozím vystavení rostlin rajčete chladovým podmínkám 4 °C (Kubienová *et al.*, 2013a).

Teplotní stres minimálně ovlivnil vývoj patogenů u genotypu rajčete *S. chmielewskii*, který je méně citlivý na změny teplot, a významně potlačil vývoj patogenů u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur, který je vůči teplotním změnám více vnímavý. Při zvýšené akumulaci HSP70 u teplotně senzitivnějšího genotypu rajčete byly pravděpodobně tyto proteiny využity k ochraně rostliny před patogenem, což činilo tuto rostlinu více rezistentní než rostlinu teplotně méně senzitivní s menším množstvím HSP70 (Kubienová *et al.*, 2013a).

2.1.6.1 Signální dráhy regulující tvorbu rostlinných HSP při patogenním stresu

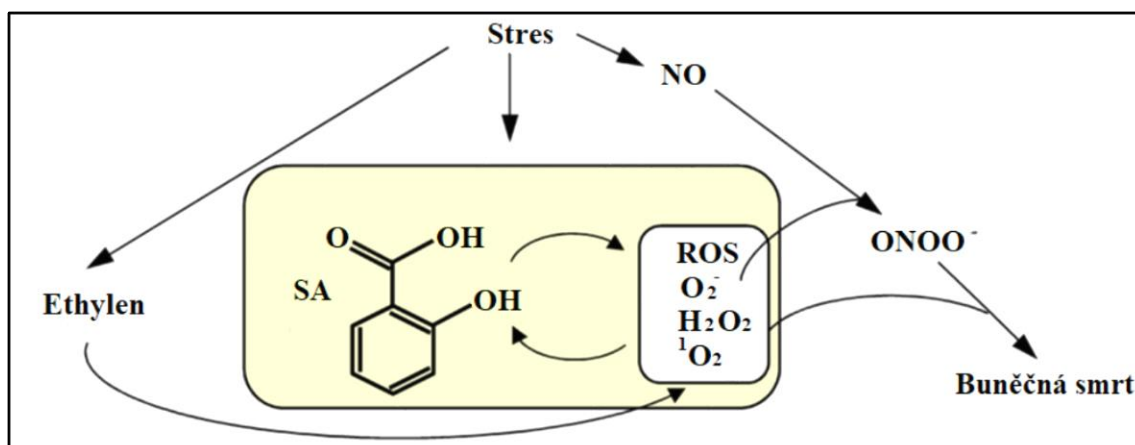
Indukce mechanismů obrany rostlin v odezvě na stresové podněty je zprostředkována několika signálními drahami. Bylo prokázáno, že reaktivní formy kyslíku (ROS), reaktivní formy dusíku (RNS) a kyselina salicylová (SA) jsou klíčovými složkami reakce stresu rostlin na různé biotické stresy (Piterková *et al.*, 2013).

ROS působí jako signály aktivující transkripci obranných genů včetně genů kódujících PR-proteiny. Při napadení rostliny patogenem se mohou akumulující se ROS přímo podílet na zesílení buněčné stěny prostřednictvím zesíťování glykoproteinů a vytvořit tak mechanickou bariéru k dalšímu vniku patogenů do buňky. Regulační funkce ROS v obraně jsou spojeny s dalšími rostlinnými signálními molekulami, zvláště kyselinou salicylovou a oxidem dusnatým. Akumulace kyseliny salicylové (SA) zesiluje odpovědi rezistence zvýšením akumulace ROS tak, že má schopnost regulovat aktivity antioxidantních enzymů vychytávajících ROS, jako jsou katalasa (EC 1.11.1.6) či askorbátperoxidasa (EC 1.11.1.11). ROS jsou těmito antioxidantními enzymy méně likvidovány, což vede k aktivaci obrany proti infekci patogenem (Cronje a Bornman, 2004). ROS působí synergicky s SA při zesilování systémově získané rezistence (SAR) a zároveň i při řízení HR (Torres *et al.*, 2006).

ROS signalizace je také spojována s NO, dalším reaktivním radikálem produkovaným po rozpoznání patogenů. NO působí synergicky s ROS při potenciaci buněčné smrti indukované patogenem a pozitivně se také podílejí na akumulaci SA (Klessig *et al.*, 2000).

Zdá se, že se tyto signály zesilují navzájem (Obr. 10). Výše uvedené látky se u rostlin podílejí na rozvoji HR, během které dochází k nekróze buněk infikovaných patogenem. Apoptóza infikovaných a nejbližších okolních buněk zamezí patogenu rozšířit se do zdravých tkání. V rostlinných i živočišných buňkách spolupracuje NO a ROS na regulaci apoptózy, kdy se jejich interakcí produkuje peroxonitrit, vysoce reaktivní sloučenina, jež likviduje patogenem infikované buňky. Účinky NO jsou umocňovány SA, která zvyšuje aktivitu enzymů syntetizujících NO (Khan *et al.*, 2015). Velké množství studií uvádí, že současná aplikace SA a NO na rostlinu také výrazně snižuje škodlivé účinky některých abiotických stresů (Namdjoyan *et al.*, 2017).

SA indukuje produkci H_2O_2 , a zároveň H_2O_2 moduluje biosyntézu SA během biotických a abiotických stresů. Taktéž NO moduluje hladiny H_2O_2 a H_2O_2 pozitivně



Obr. 10: Propojení signálních drah ROS, NO a SA (upraveno podle Miura a Tada, 2014).

působí na syntézu a akumulaci NO. SA může zesilovat účinky NO změnou aktivity různých enzymů regulovaných NO, jako jsou askorbátperoxidasa nebo katalasa. Ošetření rostlin H₂O₂ a SA indukuje produkci NO, který pak hraje důležitou roli v ochraně rostlin proti oxidačnímu vzplanutí tím, že indukuje antioxidantní ochranné enzymy (Mostofa *et al.*, 2015).

Studium propojení drah těchto signálních molekul je v současnosti pro biochemii velkou výzvou (Mostofa *et al.*, 2015).

Signální reakcí na teplotní stres je prudký nárůst koncentrace cytosolového Ca²⁺. Vzrůstající cytosolový obsah Ca²⁺ při teplotním stresu může zmírnit poškození zajištěním zvýšené aktivity antioxidantů, čímž je umožněno rostlinným buňkám lépe přežít. Influx Ca²⁺ je pravděpodobně úzce spojen s expresí HSP. Avšak některé studie naznačují, že Ca²⁺ naopak není nutný pro produkci HSP v rostlinách. Nadměrné uvolnění vápenatých iontů do cytosolu a trvale vysoké cytosolové koncentrace Ca²⁺ mohou být cytotoxické (Wahid *et al.*, 2007).

Mezi specifické geny exprimované v odpovědi na různé stresové podněty patří taktéž geny proteinů teplotního šoku (HSP). NO i ROS se podílejí na regulaci produkce a akumulace HSP70 při abiotickém a biotickém stresu. NO indukuje buněčnou obranu a potlačuje apoptózu stimulací akumulace HSP70 v reakci na patogenní infekci padlím. NO indukovaná exprese HSP70 zabraňuje produkci ROS ve vysokých koncentracích, což vede k omezení peroxidace lipidů a oxidačnímu poškození v buňkách (Cronje *et al.*, 2004).

Vliv NO na produkci HSP70 byl potvrzen v experimentech s lapačem NO – cPTIO, kdy byla u rajčete významně snížena akumulace HSP70, zejména ve vzorcích listů vystavených kombinaci biotických a abiotických stresů (Piterková *et al.*, 2013).

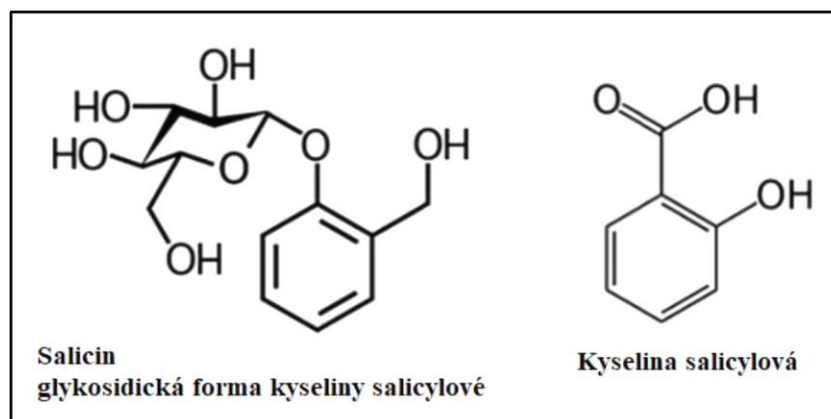
Akumulace HSP70 díky NO a ROS může souviset se signalizací kyseliny salicylové, která představuje rostlinný hormon s klíčovou rolí v odpovědi rostlin vůči patogenům (Piterková *et al.*, 2013). Bylo prokázáno, že reakce na onemocnění zprostředkovaná kyselinou salicylovou zahrnuje zvýšenou produkci NO a aktivaci NO-závislých signálních drah. U tabákových protoplastů inokulovaných patogenem a inkubovaných za normálních teplot nemá SA žádný vliv na akumulaci HSP70 a indukuje apoptózu, zatímco SA v kombinaci s teplotním stresem způsobuje hromadění HSP70, což zabraňuje apoptóze protoplastů. HSP70 působí jako látka potlačující apoptózu za zvýšených teplot během patogenního stresu (Cronje *et al.*, 2004).

2.1.7 Kyselina salicylová (SA)

Kyselina salicylová (SA) je fenolová sloučenina (Obr. 11), která ovlivňuje řadu fyziologických procesů v rostlinách, včetně termogeneze, syntézy ethylenu a zrání ovoce. Hraje roli v odpovědi rostlin na různé abiotické stresy, jako jsou UV záření a ozon. Úloha SA při patogenním útoku je obzvláště důležitá, a to jak v rozvoji lokální reakce na patogen, tak systémově získané rezistenci (SAR) (Mur *et al.*, 2006).

Při lokální reakci na patogen se SA v rostlině značně hromadí v místě infekce po zachycení patogenních avirulentních signálů, které jsou příčinou akumulace kyslíkových radikálů. Je indukována hypersenzitivní odpověď zahrnující lokalizovanou nekrotickou smrt rostlinných buněk, která omezuje pronikání patogenu z místa infekce, zabraňuje jeho dalšímu šíření a přísunu živin (Cronje a Bornman, 1999).

SAR je forma celkové rostlinné imunity organismu, která je účinná proti široké řadě patogenů. SAR je nezávislá na interakci genů *avr-R*. Je spojena se systémovou expresí genů, jako jsou PR proteiny (Mur *et al.*, 2006). Po inokulaci listů mikroorganismem, který je schopen indukovat SAR, se SA hromadí ve velmi vysokých koncentracích v listech, stonku, ale i v kořenech, kde SA dosahuje koncentrace vyšší než v tkáni v blízkosti místa infekce (Zottini *et al.*, 2007).

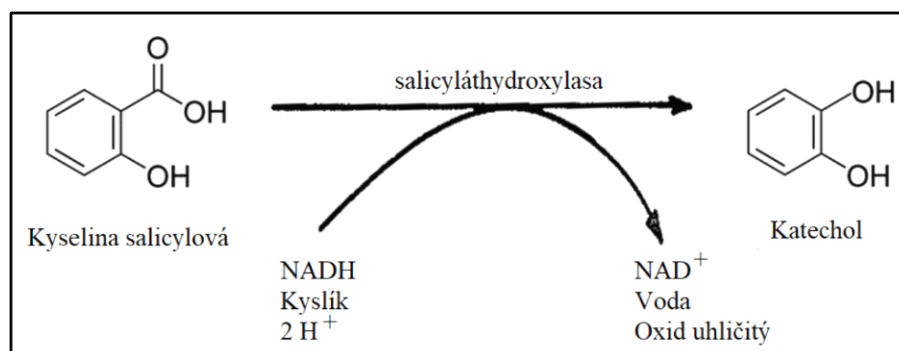


Obr. 11: Strukturální vzorec salicinu a kyseliny salicylové (upraveno podle Juurling *et al.*, 2014).

SA zabraňuje oxidačnímu poškození prostřednictvím detoxikace peroxidových radikálů a zabraňuje poškození membrán v rostlinách. Z tohoto důvodu, SA může zvýšit teplotní odolnost a zvýšit tak úrodu. Použití SA u rostlin zvyšuje antioxidační kapacitu (kapacita absorbovat volné radikály kyslíku) (Qu *et al.*, 2013).

Salicyláty umocňují indukci HSP70 v odpovědi na teplotní stres u savců i u rostlin a zlepšují termotoleranci. Při samotném působení SA na rostlinu je aktivována vazba HSF na DNA, ale nedochází k indukci HSP70. Nedochází ke zvyšování exprese HSFA2 a HSFB1, ale je umocněna exprese HSFA1. Při samotném teplotním šoku dochází k vazbě HSF na DNA a ke zvýšené expresi HSFA1, HSFA2 a HSFB1. SA v kombinaci s teplotním stresem zesiluje indukci HSP tím, že dokáže aktivovat HSF a zvyšuje trvání vazby HSF na DNA více než u samotného teplotního stresu (Snyman a Cronje, 2008). Exprimované HSP70 poté potlačují apoptózu buněk za zvýšené teploty během patogenní infekce. Naopak za normálních teplotních podmínek je apoptóza u rostlin kyselinou salicylovou indukována (Cronje *et al.*, 2004).

Je nutno dodat, že nadměrná rezistence buněk k apoptóze během teplotního stresu a současná patogenní infekce může být pro přežití hostitelského organismu spíše nevýhodná, protože patogen může získat přístup do dalších, zdravých tkání (Cronje *et al.*, 2004).



Obr. 12: Přeměna kyseliny salicylové na katechol salicyláthydroxylasou. Kyselina salicylová je převedena enzymem NahG na katechol odstraněním karboxylové skupiny v pozici 1 a jejím nahrazením hydroxylovou skupinou (Ambrose *et al.*, 2015).

2.1.7.1 Využití transgenních nahG rostlin při studiu úlohy SA

Rostliny označované jako nahG konstitutivně exprimují transgen pro bakteriální enzym salicyláthydroxylasu z *Pseudomonas putida*, která metabolizuje kyselinu salicylovou na katechol. Mnohé studie experimentují s touto rostlinou, aby objasnily role kyseliny salicylové v rostlinné signalizaci. Vědecký zájem o úlohu kyseliny salicylové je velký, protože je tato látka zapojena do rezistence rostlin vůči onemocnění, exprese genů souvisejících s patogenezi a hypersenzitivní odpovědi (Morse *et al.*, 2007).

Exogenní aplikace SA chrání rostliny proti určitým patogenům a aktivuje expresi charakteristické sady genů souvisejících s obranou, včetně těch, které kódují PR-proteiny (Wees a Glazebrook, 2003).

V transgenních rostlinách *A. thaliana* zabraňuje exprese *NahG* akumulaci SA katalyzováním oxidativní dekarboxylace SA na katechol (Obr. 12) což vede ke zvýšené náchylnosti nahG rostlin k různým druhům hub, bakteriím, oomycetám a virům. Je také výrazně omezena exprese PR-genů, což vede k závěru, že kyselina salicylová je významnou látkou v obranných reakcích rostlin (Choudhary *et al.*, 2016).

Snížená obranyschopnost vůči patogenu *P. infestans* byla zaznamenána také u nahG brambory (*Solanum tuberosum*) v porovnání s divokým typem rostliny. Velikost lézí transgenní rostliny nebyla sice příliš odlišná od divokého typu, ale mutant exprimoval výrazně méně obranných genů. Po předcházejícím ošetření nahG rostlin kyselinou salicylovou byl růst patogenu podobný jako u divokého typu, což naznačuje důležitost SA pro obranu brambor proti *P. infestans* (Halim *et al.*, 2007).

Podle některých studií je ovšem pravděpodobné, že nízká odolnost nahG rostlin vůči patogenním chorobám není ovlivněna pouze sníženou hladinou SA, ale i dalšími, zatím necharakterizovanými účinky (Wees a Glazebrook, 2003).

Produkce katecholu může také vysvětlovat náchylnost nahG rostlin k patogenům. Katechol byl u živočichů popsán jako karcinogenní látka. Způsobuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), zejména H_2O_2 , a tím způsobuje poškození DNA štěpením fosfátového deoxyribosového řetězce a modifikací bází (Schweigert *et al.*, 2001).

H_2O_2 je obecně považován za pozitivní regulátor rezistence vůči patogenům. Podílí se na zesíťování komponent buněčné stěny, které tvoří mechanickou bariéru pro penetraci hub a pro difúzi toxinů a enzymů degradujících buněčné stěny. H_2O_2 může také působit jako signál vyvolávající expresi obranných genů. Nicméně může také indukovat peroxidaci lipidů a poškození DNA v rostlinách, což by mohlo negativně ovlivnit obrannou signalizaci nebo ohrozit životaschopnost buněk. Účinek H_2O_2 závisí na načasování, umístění a množství jeho produkce (Wees a Glazebrook, 2003).

Předpokládá se, že existují rozdíly v produkci H_2O_2 po patogenní infekci u rostlin bez *NahG* nebo po akumulaci katecholu v transgenních rostlinách s *NahG*. V prvním případě je akumulace H_2O_2 součástí mechanismu obrany. Současně s produkcí H_2O_2 indukovanou avirulentními patogeny je aktivován velmi účinný antioxidační systém enzymů katalasy, glutathiontransferasy a askorbátperoxidasy, aby se H_2O_2 rozložil dostatečně rychle a nedošlo k oxidačnímu poškození. Akumulace H_2O_2 v důsledku aktivity *NahG* může narušit antioxidační obranu rostliny, která není součástí obranné odpovědi vůči patogenům, což může vést k oxidačnímu poškození. To by mohlo narušit obrannou signalizaci, která by mohla ovlivnit rezistenci (Wees a Glazebrook, 2003).

Lokalizace produkce H_2O_2 může být u transgenních rostlin s *NahG* genem rozdílná. Při odpovědi na patogenní útok je H_2O_2 syntetizován NADPH oxidasou v plazmatické membráně a následně je uvolňován do apoplastu. Degradace SA na katechol účinkem salicyláthydroxylasy pravděpodobně probíhá v cytoplazmě, ale lokalizace následné produkce H_2O_2 není zatím známa. H_2O_2 může mít různé účinky v závislosti na místě produkce (Wees a Glazebrook, 2003).

Fenotyp nahG rostlin podle závěru této studie není způsoben nízkými hladinami SA, ale spíše procesem katabolismu kyseliny salicylové prostřednictvím enzymu *NahG* (Wees a Glazebrook, 2003).

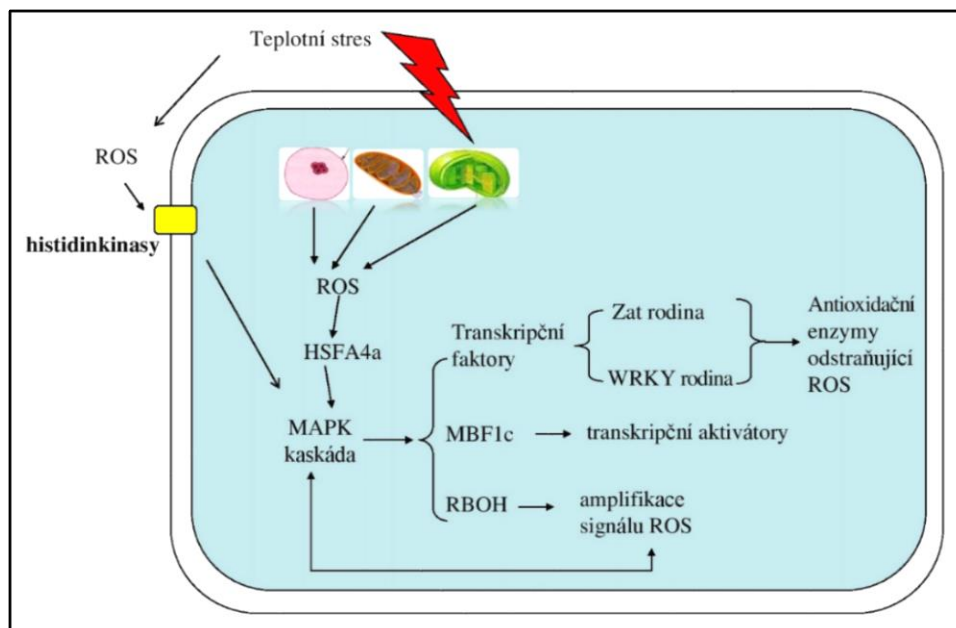
2.1.8 Úloha reaktivních forem kyslíku (ROS) při teplotním stresu

Oxidační stres je produkován jako sekundární stres v průběhu odpovědi rostlin na teplotní stres. Teplotní stres způsobuje přerušení některých metabolických drah, což vede k hojně produkci reaktivních forem kyslíku (ROS). Akumulace ROS během teplotního stresu je zprostředkována specifickými enzymy produkujícími ROS, kterými jsou NADPH oxidasy. ROS v nižších koncentracích mohou mít také pozitivní účinek na buňku, účastní se obranné signalizace při biotickém či abiotickém stresu, působí jako místní mikrobicid nebo jsou zapojeny v posílení buněčných stěn. (Mittler *et al.*, 2012).

Nicméně, vysoce reaktivní povaha ROS způsobuje jejich škodlivý vliv na buněčné membrány a proteiny rostlinných buněk (Alexander a Cilia, 2016). ROS zapříčiňují autokatalytickou peroxidaci membránových lipidů a pigmentů, což vede ke ztrátě semipermeability membrán a modifikacím jejich funkce (Wahid *et al.*, 2007).

V rostlinách je akumulace H_2O_2 , nejznámějšího zástupce ROS, velmi rychlým procesem. Mezi další zástupce ROS se řadí singletový kyslík (1O_2), superoxidový radikál (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylové radikály (OH^\cdot) (Wahid *et al.*, 2007). Signál přítomnosti oxidativního stresu je zprostředkován přes histidinkinasy a HSF. HSFA4a působí jako senzor H_2O_2 signálu. HSFA5 je negativní regulon této dráhy. Signál ROS je přenášen prostřednictvím signální dráhy mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK). MAPK aktivuje a indukuje expresi transkripčních faktorů, MBF1c a RBOH. Transkripční faktory, včetně rodiny Zat a WRKY indukují expresi antioxidantních enzymů (Qu *et al.*, 2013) (Obr. 13).

Fotosyntéza je také pevně spojena s produkcí reaktivních forem kyslíku. Chloroplasty jsou primárním místem produkce ROS v rostlinách. Během fotosyntézy může být produkovaný kyslík redukován elektrony pocházejícími z elektronového transportního řetězce za tvorby superoxidu. Za normálních podmínek jsou superoxid a další vedlejší škodlivé produkty fotosyntézy detoxikovány antioxidantními enzymy, kterými jsou např.: superoxidodismutasy, katalasy, peroxidasy a thioredoxiny. Nicméně, v podmínkách biotického nebo abiotického stresu se ROS mohou tvořit účelně, protože jsou důležité pro obranu a stresové reakce. V případech, kdy je spuštěna HR, jsou ROS klíčovou součástí signální dráhy buněčné smrti. Mají totiž schopnost zvýšit propustnost lysosomových membrán, čímž se uvolňují catepsiny a dochází k aktivaci kaspas (Alexander a Cilia, 2016).

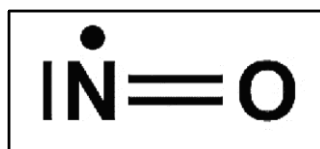


Obr. 13: Odezva ROS při teplotním stresu rostlin. Během teplotního stresu se hromadí endogenní a exogenní ROS. Exogenní ROS jsou vnímány prostřednictvím histidinkinasy, zatímco HSF4a působí jako senzory endogenních ROS. Následně se signál MAPK dráhy aktivuje a indukuje expresi transkripčních faktorů, MBF1c (multiproteinový přemostňující faktor – transkripční koaktivátor) a RBOH (geny kódující membránové NADPH-oxidasy produkující ROS). Transkripční faktory, včetně rodiny Zat a WRKY, indukují expresi antioxidačních enzymů (upraveno podle Qu *et al.*, 2013).

Obranné odezvy rostlin spojené s ROS jsou podobné se zánětlivými a imunitními reakcemi zvířat, kde je NO důležitá signální molekula. Je stále zkoumáno, zda neslouží podobnou funkcí i v rostlinách. Vztah mezi ROS a HSP pravděpodobně existuje, a potvrzuje to hypotézu, že v průběhu vývoje byly rostliny schopny dosáhnout vysokého stupně kontroly nad toxicitou ROS a v současné době rostliny využívají ROS jako signální molekuly k produkci HSP (Timperio *et al.*, 2008).

2.1.9 Úloha reaktivních forem dusíku (RNS) při teplotním stresu

Oxid dusnatý (NO), zástupce reaktivních dusíkových radikálů (RNS), je volným radikálem a velmi reaktivní molekulou vzhledem k přítomnosti nepárového elektronu (Obr. 14). Oxid dusnatý je pozoruhodný svou mobilitou, jelikož se dokáže pohybovat volně přes membrány, má velmi nízkou rozpustnost ve vodných roztocích a může snadno vstoupit do plynné fáze. To výrazně zvyšuje její potenciál signální látky (Mur *et al.*, 2006).



Obr. 14: Strukturální vzorec oxidu dusnatého.

NO je v poslední době věnován značný zájem rostlinných patologů z důvodu jeho známé role v regulaci savčí antimikrobiální obrany, a zvláště pak při hypersenzitivní reakci při infekci rostlin bakteriemi a viry (Neill *et al.*, 2002).

Signální dráhy NO vedoucí k expresi obranných genů v rostlinách se zdají být podobné těm, které jsou popsány u živočichů, kde působí často NO prostřednictvím cGMP-dependentní dráhy. V této dráze NO aktivuje guanylátcyklázu, což vede k přechodnému zvýšení druhého posla cGMP. Zvýšené cGMP zvyšuje aktivitu kinas, které umožňují přenos signálu do jádra buňky. Jeden z dobře popsaných cílů kinasy u živočichů je lehký řetězec myosinu, což vede k relaxaci hladkého svalstva a vazodilataci (Mur *et al.*, 2006).

Kromě toho, že NO působí jako druhý posel v průběhu vazodilatace, podílí se také na neurotransmisi a imunitě (Neill *et al.*, 2002).

V rostlinách bylo cGMP identifikováno jako důležitá molekula podílející se na obranné odpovědi závislé na rostlinných hormonech. Signalizace NO stimuluje produkci cGMP jako odezvu na stres, ale způsob vzniku cGMP byl donedávna stále neznámý. V rostlinách bylo nalezeno více guanylátcyklas, enzymů podílejících se na tvorbě cGMP, ale ani jedna z nich nebyla závislá na NO. Molekula vázající NO s guanylátcyklasovou aktivitou se podařila identifikovat v roce 2011 v *A. thaliana* (Mulaudzi *et al.*, 2011).

NO může být zároveň pro- i anti-apoptotický, což závisí především na koncentraci nebo na době tvorby NO. Anti-apoptotické působení NO u živočichů zahrnuje indukci proteinů teplotního šoku (hlavně smHSP a HSP70) a zvýšení hladiny cGMP vedoucí k potlačení uvolňování Ca^{2+} z mitochondrií. Klíčový anti-apoptotický mechanismus je S-nitrosylace esenciálního cysteinu v aktivním místě kaspas (Dimmeler *et al.*, 1997). Může fungovat jako antioxidant, přímo zachytávající reaktivní formy kyslíku (ROS), které jsou generovány většinou stresory (Gould *et al.*, 2003). V říši rostlin bylo také popsáno potlačení buněčné smrti účinkem NO, jehož exogenní aplikace na rostlinu *A. thaliana* indukuje v rostlinách expresi dalších obranných genů pro PR1-proteiny a PAL, což je enzym katalyzující první krok biosyntézy kyseliny salicylové (Zheng *et al.*,

2011). Při nízkých koncentracích NO podporuje normální růst rostlin a vývoj, stimuluje klíčení, prodloužení kořene, zvětšení listů, produkci fytoalexinů a zpomaluje nástup senescence (Simontacchi *et al.*, 2015).

Při aplikaci NO v relativně vysokých dávkách do rostlin dochází k narušení normálního metabolismu (Gould *et al.*, 2003). Z hlediska patologie je významná reakce oxidu dusnatého se superoxidem, kdy vzniká toxický peroxodusitan, jenž má schopnost oxidovat SH-skupiny bílkovin, atomy železa a síry v biologických molekulách a způsobuje peroxidaci lipidů. Reakce jeho vzniku je: $\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ONOO}^-$ (Kupková a Beneš, 2004). Expozice vysokým koncentracím NO snižuje fotosyntézu a dýchání, zvyšuje viskozitu thylakoidních lipidových monovrstev, nevratnou fragmentaci DNA a buněčnou smrt (Gould *et al.*, 2003).

V biologických systémech může být NO vytvořeno v enzymových nebo neenzymových reakcích. Enzymem produkující NO u živočichů je syntasa oxidu dusnatého (NOS; EC 1.14.13.39) (Piterková *et al.*, 2008). NOS katalyzuje oxidaci L-argininu na NO a citrulin za přítomnosti kyslíku a kofaktorů. U živočichů existují tři typy NOS: endoteliální NOS (eNOS) konstitutivně exprimovaná v endotelových buňkách, neurogenní NOS (nNOS) konstitutivně exprimovaná v mozku, periferních nervech a srdci a indukovatelná NOS (iNOS), která je indukována hlavně v makrofágách bakteriálními lipopolysacharidy a cytokininy (Toda a Toda, 2011). Enzymatická oxidace L-argininu byla popsána také u extraktů z hrachu, sóji, tabáku a kukuřice. Rostliny mohou produkovat NO také z dusitanů pomocí NADPH závislé na nitrátreduktasy (NR; EC 1.7.1.1.): $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} + \text{O}_2$ (Piterková *et al.*, 2008, Mur *et al.*, 2006). Rostlinné buňky mohou syntetizovat NO také prostřednictvím neenzymatické redukce NO_2^- . Chemická redukce NO_2^- na NO byla nalezena např. v apoplastu aleuronových vrstev ječmene. Redukce vyžadovala nízké pH a byla urychlena redukčními činidly včetně fenolických sloučenin. Byla indukována rostlinnými hormony kyselinou abscisovou a gibbereliny, které způsobily okyselení apoplastu. NO_2^- , a nepřímo NO_3^- , představují hlavní substráty enzymatického i neenzymatického procesu syntézy NO (Santolini *et al.*, 2017).

NO je velmi nestabilní molekulou. Stabilnější S-nitrosothioly jsou meziproducty metabolismu NO a vznikají v biologických systémech přenosem nitrososkupiny na nízkomolekulární thioly a proteiny (Kubienová *et al.*, 2013b). Proces posttranslační modifikace rostlinných proteinů na cysteinových zbytcích S-nitrosylací vede často k inhibici enzymatické aktivity nebo změně funkce proteinů (Lee *et al.*, 2008). Cílem

S-nitrosylace mohou být také regulační enzymy, které jsou zapojeny v důležitých drahách. Není proto divu, že narušení regulace hladin S-nitrosothiolů v buňce může vést k rozvoji různých patologických stavů (Foster *et al.*, 2009).

Nejvýznamnějším a nejhojnějším S-nitrosothiolem je S-nitrosoglutathion (GSNO), který vzniká S-nitrosylační reakcí reaktivních forem dusíku s buněčným antioxidantem glutathionem (Letterier *et al.*, 2011). GSNO funguje jako mobilní zásoba NO a jeho hlavní funkcí je přenášet a uvolňovat nitrososkupinu na jiné molekuly (Kubienová *et al.*, 2013b).

S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR; EC 1.1.1.284) je klíčový enzym katabolismu S-nitrosoglutathionu, ke kterému má vysokou substrátovou specifitu (Jahnová *et al.*, 2013). Katalyzuje redukci GSNO za přítomnosti NADH na směs produktů (glutathiondisulfid, amoniak, hydroxalamin, glutathion, kyselina sulfinová) v závislosti na reakčních podmínkách (Letterier *et al.*, 2011). Výsledkem enzymové reakce je tedy pokles hladiny GSNO a snížená pravděpodobnost tvorby S-nitrosothiolů (Gong *et al.*, 2015). Vyskytuje se u prokaryot i eukaryot a patří do třídy alkoholdehydrogenas (Letterier *et al.*, 2011). GSNOR byla nalezena v mnoha rostlinách, mezi které patří *A. thaliana*, hrách, kukuřice, rýže, slunečnice, paprika či rajče. GSNOR má rozhodující roli v homeostáze intracelulárních hladin NO a v celkovém metabolismu RNS. Podílí se na regulaci smrti rostlinných buněk (S-nitrosylací) a na obranných mechanismech rostlin při různých biotických a abiotických stresech (Kubienová *et al.* 2014).

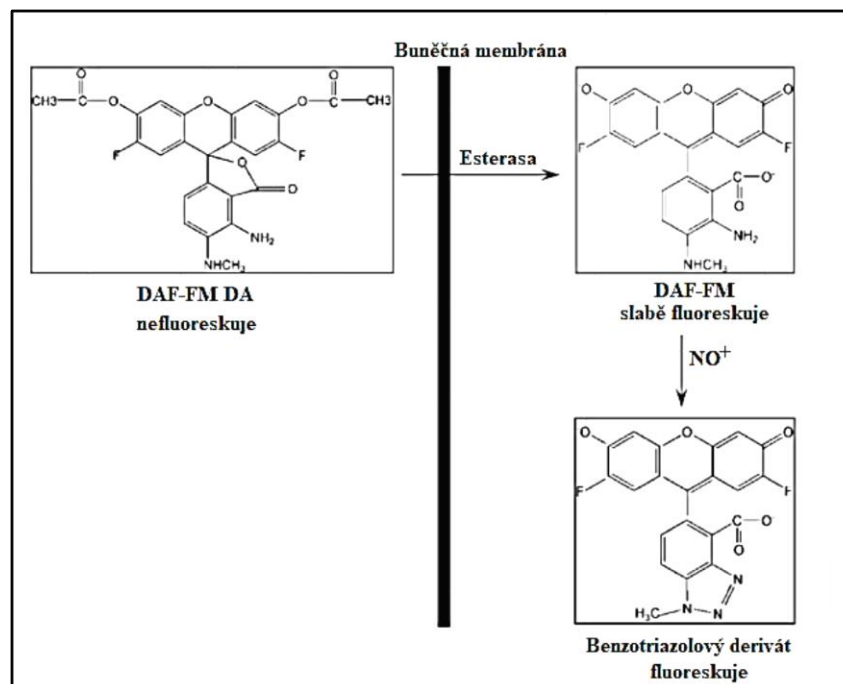
Aktivita GSNOR je nezbytná pro normální vývoj za optimálních podmínek růstu a aklimatizaci rostlin na vysoké teploty. Důležitou úlohu GSNOR v termotoleranci potvrzuje mutant hot-5, který obsahuje defektní gen pro GSNOR. Hot-5 mutant je citlivý vůči vysokým teplotám, což nesouvisí se signalizačními mechanismy vedoucími k expresi HSP, jelikož různé typy HSP byly pomocí imunoblotu u hot-5 detekovány (Lee *et al.*, 2008). Příčinou jeho snížené termotolerance je pravděpodobně narušení hladiny S-nitrosothiolů a drah reaktivních forem dusíku (Kubienová *et al.*, 2013b)

GSNOR se podílí také na odolnosti vůči patogenním infekcím modulací hladiny buněčných S-nitrosothiolů (Kubienová *et al.*, 2014). Podle experimentů studie prováděné na *A. thaliana* je imunita rostliny vůči patogenu *Peronospora parasitica* zvýšena snížením aktivity GSNO a zvýšením intracelulární hladiny S-nitrosothiolů, což vede ke zvýšené expresi PR-1 proteinů (Kubienová *et al.*, 2013b, Letterier *et al.*, 2011). Dráhy GSNOR a SA se pravděpodobně navzájem zesilují. GSNOR pozitivně reguluje signální

síť kyseliny salicylové, a naopak exprese genu GSNOR je aktivována SA (Kubienová *et al.*, 2014).

K objasnění fyziologické role endogenně produkovaného NO v termotoleranci k teplotnímu stresu bývá často použit již zmíněný lapač NO, cPTIO. Nedostatek NO má za následek významné zvýšení oxidačního stresu (Song *et al.*, 2006). Dalšími, široce používanými látkami pro studium NO jsou fluorescenční sondy. Diaminofluorescein diacetát (DAF-2 DA) je po průchodu buněčnými membránami deacetylován prostřednictvím buněčných esteráz. Deacetylací DAF-2 DA vzniká fluorofor 4,5-diaminofluorescein (DAF-2). Tento aromatický diamin v přítomnosti kyslíku reaguje s NO za vzniku triazolů. Nevýhodou je, že metoda detekce NO pomocí DAF-2 není selektivní pouze pro NO, neboť reakci podléhají i dusitany (Kupková a Beneš, 2004). Další nevýhodou je interference DAF-2 s askorbátem a dehydroaskorbátem při měření fluorescence (Gould *et al.*, 2003).

Další významnou sondou pro detekci NO je 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetát (DAF-FM DA). Po jeho deacetylaci esterázami v buňce vzniká 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein (DAF-FM) (Obr. 15). DAF-FM po reakci s NO vykazuje intenzivní a stabilní fluorescenci v širokém rozsahu hodnot pH. Vzniklá triazolová forma DAF-FM je fotostabilnější než triazolová forma DAF-2, a navíc práh detekce NO u DAF-FM je nižší než u DAF-2, okolo $3 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Gupta a Ibaraki, 2015).



Obr. 15: Reakční schéma detekce NO prostřednictvím sondy DAF-FM DA (upraveno podle Mainz *et al.*, 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

AA/BIS 30%/0,8% (Bio-Rad, USA)
Aceton (Lach-Ner, Česká republika)
AEBSF (AppliChem, Německo)
Akrylamid (Bio-Rad, USA)
BCIP (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
Bisakrylamid (MP Biomedicals, USA)
Bromfenolová modř (Acros Organics, Belgie)
Coomassie Blue G-250 (Bio-Rad, USA)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA)
c-PTIO (Sigma-Aldrich, Německo)
DAB (Roth, Německo)
DAF-FM DA (Enzo Life Sciences, USA)
Diethylether (Lach-Ner, Česká republika)
Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)
Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Německo)
DMF (Sigma-Aldrich, Německo)
Dodecylsíran sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
Dusitan sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
Ethanol (Lach-Ner, Česká republika)
Glutathion (Acros Organics, USA)
Glycerol (Sigma-Aldrich, Německo)
Glycin (Sigma-Aldrich, Německo)
Hydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)
Hydroxid draselný (Lach-Ner, Česká republika)
Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
Chemiluminiscenční substrát pro detekci křenovou peroxidásou (Sigma-Aldrich, Německo)
Chlorid hořečnatá (Lach-Ner, Česká republika)
Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina askorbová (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina ethylendiamintetraoctová (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina fosforečná (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina mléčná (Lachema, Česká republika)
Kyselina salicylová (Lachema, Česká republika)
Methanol (Lachema, Česká republika)
NADH (AppliChem, Německo)
n-Butanol (Sigma-Aldrich, Německo)
Nitroblue tetrazolium chlorid (Roth, Německo)
Peroxid vodíku (Lach-Ner, Česká republika)
Persíran amonný (Sigma-Aldrich, Německo)
Ponceau S (Merck, Německo)
Primární anti-HSP17,6, cytosolic, class I protilátka (Sigma-Aldrich, Německo)
Primární monoklonální anti-heat shock protein 70 protilátka produkovaná v myši (SigmaAldrich, Německo)
Sekundární anti-králičí protilátka IgG značená alkalickou fosfatase (Sigma-Aldrich, Německo)
Sekundární anti-králičí protilátka značená křenuvou peroxidase (Sigma-Aldrich, Německo)
Sekundární anti-myší protilátka IgG značená alkalickou fosfatase produkovaná v koze (Sigma-Aldrich, Německo)
Sekundární anti-myší protilátka značená křenuvou peroxidase (Sigma-Aldrich, Německo)
Sušené nízkotučné mléko (AppliChem, Německo)
TEMED (Sigma-Aldrich, Německo)
Tris (MP Biomedicals, Francie)
Tween-20 (Sigma-Aldrich, Německo)
Triton X-100 (Acros Organics, USA)
Vaječný albumin (Lanchema, Česká republika)

3.2 Materiály a přístrojové vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo)
Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
Digitální pH metr InoLab pH level1 (InoLab, Německo)

Digitální předvážky (KERN, Německo)
Elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)
Elektromagnetická míchačka (Biosan, Litva)
Chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo)
Inkubátor EN 120 (Nüve, Turecko)
Kolony NAP-5 (GE Healthcare, USA)
Mikrodestičkový reader Synergy HT (Bio-Tek, USA)
Mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko)
Mikroskop (Olympus, Japonsko)
Nitroceluloseová membrána s póry 0,45 µm (Bio-Rad, USA)
Scanner C-Digit Blot (Li-COR, USA)
Termostat (Grant, UK)
Třepačka Bio Shaker 30 (Biosan, Litva)
Třepačka vortex V-1 Plus (Biosan Litva)
Vibratom (Leica, Německo)
Zařízení pro tank blotting Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad, USA)
Zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA)
Zobrazovací zařízení Gel Doc EZ Imager (Biorad, USA)

3.3 Biologický materiál

Listy rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom)
Listy *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, transgenní rostliny nahG
Biotrofní patogen rajčatového padlí (*Pseudoidium neolycopersici*) byl poskytnut paní doc. RNDR. Barborou Mieslerovou, Ph.D.

3.3.1 Pěstování rostlinného materiálu

Všechny experimenty byly prováděny na rostlinách, které byly staré 3-5 týdnů. Semínka byla vložena do květináče s vodou navlhčeným, zahradnickým substrátem, do hloubky asi 2 cm a lehce přihrnuta hlínou. Květináče byly umístěny do fytotronu, kde rostliny byly pravidelně zalévány a vystaveny podmínkám: 12 h osvětlení (od 6 h do 18 h), 12 h tma, teplota 25 °C.

3.3.2 Působení stresových podmínek

V experimentální části diplomové práce byl rostlinný materiál podroben působení dvou stresových faktorů (teplotní stres, biotrofní patogen) a taktéž byl sledován současný vliv kyseliny salicylové na produkci HSP, aktivitu enzymů a produkci radikálů kyslíku a dusíku.

Část rostlinného materiálu byla podrobena působení samotného teplotního stresu. Rostlinné sazenice byly vloženy do inkubátoru nastaveného na 40 °C na dobu 2, 4 nebo 24 h. Po vytažení rostlin z inkubátoru byly listy zamraženy pro další zpracování, v případě experimentů zaměřených na histochemickou lokalizaci peroxidu vodíku, superoxidu a oxidu dusnatého byly listy zpracovány čerstvě.

Na další části rostlinného materiálu byl studován vliv samotné kyseliny salicylové. Rostlina byla rozprašovačem postříkána roztokem kyseliny salicylové o koncentracích 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Rostlinný hormon působil na rajčata v časových intervalech 2, 4 a 24 h. Poté byly listy z rostliny zamraženy nebo ihned zpracovány.

Byl studován také vliv kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu na rostlinu. Rostlina byla postříkána roztokem kyseliny salicylové o koncentracích 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a roztok se na listech ponechal asi 30 minut zaschnout. Poté byla rostlina vložena do inkubátoru nastaveného na teplotu 40 °C na dobu 2, 4 a 24 h. Po uplynutí doby působení teplotního stresu byly listy zamraženy nebo hned dále zpracovávány.

Následně byly studovány vlivy samotného patogenu, kombinace patogenu a teplotního stresu nebo patogenu a kyseliny salicylové na rostlinu.

Při samotném působení patogenu byly listy vloženy do Petriho misek vystlaných filtračním papírem na vatu navlhčenou vodou a následně proběhla inokulace patogenem. Doba působení patogenní infekce na listy byla 2, 4 a 24 h. Poté byly listy sesbírány pinzetou a zamraženy nebo hned zpracovány.

V případě působení kombinace patogenu a teplotního stresu byly listy nejprve vystaveny teplotnímu stresu 40 °C po dobu 2 h a následně inokulovány patogenem. Časové intervaly působení patogenu byly dlouhé 2, 4 a 24 h.

Poslední variantou působení stresových faktorů na rostlinu byla kombinace patogenu a kyseliny salicylové o koncentraci 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Listy rajčete byly pokládány do Petriho misek na vatu navlhčenou roztokem kyseliny salicylové. Poté byly listy inokulovány patogenem. Časové intervaly působení patogenu byly stejné jako v ostatních případech.

3.4 Použité metody

3.4.1 Příprava pufrů

3.4.1.1 Pufr pro extrakci pro SDS-polyakrylamidovou elektroforézu (SDS-PAGE)

Pro extrakci HSP z rostliny byl připraven Tris-HCl pufr o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 7. Na přípravu 1 l pufru bylo naváženo 16 g Tris a pH bylo upraveno HCl. Pufr byl uchováván v lednici.

3.4.1.2 Pufr do zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE

Pro přípravu zaostřovacího gelu byl namíchán Tris-HCl pufr o koncentraci $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 6,8. Na přípravu 100 ml pufru bylo rozpuštěno 6 g Tris v 80 ml vody a následně bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu pomocí HCl. Nakonec byl objem doplněn do 100 ml destilovanou vodou.

3.4.1.3 Pufr do dělicího gelu pro SDS-PAGE

Pro přípravu dělicího gelu byl namíchán Tris-HCl o koncentraci $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 8,8. Na přípravu 400 ml pufru bylo rozpuštěno 72,6 g Tris v 300 ml vody. Následně bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu pomocí HCl a objem byl doplněn vodou do 400 ml.

3.4.1.4 Vzorkový pufr pro SDS-PAGE

Vzorky pro elektroforézu byly smíchány v poměru 1:1 se vzorkovým pufrem, který byl připraven smícháním 2,5 ml pufru do zaostřovacího gelu, 4 ml 10 % SDS, 2 ml glycerolu, 2 mg bromfenolové modři a 0,31 g DTT. Objem byl doplněn vodou do 10 ml. Pufr byl rozpipetován po 0,5 ml do mikrozkušavek a zamražen při $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.1.5 Elektrodotový pufr pro SDS-PAGE

Elektrodotový pufr, ve kterém probíhala SDS-polyakrylamidová elektroforéza, byl připraven rozpuštěním 6,05 g Tris, 28,82 g glycinu a 2 g SDS v 1 l vody, po zkontrolování hodnoty pH (8,3) byl objem doplněn do 2 l vodou. Pufr byl uchováván v lednici.

3.4.1.6 Blotovací pufr

Přenos proteinů z gelu na membránu probíhal v blotovacím pufru. Pro přípravu blotovacího pufru bylo rozpuštěno 3,025 g Tris a 14,1 g glycinu ve 200 ml vody, následně se přidalo 200 ml methanolu, pH bylo upraveno na hodnotu 8,3 a objem byl doplněn vodou do 1 l. Pufr byl uchováván v lednici při 4 °C.

3.4.1.7 TBS pufr

TBS pufr byl připravován 5x koncentrovaný, takže při jeho použití bylo nutné si jej naředit v poměru 1:4 vodou. 5x koncentrovaný TBS pufr byl připraven smícháním 15,1 g Tris a 58,4 g NaCl a jejich rozpuštěním v 800 ml vody. Následně se upravilo pH na 7,5 pomocí HCl a objem byl doplněn do 1 l vodou.

3.4.1.8 TBS-T pufr

TBS-T pufr byl používán k promývání membrán a k přípravě roztoků protilátek při imunodetekci proteinů na membráně. Byl připraven z TBS pufru, který bylo nejdříve nutné 5x naředit. Do 300 ml takto naředěného pufru bylo přidáno 0,15 ml Tween-20.

3.4.1.9 Pufr pro detekci alkalickou fosfatase

Pufr pro detekci alkalickou fosfatase obsahoval Tris v koncentraci 100 mmol·l⁻¹, MgCl₂ v koncentraci 5 mmol·l⁻¹ a NaCl v koncentraci 100 mmol·l⁻¹. pH pufru bylo upraveno kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 9,5.

3.4.1.10 Pufr pro extrakci a měření aktivity askorbátperoxidasy (APX)

Pro extrakci a měření aktivity askorbátperoxidasy byl připraven fosfátový pufr o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹ pH 7,5 s přidavkem EDTA-Na⁺ v koncentraci 2 mmol·l⁻¹. Bylo rozpuštěno 5,44 g KH₂PO₄ a 10,4 g K₂HPO₄ a 0,74 g EDTA-Na⁺ v 800 ml vody. Následně bylo upraveno pH na hodnotu 7 pomocí NaOH nebo kyseliny fosforečné a objem byl doplněn vodou do 1 l.

3.4.1.11 Pufr pro extrakci – měření aktivity

S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR)

Pro extrakci rostlinného materiálu, u kterého měla být následně měřena GSNOR, byl připraven Tris pufr o koncentraci $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ s 0,2% Triton X-100. Čerstvě před použitím pak bylo do pufru přidáno DTT v $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ koncentraci a AEBSF v koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Na 1 l roztoku bylo tedy rozpuštěno 6,06 g Tris, 2 ml Triton X-100 v 800 ml vody, pH bylo pomocí HCl upraveno na hodnotu 7,5 a následně byl objem doplněn na 1 l vodou. Před použitím do 10 ml takto připraveného pufru přidáno 0,0031 g DTT a 0,0024 g AEBSF.

3.4.1.12 Eluční pufr pro přečištění extraktů a měření aktivity GSNOR

Pro eluci nízkomolekulárních látek na kolonkách NAP-5 při přípravě vzorků pro měření GSNOR byl připraven Tris-HCl pufr o koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ pH 8. Pro přípravu 1 l pufru bylo rozpuštěno 2,42 g Tris v 800 ml vody, pH bylo upraveno pomocí HCl na požadovanou hodnotu a následně byl doplněn objem vodou do 1 l.

3.4.2 Roztoky

Barvicí roztok CBB R-250 (0,1% CBB R-250 v 15% kyselině octové a 45% methanolu)

Barvicí roztok Ponceau S (0,2% Ponceau S v 10% kyselině octové)

DAB o koncentraci $23 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a pH 3,8 pro lokalizaci peroxidu vodíku

NBT o koncentraci $6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro lokalizaci superoxidu

1% nízkotučné mléko v TBS-T

5% nízkotučné mléko v TBS-T

Odbarvovací roztok po barvení CBB R-250 (40% methanol, 10% kyselina octová)

Odbarvovací roztok pro lokalizaci ROS (ethanol:kyselina mléčná:glycerol; 4:1:1)

10% persíran amonný

Roztok BCIP pro detekci alkalickou fosfatase (5% BCIP v 100% DMF)

Roztok NBT pro detekci alkalickou fosfatase (10% NBT v 70% DMF)

10% SDS

Tris pufr o koncentraci $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a pH 7,4

Tris pufr o koncentraci $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a pH 8 s glycerolem (1:1)

Zásobní roztok CBB G-250 pro metodu Bradforda (50 mg CBB G-250, 25 ml methanolu, 50 ml 85% kyseliny fosforečné, doplněno destilovanou vodou na 100 ml)

3.4.3 Příprava rostlinných vzorků

3.4.3.1 Příprava rostlinných vzorků pro SDS-PAGE

Rostlinný materiál byl vložen do třecí misky a homogenizován s třecím pískem a extrakčním pufrům v poměru 1:2. Extrakt byl následně centrifugován 10 minut při 4 °C a 16000 g. Po centrifugaci byl odpipetován supernatant do nové mikrozkušavky. Pro přípravu vzorků pro SDS-PAGE byl smíchán extrakt se vzorkovým pufrům v poměru 1:1 a následně byl vložen do termostatu vyhřátého na 90 °C na dobu 5 minut. Poté byl vzorek ochlazen na ledu.

3.4.3.2 Příprava rostlinných vzorků pro měření aktivity APX

Zamražené listy byly ve vychlazené třecí misce na ledu homogenizovány s mořským pískem a extrakčním pufrům v poměru 1:2. Extrakt byl následně centrifugován 10 min při 4 °C a 16000 g. Po centrifugaci byl odpipetován supernatant do nové mikrozkušavky. Extrakty byly ihned proměřeny na mikrodestičkovém readeru.

3.4.3.3 Příprava rostlinných vzorků pro měření aktivity GSNOR

Rostlinný materiál byl homogenizován v třecí misce na ledu s tekutým dusíkem, mořským pískem a extrakčním činidlem, které bylo přidáno dvojnásobně víc než rostlinného materiálu. Poté byl extrakt přenesen do mikrozkušavky a za občasného protřepání byl ponechán 20 min na ledu. Poté byl zcentrifugován při 4 °C a 16000 g po dobu 20 min. Supernatant byl odpipetován a přečištěn na NAP-5 kolonkách. Kolonka byla nejprve ekvilibrována 3x po sobě 2,5 ml Tris o koncentraci 20 mmol·l⁻¹ o pH 8. Poté bylo na kolonku nanášeno 250 µl extraktu, který se nechal kolonkou protéct. Po jeho protečení bylo na kolonku nanášeno 500 µl elučního pufru a takto přečištěný extrakt byl pod kolonkou sbírán do mikrozkušavky. Poté byla kolonka promyta 25 ml destilované vody.

3.4.4 SDS-PAGE

Skla k nalévání gelu byla odmaštěna ethanolem. Složené páry skel byly vloženy do stojánku na skla. Nalítím vody mezi skla bylo ověřeno, že skla dobře těsní a po jejím odstranění se přistoupilo k přípravě roztoku dělicího gelu.

Tab.1: Složení 10% a 7% dělicího gelu a 4% zaostřovacího gelu. Objemy jsou v ml (na 2 gely). AA/BIS 30%/0,8%, Tris-HCl do dělicího gelu ($1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 8,8), Tris-HCl do zaostřovacího gelu ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 6,8).

Typ gelu	AA/BIS	Tris-HCl do děl.	Tris-HCl do zaost.	H ₂ O	SDS	TEMED	Start APS
10% děl.	3,4	2,5	-	3,8	0,1	0,01	0,07
7% děl.	2,3	2,5	-	5,1	0,1	0,01	0,07
4% zaost.	1,3	-	2,5	5,9	0,2	0,02	0,12

Přídavkem 10% roztoku APS byla iniciována polymerace gelu. Roztok byl ihned nanesen do prostoru mezi sklíčky a poté na něj byla nanesena tenká vrstva n-butanolu pro zamezení přístupu kyslíku. Asi po 15 minutách byl ze ztuhlého gelu odstraněn n-butanol. Do prostoru mezi skly byla stříčkou nanesena voda na promytí a její přebytek byl následně odsát filtračním papírem. Následně byl nanesen zaostřovací gel již s přídavkem APS a ihned byl vložen plastový hřebínek o vhodné tloušťce pro vytvoření jamek pro nanesení vzorku.

Po zatuhnutí gelů byla sklíčka přenesena do elektroforetické komůrky, do které byl nalit po značku elektroodový pufr. Po vytažení hřebíneků byly do jamek nanášeny automatickou pipetou v objemu 10 μl . Po nanesení vzorků byla elektroodová nádoba uzavřena víkem a připojena ke zdroji. Zdroj byl nastaven na 100 V, po 20 minutách bylo napětí zvýšeno na 180 V. Po doputování bromfenolové modři na dolní okraj skla byla aparatura odpojena od zdroje a skla byla vytažena z komůrky. Po oddělení skel od sebe byl odříznut spodní roh gelu pro lepší orientaci v nanášení vzorků a gel byl opatrně oddělen od sklíčka a připraven tak k dalšímu použití.

3.4.4.1 Detekce proteinů barvivem Coomassie Brilliant Blue R-250

Gel byl vložen do roztoku barviva a v něm byl ponechán přes noc. Následujícího dne bylo barvivo slito a nahrazeno odbarvovacím roztokem, který se s gelem inkuboval nejméně 2 hodiny. Poté byl gel zdokumentován zobrazovacím zařízením Gel Doc EZ Imager.

3.4.5 Western blot

3.4.5.1 Tank blot

Na černou stranu blotovací kazety byla položena porézní houbička nasáklá blotovacím pufrem, na houbičku vlhký filtrační papír. Gel z elektroforézy byl umístěn na filtrační papír, na gel byla následně přiložena nitrocelulosová membrána ve velikosti gelu, která měla odstřížený roh pro lepší orientaci v nanesení vzorků. Válečkem byly vytlačeny vzduchové bubliny mezi gelem a membránou, aby byly proteiny z gelu na membránu dobře přebloťovány. Membrána byla přiklopena opět navlhčeným filtračním papírem a celý sendvič byl dokončen přiložením blotovacím pufrem nasáklé porézní houbičky.

Kazeta byla vložena do blotovací komůrky tak, aby černá strana kazety směřovala k černé straně blotovací aparatury. Do blotovací komůrky byl nalit blotovací pufr a víčko bylo přiklopeno ke komůrce. Celá aparatura byla vložena do lednice a připojena ke zdroji, na kterém byl nastaven proud v hodnotě mA/cm^2 plochy membrány. Blotování bylo vždy provedeno přes noc.

Následující den byla aparatura vypojena ze zdroje napětí a membrána byla vložena na 30 minut do roztoku Ponceau S pro kontrolu úspěšnosti přenosu. Po propláchnutí membrány vodou bylo v případě správného přenesení možno vidět červené bandy. Poté byla membrána odbarvena roztoku TBS-T a pokračovalo se v imunodetekci.

3.4.5.2 Imunochemická detekce proteinů na membráně

Membrána byla vložena na 2 hodiny do 5% roztoku nízkotučného mléka, čímž bylo zabráněno nespecifickým vazbám protilátek (zablokování membrány). Poté byla 3x promyta po dobu 10 minut roztokem TBS-T. Mezitím byl připraven roztok primární protilátky, která byla naředěna 1% nízkotučným mlékem. Inkubace membrány v primární protilátce (anti-HSP17,6, cytosolic, class I – ředění 1:2000/monoklonální anti-HSP70 produkovaná v myši – ředění 1:1000) probíhala přes noc. Následujícího dne byla membrána opět 3x promyta po dobu 10 minut roztokem TBS-T a vložena do roztoku sekundární protilátky (anti-králičí IgG protilátka značená alkalickou fosfatasou – ředění 1:5000/anti-myší IgG protilátka značená alkalickou fosfatasou produkovaná v koze – ředění 1:5000/anti-myší protilátka značená křenovou peroxidasou – ředění 1:10000/anti-králičí protilátka značená křenovou peroxidasou – ředění 1:10000), která byla naředěna 1% nízkotučným mlékem. Inkubace membrány v sekundární protilátce probíhala 2 hodiny. Po inkubaci proběhlo promytí membrány v roztoku TBS-T. Pro vizualizaci bandů

alkalickou fosfatasou byl použit roztok NBT-BCIP. Bylo smícháno 33 μl roztoku NBT, 33 μl roztoku BCIP a 10 ml pufru pro detekci alkalickou fosfatasou. Membrána byla inkubována v barvicím roztoku asi 1 minutu do vytvoření viditelných černých bandů na bílém pozadí. Pro vizualizaci bandů křenovou peroxidásou byl k membráně přidán chemiluminiscenční substrát.

Výsledek experimentu v případě detekce alkalickou fosfatasou byl zdokumentován fotoaparátem a bandy byly densitometricky vyhodnoceny pomocí programu Image Studio Lite Ver 5.2. Při detekci HSP křenovou peroxidásou byl k dokumentaci výsledků použit přístroj Scanner C-Digit Blot.

3.4.6 Stanovení koncentrace celkových proteinů metodou Bradforda

Byl připraven zásobní roztok CBB G-250. Tento roztok byl uchováván v lednici při 4°C. Před použitím byl naředěn v poměru 1:4 destilovanou vodou. Dále byla připravena kalibrační řada proteinu BSA o koncentraci 0,2-1,4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Do jamky bylo postupně pipetováno 45 μl deionizované vody, 5 μl standardu nebo vzorku proteinu a nakonec 200 μl roztoku Bradfordova činidla. Po 5 minutách vyvíjení zbarvení byla na readeru změřena absorbance při 595 nm.

Vyhodnocení proběhlo využitím rovnice lineární regrese pro kalibrační řadu standardu a z ní byly z naměřených absorbancí vzorků vypočítány koncentrace proteinů ve vzorcích.

3.4.7 Měření aktivity APX

Princip metody měření aktivity askorbátperoxidasy je pozorování poklesu absorbance, který je způsoben oxidací substrátu askorbátu enzymem.

Na mikrodestičku pro měření v UV oblasti bylo do jamky napipetováno nejprve 125 μl fosfátového pufru o koncentraci 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 7, dále 72 μl čerstvě připraveného roztoku askorbátu o koncentraci 1,75 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 15 μl extraktu. U blanku byl místo extraktu použit extrakční pufr. Reakce byla nastartována 38 μl čerstvě připraveného roztoku peroxidu vodíku o koncentraci 0,7 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Destička byla vložena do readeru a byl sledován pokles absorbance při 290 nm v intervalech 10 s po dobu 1 minuty.

Katalytická aktivita byla vypočtena s využitím molárního absorpčního koeficientu, pro askorbát $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a délky optické dráhy, která činila v jamce mikrodestičky 0,735 cm.

Specifická aktivita byla vypočtena podílem celkové aktivity enzymu v kat/ml a koncentrace proteinů v $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, jež byla zjištěna metodou Bradforda.

3.4.8 Příprava S-nitrosoglutathionu

Navážka 614 mg glutathionu byla rozpuštěna ve 3 ml HCl o koncentraci $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a celá kádinka byla chlazená na ledové lázni. Dále byla k roztoku glutathionu pomalu přisypávána navážka 138 mg NaNO_2 . Reakční směs se poté ponechala na ledu 40 minut za vzniku růžové sraženiny S-nitrosoglutathionu. Po uplynutí 40 minut byla sraženina odsáta na filtračním papíře na Büchnerově nálevce. Poté byla 2x promyta 10 ml ledově vychlazené deionizované vody, 2x 10 ml vychlazeného acetonu a 2x 10 ml vychlazeného diethyletheru. Odsátá sraženina byla seškrabána špachtlí z filtračního papíru na hliníkovou fólii byla ponechána na 30 minut v exikátoru na dosušení a ihned zamražena v plastové mikrozkušavce.

3.4.9 Měření aktivity GSNOR

Principem měření aktivity GSNOR pomocí spektrofotometru je pozorování poklesu absorbance při redukci substrátu NADH enzymem.

Do 96 jamkové destičky bylo do každé jamky napipetováno nejprve 225 μl Tris pufru o koncentraci $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 8, 15 μl extraktu, 30 μl roztoku NADH o koncentraci $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 30 μl roztoku S-nitrosoglutathionu o koncentraci $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Do blanku bylo místo S-nitrosoglutathionu napipetováno 30 μl destiované vody. Byla měřena změna absorbance při 340 nm po dobu 10 minut v intervalech po 20 s.

Katalytická aktivita byla vypočtena s využitím molárního absorpčního koeficientu, pro NADH $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a hodnoty DOD, která činila 0,75.

Specifická aktivita byla vypočtena podílem celkové aktivity enzymu v kat/ml a koncentrace proteinů v mg/ml, jež byla zjištěna metodou Bradforda.

3.4.10 Provedení statistické analýzy výsledků

Statistická analýza výsledků měření aktivit enzymů askorbátperoxidasy s S-nitrosoglutathionreduktasy byla provedena pomocí T-testu v programu Microsoft Excel. Hladina významnosti byla zvolena 0,05. Na základě testovacího kritéria F-testu byl aplikován příslušný typ T-testu, díky němuž bylo rozhodnuto, které experimentální skupiny jsou statisticky významně odlišné oproti kontrolní skupině.

3.4.11 Histochemická lokalizace peroxidu vodíku a superoxidu

Princip detekce peroxidu je reakce 3,3'-diaminobenzidinu (DAB) s peroxidem vodíku, která je katalyzována rostlinnými peroxidasami. Polymerací oxidovaného DAB vzniká stabilní hnědý produkt nerozpustný v alkoholu.

Princip detekce superoxidu je reakce tetrazoliové modři (NBT, nitroblue tetrazolium chlorid), která se díky své rozpustnosti dostává do buňky, kde je redukována superoxidem na nerozpustný modrý formazan.

Nejprve byly připraveny čerstvé roztoky DAB a NBT a rozpipetovány do Petriho misek. Listy rajčat byly ponořeny do těchto roztoků a pro zvýšení infiltrace roztoků do pletiv byly Petriho misky umístěny pod vakuum do exikátoru na 20 minut. Inkubace lístků v roztocích trvala 2 hodiny, roztok DAB byl chráněn před světlem. Negativní kontrola byla inkubována s přidavkem kyseliny askorbové ve finální koncentraci $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Po ukončení doby inkubace byly listy opláchnuty v destilované vodě a pro odbarvení chlorofylu byly vloženy na 20 minut do odbarvovacího roztoku při $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Odbarvené listy byly uchovány v glycerolu vyfotografovány a pozorovány pod mikroskopem. Přítomnost peroxidu je pozorována jako hnědé zbarvení, přítomnost superoxidu jako modrá barva.

3.4.12 Histochemická lokalizace oxidu dusnatého

Pro detekci oxidu dusnatého v listech byla do Petriho misek nalita 4% agarosa a po dosažení její teploty na hodnotu $40 \text{ }^\circ\text{C}$ byly do ní vloženy na kolmo segmenty listů s výraznou žilnatinou. Miska s agarem byla vychlazená na ledové lázni. Poté byly skalpelem vyříznuty kvádry agarosy se vzorkem o velikosti cca $1,5 \times 1,5 \text{ cm}$. Kvádr byl opracován skalpelem do tvaru pyramidy, která byla přilepena na základní kostku vibratomu.

Tloušťka řezů byla na vibratomu nastavena na 100 μm . Řezy byly následně umístěny do Tris pufru o koncentraci 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 7,4 na dobu 5 minut. Následně byla část řezů přemístěna na 20 minut do roztoku cPTIO o koncentraci 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (lapač NO) pro negativní kontrolu, část zůstala po stejnou dobu stále v Tris pufru. Po uplynutí doby inkubace byla přesunuta negativní kontrola do roztoku, který obsahoval cPTIO v koncentraci 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a fluorescenční sondu DAF-FM DA v koncentraci 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Druhá část řezů byla přesunuta z pufru do DAF-FM DA o koncentraci 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Inkubace řezů se sondou probíhala 30 minut. Poté byly všechny řezy opět přemístěny na dobu 5 minut do Tris pufru.

Řezy byly přeneseny na podložní sklíčko, zakápnuty Tris pufrém o koncentraci 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 8 smíchaným s glycerolem v poměru 1:1 a překryty krycím sklíčkem. Pod mikroskopem byl pozorován zelený fluorescenční signál v místě vzniku NO za použití hranolu UMWB2. Excitační vlnová délka příslušné fluorescenční značky je 495 nm, emisní 515 nm. Vzorky byly pozorovány i pod viditelným světlem. Experimenty byly zdokumentovány snímky vzorků, jež byly následně vyhodnoceny pomocí programu ImageJ.

4 VÝSLEDKY

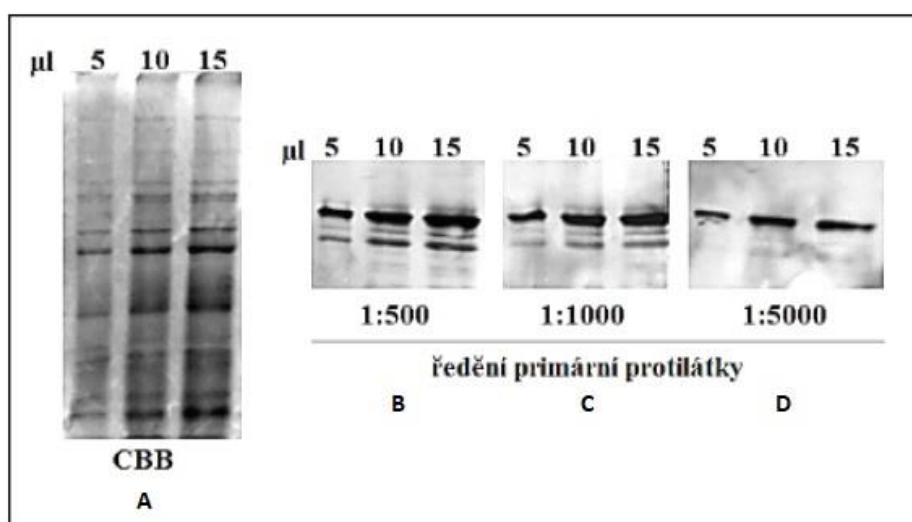
4.1 Optimalizace metody Western blot pro detekci HSP

4.1.1 Ředění primární protilátky k detekci HSP70

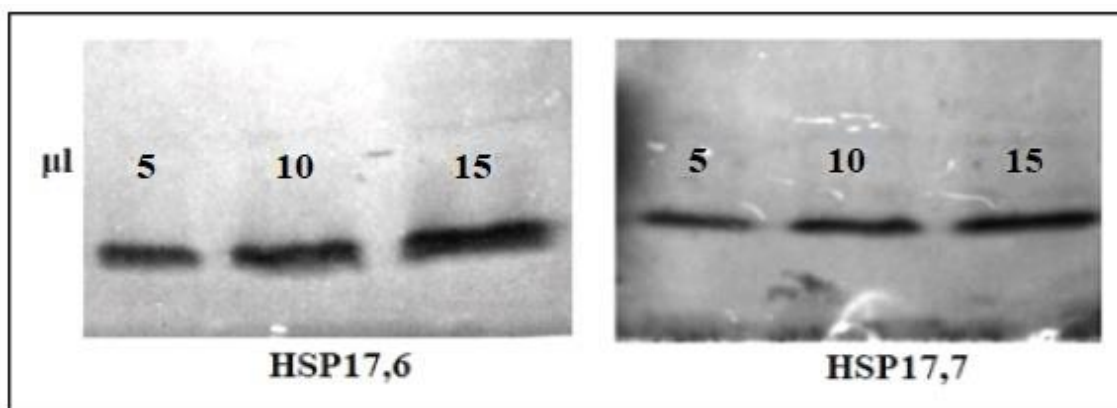
SDS-PAGE byla provedena s použitím 10% dělicího a 4% zaostřovacího gelu. Extrakty ze *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom byly upraveny pro podmínky SDS-PAGE a nanášeny v množstvích 5 μ l, 10 μ l a 15 μ l do jamky. Po elektroforéze byly na jednom z gelů detekovány proteiny činidlem CBB (Obr. 16), druhý byl použit pro přebílení proteinů z gelu na membránu a imunochemickou detekci HSP70.

Po kontrole správného přenosu činidlem Ponceau S a blokování membrány 5% nízkotučným mlékem byla membrána rozstříhnutá na tři části se stejně nanesenými vzorky. Jednotlivé části byly dále inkubovány s různě naředěnými roztoky primární myší monoklonální anti-HSP70 protilátky. Primární protilátka byla ředěna 1% nízkotučným mlékem v poměrech 1:500, 1:1000 a 1:5000. Po inkubaci membrán s roztoky primární protilátky byly membrány inkubovány se sekundární kozí anti-myší IgG protilátkou značenou alkalickou fosfatase, která byla naředěna podle pokynů výrobce 1% nízkotučným mlékem v poměru 1:5000. Po inkubaci membrán se sekundární protilátkou a promytí byly bandy HSP70 vizualizovány s využitím roztoku NBT-BCIP (Obr. 16).

Detekce proteinů na gelu činidlem CBB byla úspěšná. Zvýšení ředění primární protilátky nízkotučným mlékem způsobilo snížení intenzity bandů na membráně.



Obr. 16: Optimalizace ředění primární protilátky pro detekci HSP70. Obr. A: Detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu činidlem CBB. Obr. B, C, D: Imunochemická detekce HSP70 na blotovací membráně s použitím různého ředění primární protilátky. Nad bandy je uvedeno množství naneseného vzorku do jamky v μ l, pod obrázky poměr ředění primární protilátky 1% nízkotučným mlékem.



Obr. 17: Srovnání primárních protilátek pro imunochemickou detekci smHSP. Použitý typ primární protilátky je označen pod obrázky. Nad bandy je uvedeno množství naneseného vzorku do jamky v µl.

4.1.2 Výběr primárních protilátek pro detekci smHSP

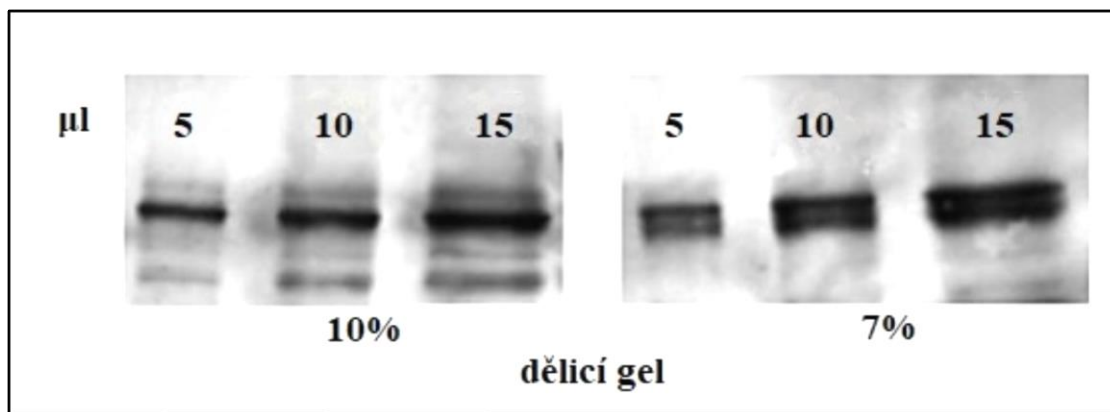
K detekci smHSP byly vyzkoušeny protilátky na HSP17,6 a HSP17,7. SDS-PAGE byla provedena s použitím 10% dělicího a 4% zaostřovacího gelu. Extrakty ze *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom byly upraveny pro podmínky SDS-PAGE a nanášeny v množstvích 5 µl, 10 µl a 15 µl do jamky. Po elektroforéze následoval přenos proteinů z gelu na membránu.

Po kontrole správného přenosu činidlem Ponceau S a blokování membrán 5% nízkotučným mlékem byla jedna membrána vložena inkubována s primární králičí anti-HSP17,6 (cytosolická třída I) protilátkou ředěnou 1% nízkotučným mlékem v poměru 1:2000 podle pokynu výrobce. Druhá membrána byla inkubována s primární anti-HSP17,7 (cytosolická třída II) protilátkou, ředěnou stejným poměrem. Po uplynutí doby inkubace membrán v roztocích primárních protilátek a promytí byly membrány vloženy do roztoku sekundární kozi anti-králičí IgG protilátky značené alkalickou fosfatase. Vizualizace bandů smHSP byla provedena s využitím roztoku NBT-BCIP (Obr. 17).

Imunochemická detekce smHSP byla na obou membránách úspěšná, avšak intenzita bandů HSP17,6 je vyšší ve srovnání s intenzitou bandů HSP17,7.

4.1.3 Výběr koncentrace dělicího gelu

SDS-PAGE elektroforéza byla provedena s použitím 7% a 10% dělicího gelu a 4% zaostřovacího gelu. Extrakty ze *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom byly upraveny pro podmínky SDS-PAGE a nanášeny do jamek v množstvích 5 µl, 10 µl a 15 µl.



Obr. 18: Imunochemická detekce HSP70 při použití 10% a 7% dělicího gelu. Pod obrázkou je uvedeno procentuální složení dělicího gelu, nad bandy množství nanášeného vzorku do jamky v μl .

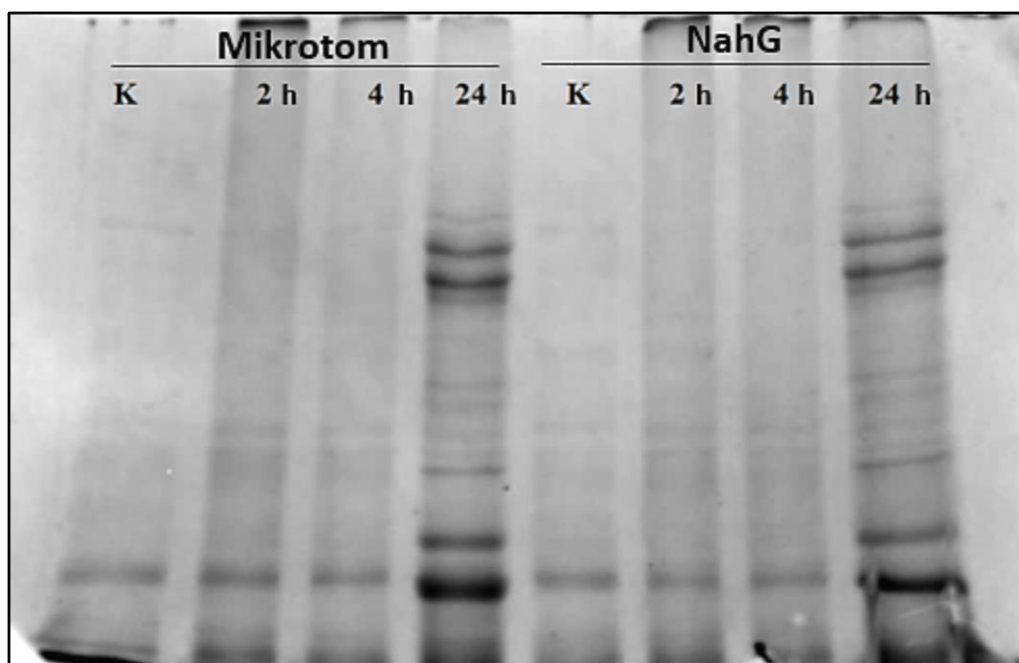
S gely s nižší koncentrací bylo potřeba manipulovat opatrně, protože byly poměrně nestabilní a náchylné k roztrhnutí. Po přebílení proteinů z gelu na membránu, kontrole úspěšnosti přenosu činidlem Ponceau S a blokování membrány 5% nízkotučným mlékem následovala inkubace obou membrán s primární myší anti-HSP70 protilátkou a následně se sekundární kozí anti-myší IgG protilátkou značenou alkalickou fosfatase. Vizualizace bandů HSP70 byla provedena s využitím roztoku NBT-BCIP (Obr. 18).

Bylo ověřeno, že separace proteinů v 7% dělicím gelu, následná imunodetekce a vizualizace proteinů alkalickou fosfatase umožňuje oproti použití 10% dělicího gelu detekci dvou izoform HSP70 (konstitutivní a teplotně indukované), což se projevilo dvěma bandy těsně umístěnými pod sebou. U všech následujících experimentů, kromě jednoho experimentu (Obr. 26), byl tedy používán 7% dělicí gel, aby došlo k verifikaci produkce teplotně indukovaných HSP70 v případě působení faktoru teplotního stresu.

4.2 Analýza hladin HSP v listech rajčete při vystavení teplotnímu stresu, kyselině salicylové a infekci biotrofním patogenem

4.2.1 Hladiny HSP v listech rajčete vystavených teplotnímu stresu

Rostliny *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a nahG rostliny byly vystaveny teplotě 40 °C v inkubátoru po dobu 2, 4 a 24 h. Kontrolní rostliny byly inkubovány po dobu 2, 4 a 24 h při laboratorní teplotě. Listy byly zpracovány do extraktů, které byly upraveny pro podmínky SDS-PAGE. Elektroforéza byla provedena s použitím 7% dělicího a 4% zaostřovacího gelu. Všechny vzorky byly do jamek nanášený v množství 10 μl .



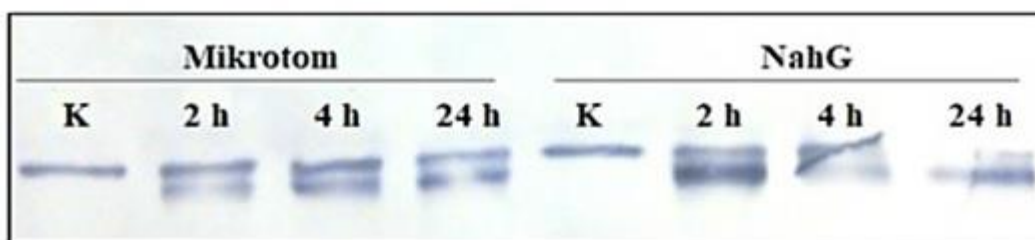
Obr. 19: Detekce proteinů v extraktech listů rajčete v polyakrylamidovém gelu činidlem CBB. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení teplotního stresu. Nad popisky časových intervalů je uvedeno, o jaký druh rajčete se jedná.

Po elektroforetické separaci byly proteiny v jednom gelu detekovány činidlem CBB (Obr. 19), další dva gely byly dále použity pro detekci HSP.

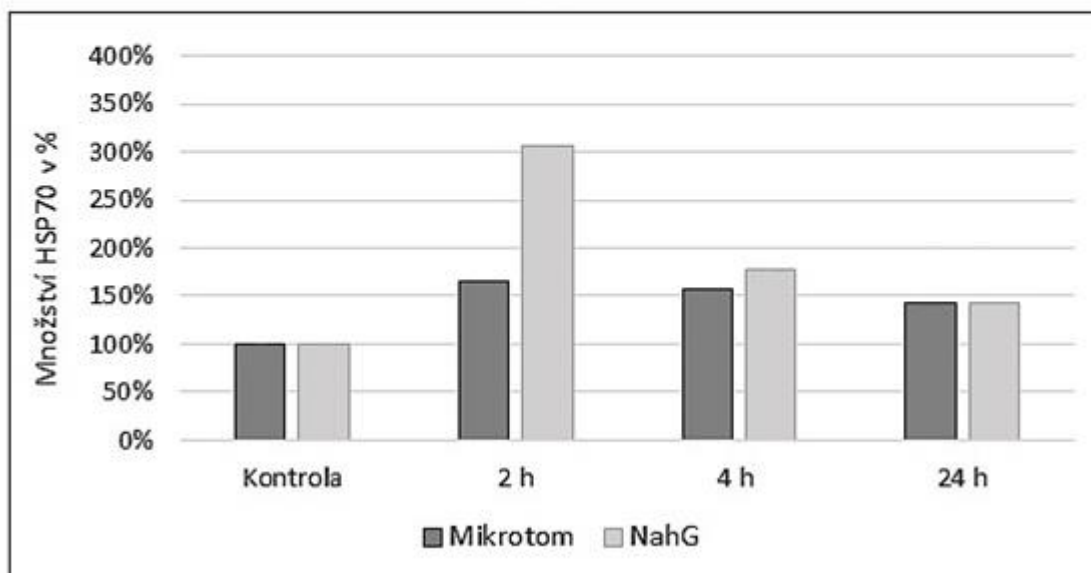
Po kontrole přenosu proteinů a blokování membrány 5% nízkotučným mlékem byly membrány vloženy do příslušného roztoku primární protilátky (primární myší anti-HSP70 protilátka/primární králičí anti-HSP17,6 protilátka). Následovala inkubace s příslušným roztokem sekundární protilátky (sekundární kozí anti-myší IgG protilátka značená alkalickou fosfatasou/sekundární anti-králičí IgG protilátka značená alkalickou fosfatasou). Vizualizace bandů HSP byla provedena s využitím roztoku NBT-BCIP. Následovalo densitometrické vyhodnocení intenzity detekovaných bandů na membráně v programu Image Studio Lite Ver 5.2.

U všech teplotně stresovaných rostlin byly v listech exprimovány obě izoformy HSP70. U nahG rostlin byla hladina HSP70 vyšší než u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, zejména v prvním časovém intervalu. Po 2 h působení teplotního stresu byl zaznamenán nejvyšší nárůst hladiny HSP70, v pozdních intervalech následoval pokles (Obr. 20).

Densitometrické vyhodnocení bandů bylo provedeno pro celkové HSP70, nikoli pro každou izoformu zvlášť, z důvodu nedokonalého rozdělení bandů (izoforem) v gelu u vzorků NahG 4 h, 24 h. Vyhodnocení každé izoformy zvlášť by nebylo objektivní, protože jednotlivé bandy nejdou přesně ohraničit. V kvantifikaci tímto způsobem bylo



A

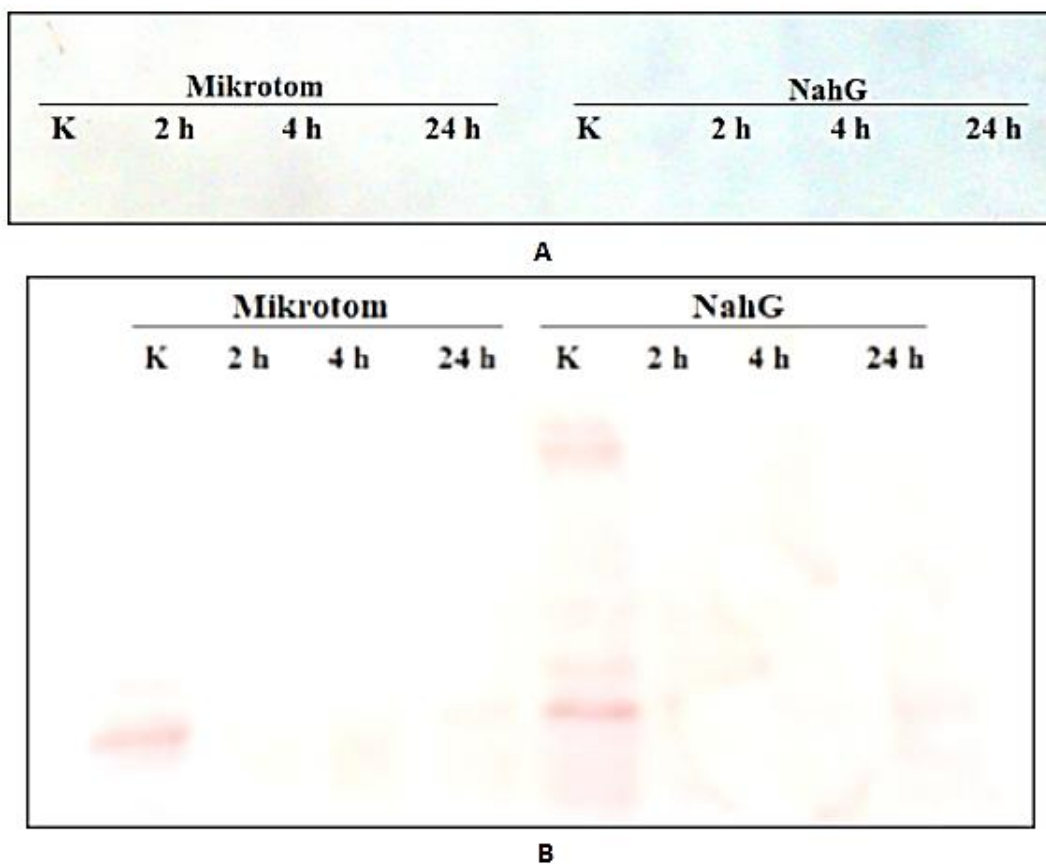


B

Obr. 20: Vliv teplotního stresu na hladiny HSP70 v listech rajčete. A: Imunochemická detekce HSP70 na membráně. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení teplotního stresu. Nad popisky časových intervalů je uvedeno, o jaký druh rajčete se jedná. B: Densitometrické vyhodnocení hladin HSP70. Kontrola brána jako 100 %.

pokračováno i v následujících experimentech, kde se vyskytovaly obě izoformy HSP70, aby byla zachována stejná metoda vyhodnocování výsledků.

Oproti výsledkům pro HSP70 byla detekce HSP17,6 neúspěšná (Obr. 21). Tento pokus byl dvakrát zopakován a v obou případech byl výsledek stejný. Je možné, že primární protilátka byla již nefunkční, ačkoli byla podle pokynů výrobce uchovávána v mrazicím boxu při -20 °C. Přenos HSP70 na membránu také nebyl příliš uspokojivý. Detekce smHSP pomocí citlivější křenové peroxidasy, která nebyla z časových důvodů provedena, by mohla teoreticky poskytnout lepší výsledky.



Obr. 21: Vliv teplotního stresu na hladiny HSP17,6 v listech rajčete. A: Imunochemická detekce HSP17,6 na membráně. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení teplotního stresu. Nad popisky časových intervalů je uvedeno, o jaký druh rajčete se jedná. B: Detekce proteinů na blotovací membráně činidlem Ponceau S po přenosu proteinů z gelu. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení teplotního stresu. Nad popisky časových intervalů je uvedeno, o jaký druh rajčete se jedná.

4.2.2 Hladiny HSP v listech rajčete vystavených kyselině salicylové

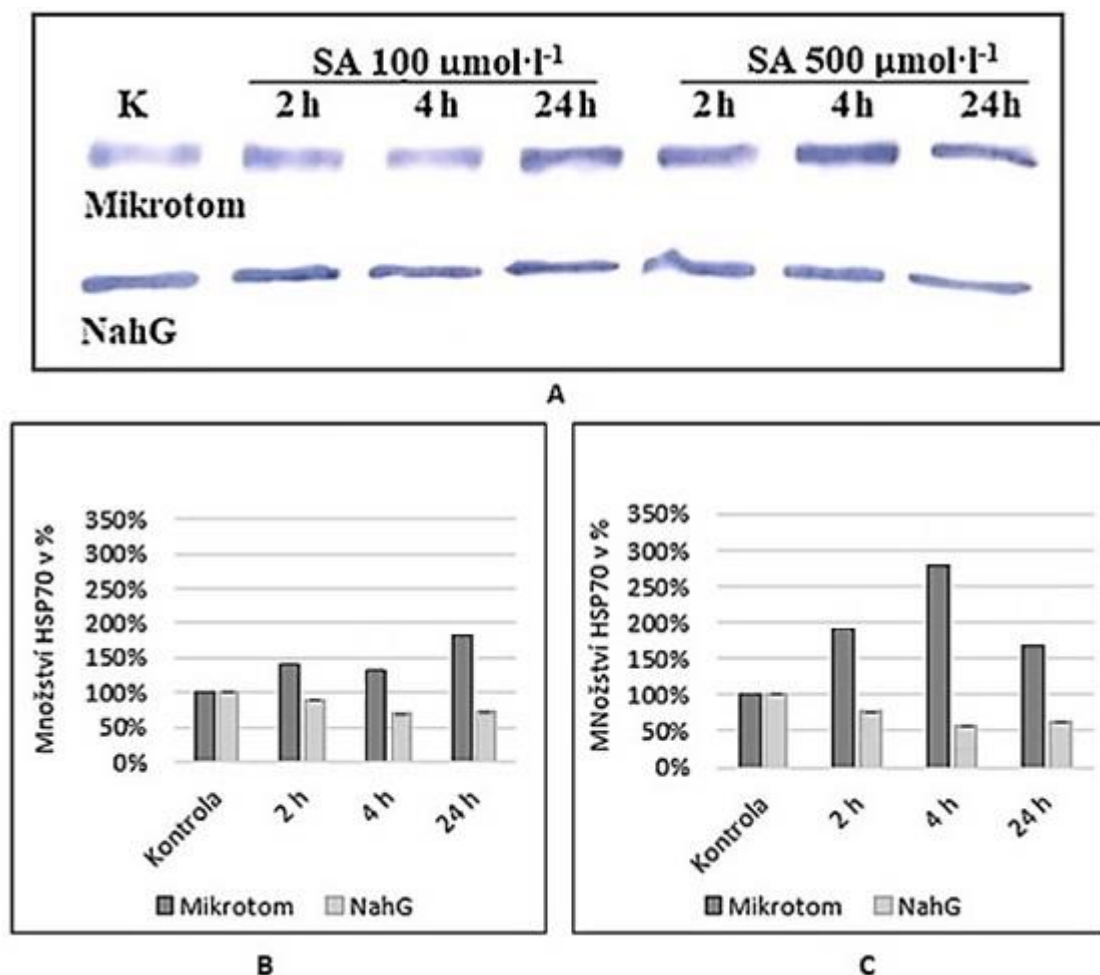
Na rostliny *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a nahG rostliny bylo působeno postřikem kyselinou salicylovou o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, která na rostliny působila v časových intervalech 2, 4 a 24 h při laboratorní teplotě. Kontrolní rostlina nebyla ošetřena kyselinou salicylovou. Listy byly zpracovány do extraktů, jež byly upraveny pro podmínky SDS-PAGE. Elektroforéza byla provedena se 7% dělicím a 4% zaostřovacím gelem. Do jamek byly všechny vzorky nanášeny v množství $10 \mu\text{l}$. Po elektroforéze byly proteiny přebíleny z gelu na membránu a úspěšnost přenosu byla ověřena činidlem Ponceau S. Následně byly membrány blokovány 5% nízkotučným mlékem.

Poté byly inkubovány s roztokem primární protilátky (primární myší anti-HSP70 protilátka/primární králičí anti-HSP17,6 protilátka). Následovala inkubace s příslušným

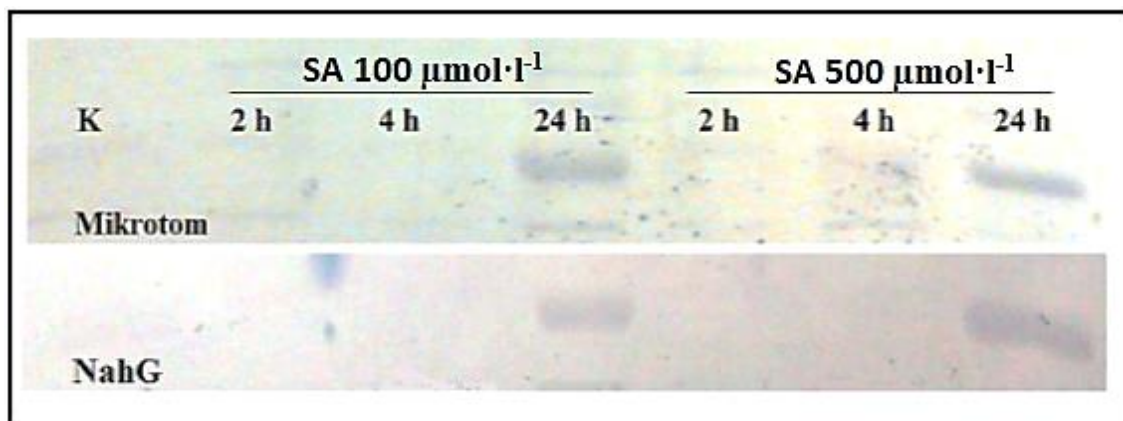
roztokem sekundární protilátky (sekundární kozí anti-myší IgG protilátka značená alkalickou fosfatou/sekundární anti-králičí IgG protilátka značená alkalickou fosfatou). Vizualizace bandů byla provedena s využitím roztoku NBT-BCIP. Následovalo densitometrické vyhodnocení v programu Image Studio Lite Ver 5,2.

Působení kyseliny salicylové v obou koncentracích vyvolalo ve všech časových intervalech u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom zvýšení hladin konstitutivních HSP70 oproti kontrole, naopak u nahG rostlin došlo k jejich snížení (Obr. 22).

Densitometrické vyhodnocení u smHSP nebylo prováděno u žádných experimentů v diplomové práci, jelikož u některých časových intervalů nejsou bandy ani okem patrné. Nejvyšší hladina HSP17,6 byla po působení obou koncentrací kyseliny salicylové po 24 h (Obr 23).



Obr. 22: Vliv postřiku kyselinou salicylovou na hladiny HSP70. SA byla použita v koncentracích 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. A: Detekce HSP70 na membráně. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení teplotního stresu. Nad popisky časových intervalů je uvedeno, o jakou koncentraci kyseliny salicylové se jednalo. Pod bandy je uveden typ rajčete, na který kyselina salicylová působila. B: Densitometrické vyhodnocení hladin HSP70 po působení kyseliny salicylové o koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. C: Densitometrické vyhodnocení hladin HSP70 po působení kyseliny salicylové o koncentraci 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kontrola brána jako 100 %.



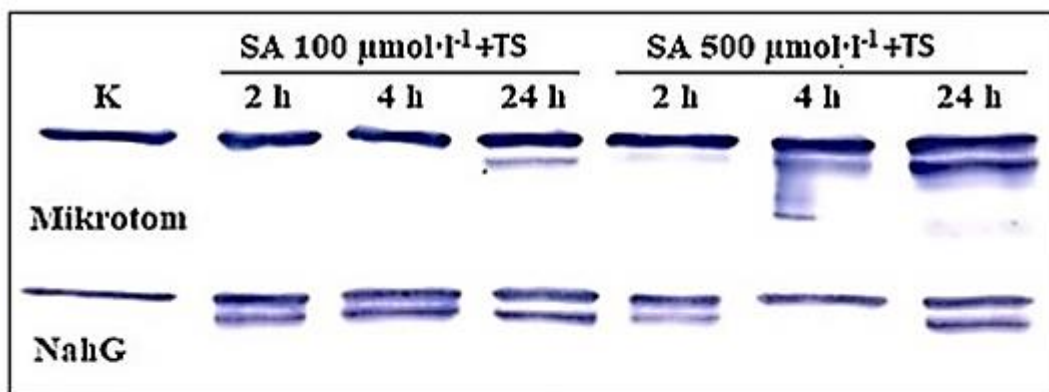
Obr. 23: Vliv postřiku kyselinou salicylovou na hladiny HSP17,6. SA byla použita v koncentracích 100 µmol·l⁻¹ a 500 µmol·l⁻¹. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení kyseliny salicylové. Nad popisky časových intervalů je uvedeno, o jakou koncentraci kyseliny salicylové se jednalo. V dolní části obrázku je uveden druh rajčete, na který kyselina salicylová působila.

4.2.3 Vliv současného působení kyseliny salicylové a teplotního stresu na hladiny HSP

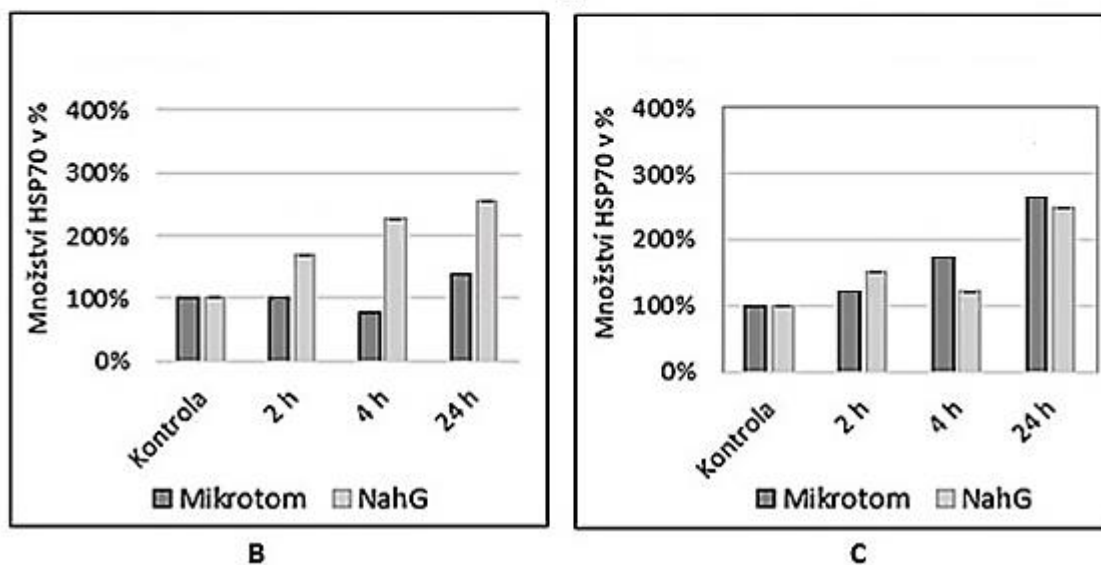
Na rostliny *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a nahG rostliny bylo působeno postřikem kyselinou salicylovou o koncentraci 100 µmol·l⁻¹ a 500 µmol·l⁻¹ a následně podrobena teplotnímu stresu v časových intervalech 2, 4 a 24 h. Jedna rostlina nebyla ošetřena kyselinou salicylovou ani podrobena teplotnímu stresu a sloužila jako kontrola. Extrakty z listů byly upraveny pro podmínky SDS-PAGE. Elektroforéza byla provedena se 7% dělicím a 4% zaostřovacím gelem. Do jamek byly vzorky nanášeny v množství 10 µl.

Po proběhnutí elektroforézy, kontrole úspěšnosti přenosu proteinů z gelu na membránu činidlem Ponceau S a blokování membrány 5% nízkotučným mlékem byly membrány inkubovány s roztokem primární protilátky (primární myší anti-HSP70 protilátka/králičí primární anti-HSP17,6 protilátka). Následovala inkubace se sekundárními protilátkami (sekundární kozí anti-myší IgG protilátka značená alkalickou fosfátasou/anti-králičí IgG protilátka značená alkalickou fosfátasou). Vizualizace bandů HSP byla provedena s využitím roztoku NBT-BCIP, následovala dokumentace výsledků a densitometrické vyhodnocení programem Image Studio Lite Ver 5.2 .

Působení kombinace teplotního stresu a kyseliny salicylové v koncentracích 100 µmol·l⁻¹ a 500 µmol·l⁻¹ vyvolalo v listech rostlin kromě produkce konstitutivní izoformy také teplotně indukovanou izoformu HSP70, ale pouze v některých časových intervalech. U kontroly byla přítomna pouze konstitutivní izoforma (Obr. 24).



A

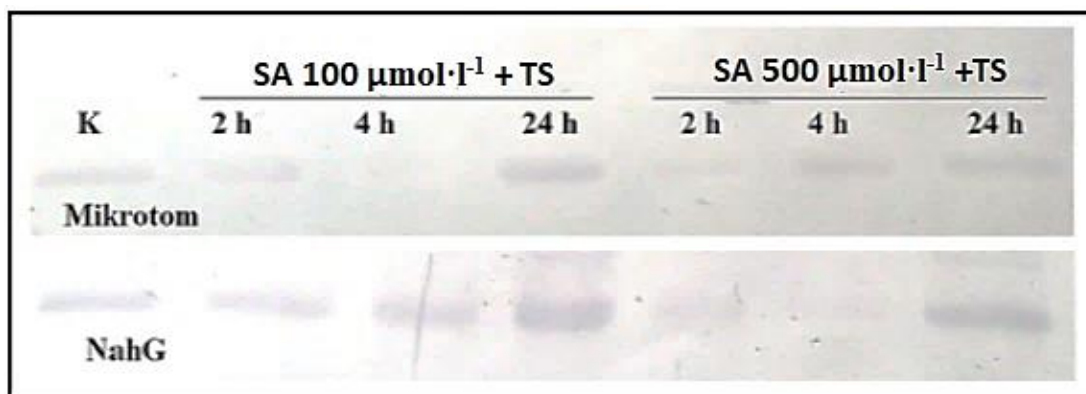


B

C

Obr. 24: Vliv postřiku kyselinou salicylovou a teplotního stresu na hladiny HSP70. SA byla použita v koncentracích $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. A: Detekce HSP70 na membráně. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení teplotního stresu. Nad popisky časových intervalů je uvedeno, o jakou koncentraci kyseliny salicylové se jednalo. Pod bandy je uveden typ rajčete, na který kyselina salicylová působila. B: Densitometrické vyhodnocení hladin HSP70 po působení kyseliny salicylové o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a teplotního stresu. C: Densitometrické vyhodnocení hladin HSP70 po působení kyseliny salicylové o koncentraci $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a teplotního stresu. Kontrola brána jako 100 %.

Hladiny HSP17,6 byly nejvyšší po 24 h působení teplotního stresu a kyseliny salicylové v obou koncentracích. V porovnání s výsledky detekce HSP17,6 při samotném působení kyseliny salicylové byly bandy přítomny i v dalších časových intervalech (Obr. 25).



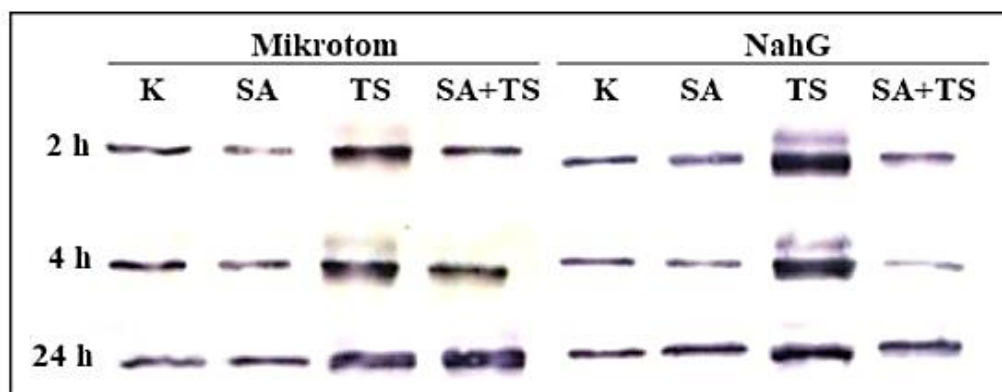
Obr. 25: Vliv postřiku kyselinou salicylovou a teplotního stresu na hladiny HSP17,6. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení teplotního stresu. Nad popisky časových intervalů je uvedeno, o jakou koncentraci kyseliny salicylové se jednalo. Pod bandy je uveden druh rajčete, na který kyselina salicylová působila.

4.2.3.1 Vliv kyseliny salicylové na expresi HSP70 při teplotním stresu

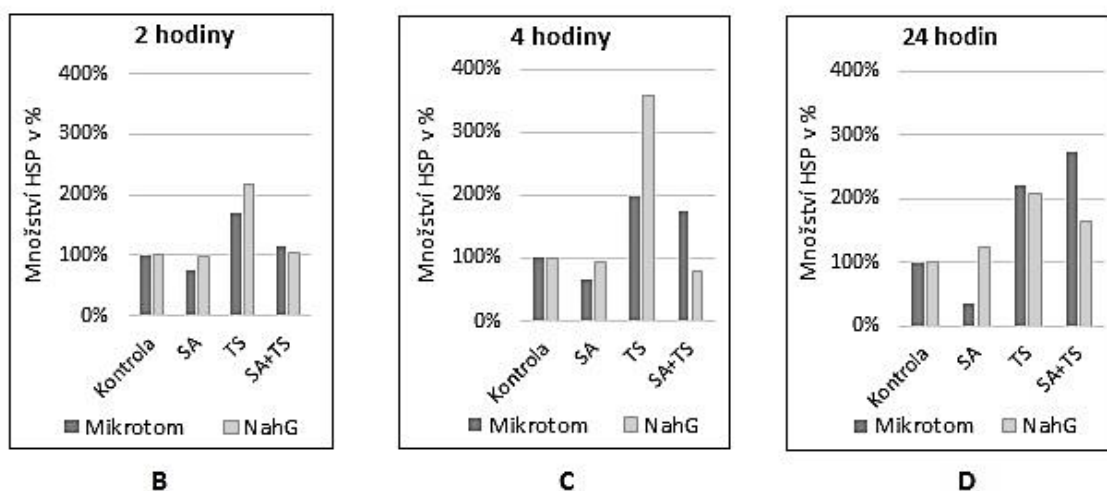
Extrakty rostlin vystavených teplotnímu stresu, kyselině salicylové o koncentraci 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a jejich kombinaci po dobu 2, 4 a 24 h, upravené pro SDS-PAGE, byly nanášeny do jamek tak, aby bylo možno bandy následně dobře porovnat. Byla provedena SDS-PAGE s využitím 10% dělicího a 4% zaostřovacího gelu. Příslušné složení dělicího gelu bylo vybráno z důvodu použití 10% gelu v experimentu uvedeném v odborné publikaci (Snyman a Cronje, 2008), kterým byl tento pokus inspirován. Pro zachování určité systematičnosti výsledků by ale bylo vhodné příště tento experiment provést v 7% dělicím gelu, aby došlo k separaci HSP70 na dvě izoformy.

Proteiny byly přebíjeny z gelu na membránu. Následně proběhlo blokování membrány 5% nízkotučným mlékem a detekce HSP70 primární anti-HSP70 protilátkou produkovanou v myši a sekundární anti-myší IgG protilátkou značenou alkalickou fosfatou produkovanou v koze. Vizualizace bandů HSP70 byla iniciována přidávkem roztoku NBT-BCIP (Obr. 26). Výsledek byl zdokumentován a densitometricky vyhodnocen programem Image Studio Lite Ver 5.2.

Výsledky experimentu, kde byly vedle sebe na gel nanášeny extrakty listů, na které působily faktory kyseliny salicylové, teplotního stresu a jejich kombinace, ukazují, že po 24 h působení kyseliny salicylové o koncentraci 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a teplotního stresu na *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom byla hladina HSP70 vyšší než u působení samotného teplotního stresu. Naopak u nahG rostliny k tomuto procesu vůbec nedochází (Obr. 26).



A



B

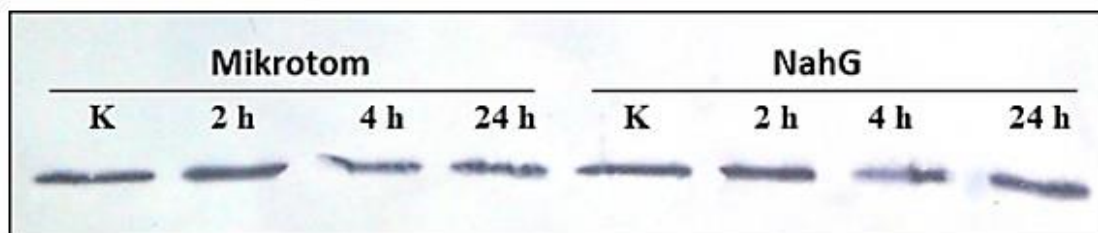
C

D

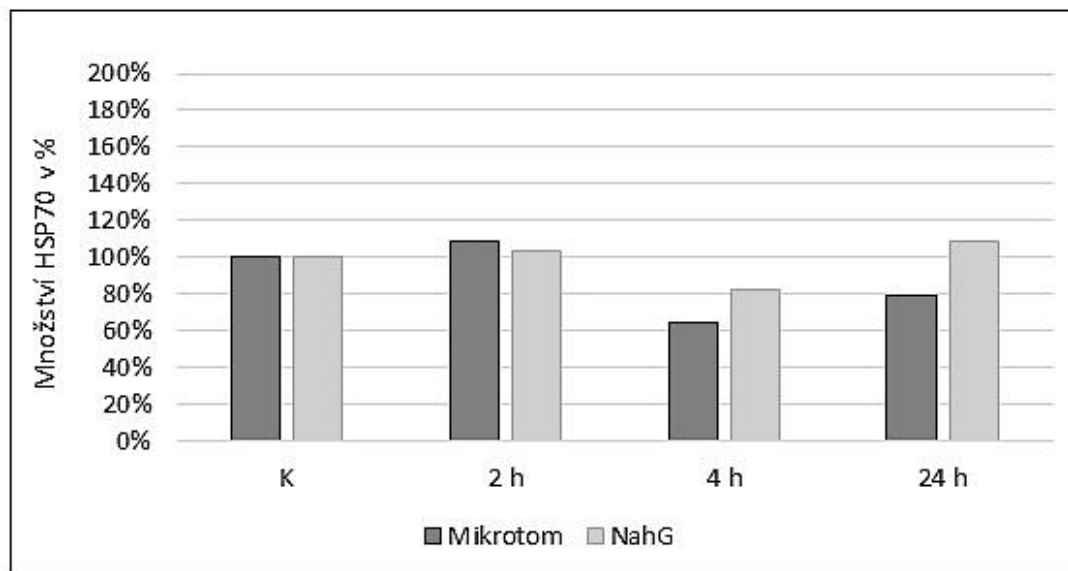
Obr. 26: Vliv postřiku kyselinou salicylovou, teplotního stresu a jejich kombinace na hladiny HSP70. A: Detekce HSP70 na membráně. K = kontrola; SA = kyselina salicylová; TS = teplotní stres; SA+TS = kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu. Vlevo na obrázku je uvedena doba působení faktorů. Nad popisky působení faktorů je uveden typ rajčete. B: Densitometrické vyhodnocení po 2 h působení faktorů. C: Densitometrické vyhodnocení po 4 h působení faktorů. D: densitometrické vyhodnocení po 24 h působení faktorů. Kontrola brána jako 100 %.

4.2.4 Hladiny HSP v listech infikovaných patogenem

Listy rostlin *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a nahG rostlin byly vloženy do Petriho misky vystlané filtračním papírem a vatou, která byla navlhčena vodou. Poté byly inokulovány patogenem *P. neolycopersici*, který působil v časových intervalech 2, 4 a 24 h. Následně byly zpracovány do extraktů, jež byly upraveny pro podmínky SDS-PAGE. Po elektroforéze, v přítomnosti 7% dělicího a 4% zaostřovacího gelu, byly proteiny přebíleny z gelu na membránu, přenos byl zkontrolován činidlem Ponceau S a následovalo blokování membrány 5% nízkotučným mlékem.



A



B

Obr. 27 Vliv působení patogenu na hladiny HSP70. A: Detekce HSP70 na membráně. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení patogenu. Nad popisky časových intervalů je uvedeno, o jaký typ rostliny se jednalo. B: Densitometrické vyhodnocení HSP70. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení patogenu. Kontrola brána jako 100 %.

Konstitutivní HSP70 byly detekovány pomocí primární myší anti-HSP70 protilátky a následně sekundární kozí anti-myší IgG protilátky značené alkalickou fosfatase. Vizualizace bandů HSP70 byla provedena s využitím roztoku NBT-BCIP. Výsledky byly zdokumentovány a bandy densitometricky vyhodnoceny programem Image Studio Lite Ver 5.2.

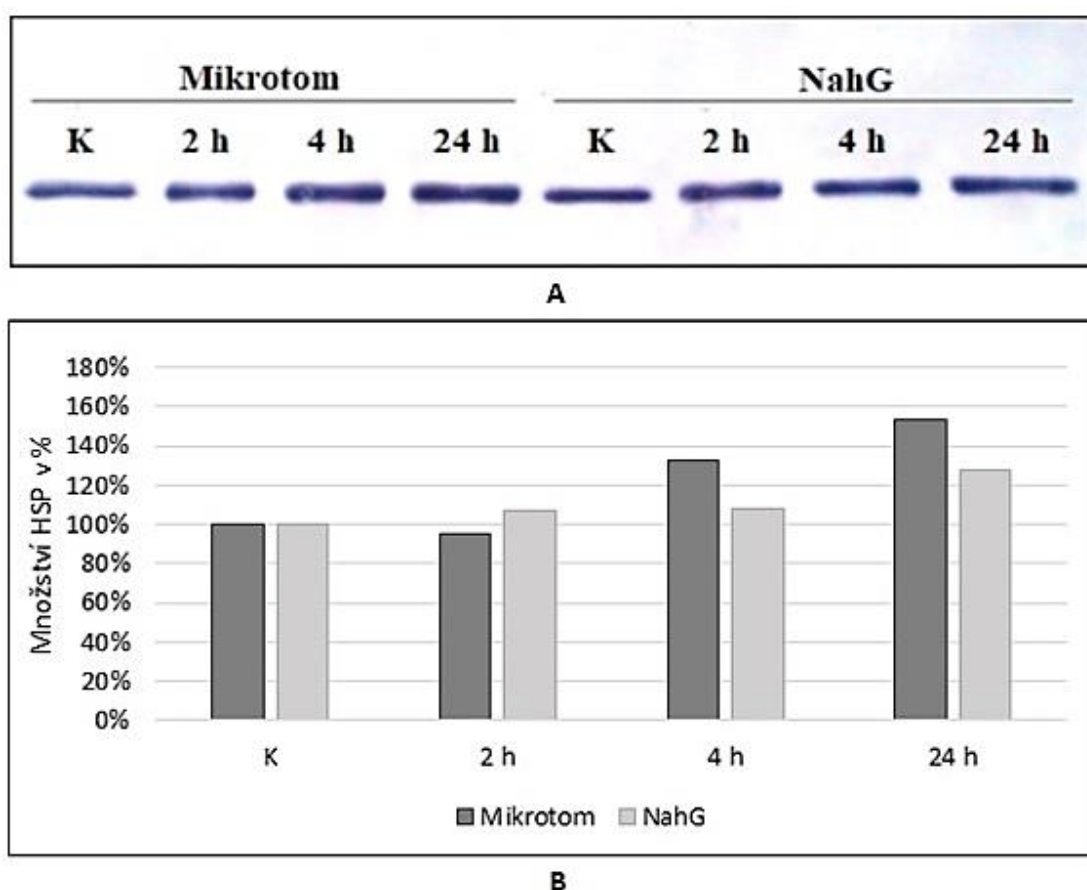
Tento samý experiment byl proveden s použitím příslušných protilátek na detekci HSP17,6, které se ale nepodařilo detekovat.

Působení patogenu nemělo výrazný vliv na změnu hladin HSP70 oproti kontrolní rostlině u žádného typu rajčete (Obr. 27).

4.2.5 Vliv současného působení kyseliny salicylové a patogenu na hladiny HSP

Listy rostlin *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a nahG rostliny byly vloženy do Petriho misky vystlané filtračním papírem a vatou navlhčenou roztokem kyseliny salicylové o koncentraci $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Poté byly inokulovány patogenem *P. neolycopersici*, který působil v časových intervalech 2, 4 a 24 h. Extrakty z listů byly upraveny pro podmínky SDS-PAGE.

Po elektroforéze v 7% dělicím a 4% zостřovacím gelu, přebíhotování proteinů z gelu na membránu a kontrole úspěšnosti přenosu proběhlo blokování membrány 5% nízkotučným mlékem. Následovala inkubace v primární myši anti-HSP70 protilátce, a pak v sekundární anti-myši IgG protilátce značené alkalickou fosfatase. Vizualizace bandů HSP70 byla provedena s využitím roztoku NBT-BCIP. Výsledek byl zdokumentován a densitometricky vyhodnocen programem Image Studio Lite Ver 5.2.



Obr. 28: Vliv působení kyseliny salicylové a patogenu na hladiny HSP70. A: Detekce HSP70 na membráně. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení patogenu. Nad popisky časových intervalů je uvedeno, o jaký typ rostliny se jednalo. B: Densitometrické vyhodnocení HSP70. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení patogenu. Kontrola brána jako 100 %.

Kyselina salicylová v kombinaci s patogenem způsobila postupný nárůst hladin konstitutivních HSP70 oproti kontrole u obou typů rajčat (Obr. 28). Experiment byl proveden i s použitím příslušných protilátek na detekci HSP17,6. Tyto proteiny se nepodařilo detekovat.

4.2.6 Vliv současného působení patogenu a teplotního stresu na hladiny HSP

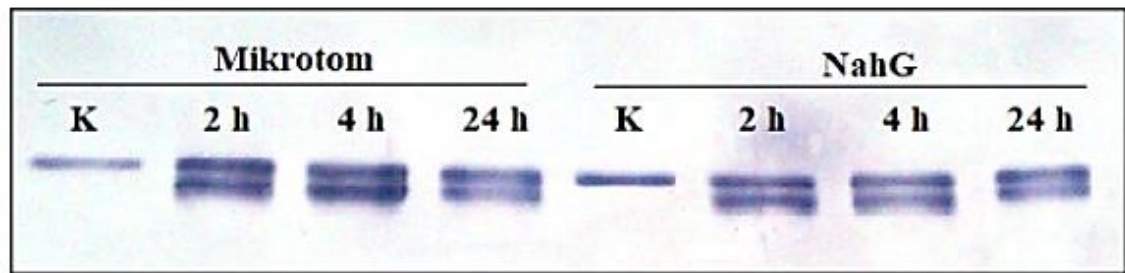
Listy rostlin *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a nahG rostliny byly vloženy do Petriho misky vystlané filtračním papírem a vatou, která byla navlhčena vodou. Poté byly inokulovány patogenem *P. neolycopersici*, který působil na listy v časových intervalech 2, 4 a 24 h.

Následně byly listy zpracovány do extraktů, jež byly upraveny pro podmínky SDS-PAGE. Po elektroforéze byly proteiny přebíjeny z gelu na membránu. Přenos byl zkontrolován činidlem Ponceau S a následovalo zablokování membrány 5% nízkotučným mlékem.

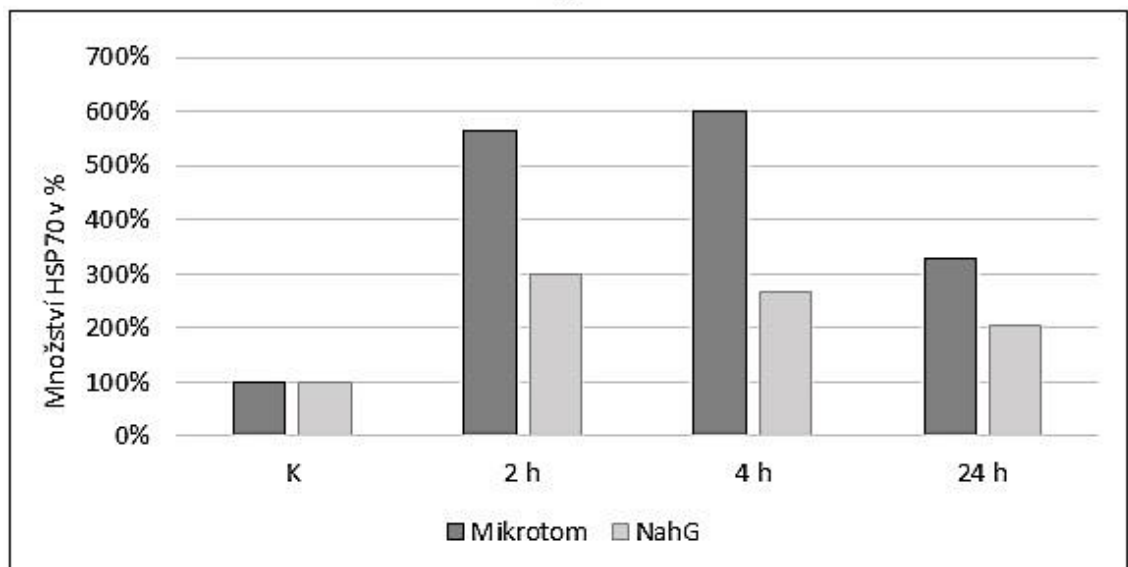
Proteiny HSP70 byly detekovány pomocí primární myší anti-HSP70 protilátky a následně sekundární kozí anti-myší IgG protilátky značené alkalickou fosfatase. Vizualizace bandů HSP70 byla provedena s využitím roztoku NBT-BCIP. Poté byla membrána zdokumentována a bandy byly densitometricky vyhodnoceny programem Image Studio Lite Ver 5.2.

Ten samý experiment byl proveden i s použitím příslušných protilátek na detekci HSP17,6, ale tyto proteiny se nepodařilo detekovat.

Působení patogenu spolu s teplotním stresem na listy rostlin mělo na hladinu HSP70 u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom výrazný vliv v prvních dvou časových intervalech, kdy došlo k výraznému nárůstu hladin HSP70, až šestinásobnému vůči kontrolní rostlině. Po 24 h působení následoval pokles, který ale stále převyšoval kontrolu. Ačkoliv u nahG hladiny HSP70 také převyšovaly ve všech časových intervalech hladinu kontroly, nárůst v prvních dvou intervalech zdaleka nebyl tak významný jako u nemutantní rostliny. Díky působení teplotního stresu došlo i k produkci konstitutivních HSP70 (Obr. 29).



A



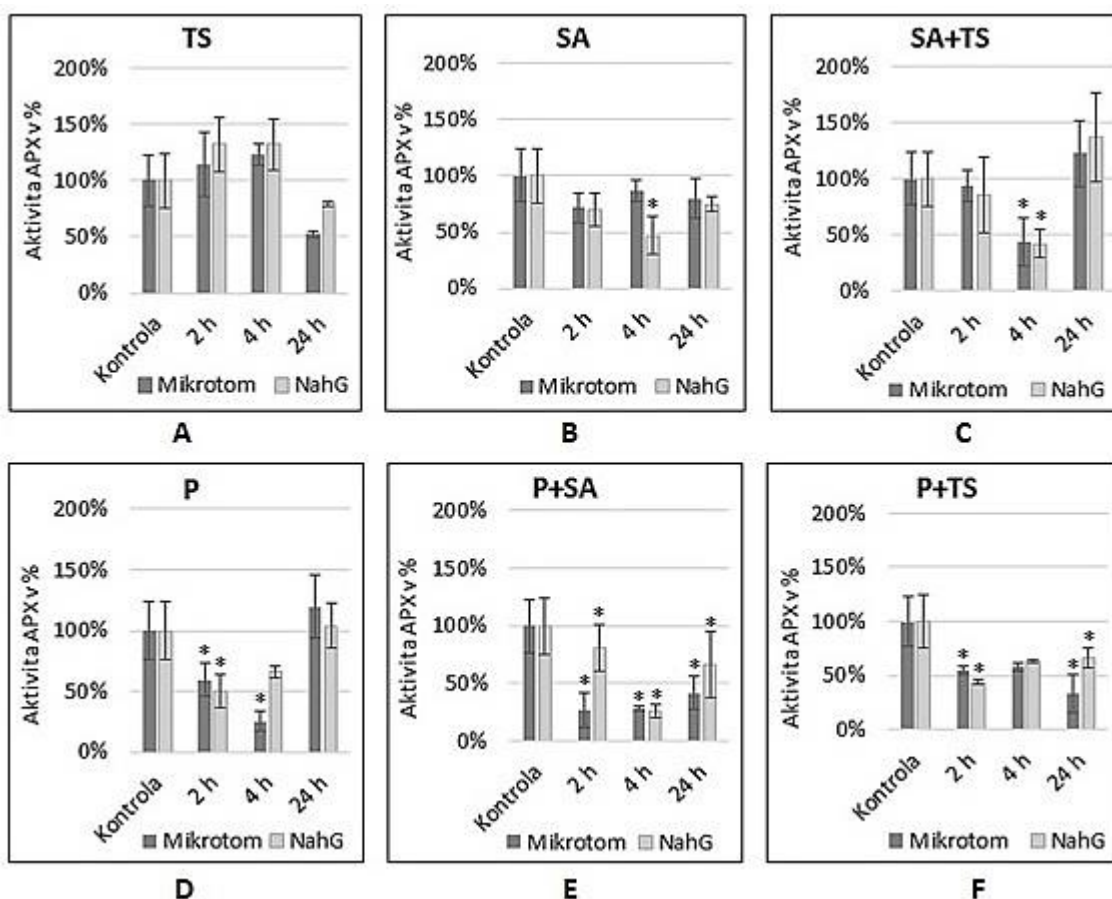
B

Obr. 29: Vliv působení patogenu a teplotního stresu na hladiny HSP70. A: Detekce HSP70 na membráně. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení patogenu. Nad popisky časových intervalů je uveden typ rostliny. B: Densitometrické vyhodnocení HSP70. K = kontrola; 2 h, 4 h, 24 h = doba působení patogenu. Kontrola brána jako 100 %.

4.3 Měření aktivity enzymů APX a GSNOR

4.3.1 Měření aktivity APX

Extrakty byly připraveny ze zamražených listů rostlin, na které působily faktory, jako jsou teplotní stres (40 °C), kyselina salicylová o koncentraci 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kombinace teplotního stresu a kyseliny salicylové, dále pak patogen *P. neolycopersici*, kombinace patogenu a kyseliny salicylové a patogenu a teplotního stresu. Časové intervaly působení těchto faktorů na rostliny rajčete *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a mutanta nahG byly 2, 4 a 24 h.



Obr. 30: Vliv působení různých faktorů na specifickou aktivitu askorbátperoxidasy. A: Vliv působení teplotního stresu na aktivitu APX. B: Vliv působení kyseliny salicylové na aktivitu APX. C: Vliv působení kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu na aktivitu APX. D: Vliv působení patogenu na aktivitu APX. E: Vliv působení kombinace patogenu a kyseliny salicylové na aktivitu APX. F: Vliv působení patogenu a teplotního stresu na aktivitu APX. Kontrola brána jako 100 %. Symbol * označuje statisticky významně odlišné hodnoty vůči kontrole.

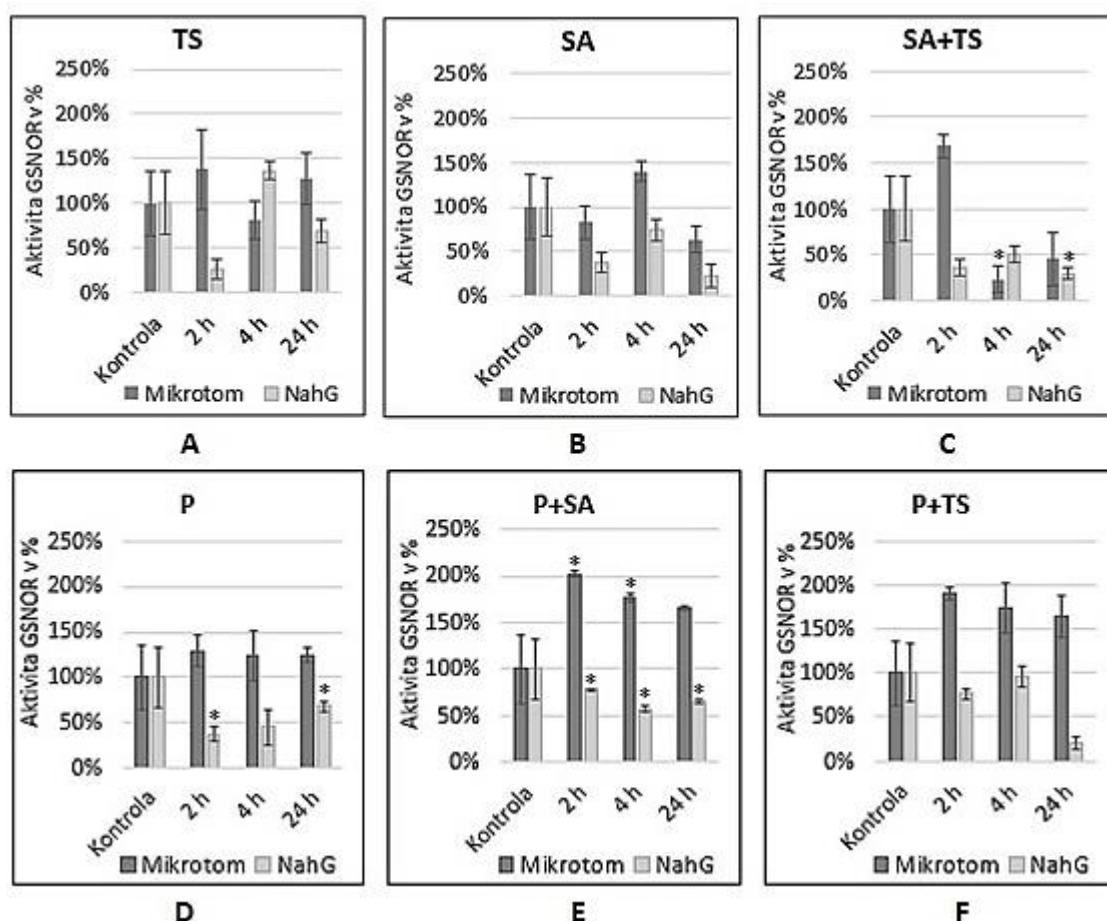
Hodnoty specifické aktivity askorbátperoxidasy jednotlivých vzorků byly převedeny na procenta, hodnota specifické aktivity kontrolní rostliny byla brána jako 100 %. Výsledky analýzy vzorků, na které bylo působeno příslušnými faktory, byly statisticky vyhodnoceny vůči kontrole t-testem.

Působení teplotního stresu na listy obou typů rajčat způsobilo v prvních dvou časových intervalech nárůst aktivity APX vůči kontrole, po 24 h nastal pokles (Obr. 30, A). Postřik kyselinou salicylovou snížil aktivitu APX vůči kontrole ve všech časových intervalech (Obr. 30, B). Za podmínek působení kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu byl pozorován v prvních dvou časových intervalech pokles aktivity APX, po 24 h následovalo její zvýšení (Obr. 30, C). Působení samotného patogenu mělo podobný průběh změn aktivity enzymu jako u předchozího případu (Obr. 30, D). Kombinace

patogenu a kyseliny salicylové měla za následek snížení aktivity enzymu APX pod aktivitu kontroly (Obr 30. E). Působení patogenu a teplotního stresu také snížilo aktivitu enzymu oproti kontrole ve všech časových intervalech u obou typů rajčat (Obr. 30, F).

4.3.2 Měření aktivity GSNOR

Extrakty byly získány ze zamražených listů rostlin, na které bylo působeno teplotním stresem, kyselinou salicylovou o koncentraci $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kombinací teplotního stresu a kyseliny salicylové, dále pak patogenem *P. neolyopersici*, kombinací patogenu a kyseliny salicylové a patogenu a teplotního stresu. Časové intervaly působení těchto faktorů na rostliny rajčete *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a mutanta nahG byly 2, 4 a 24 h.



Obr. 31: Vliv působení různých faktorů na specifickou aktivitu S-nitrosoglutathionreduktasy. A: Vliv působení teplotního stresu na aktivitu GSNOR. B: Vliv působení kyseliny salicylové na aktivitu GSNOR. C: Vliv působení kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu na aktivitu GSNOR. D: Vliv působení patogenu na aktivitu GSNOR. E: Vliv působení kombinace patogenu a kyseliny salicylové na aktivitu GSNOR. F: Vliv působení patogenu a teplotního stresu na aktivitu GSNOR. Kontrola brána jako 100 %. Symbol * označuje statisticky významně odlišné hodnoty vůči kontrole.

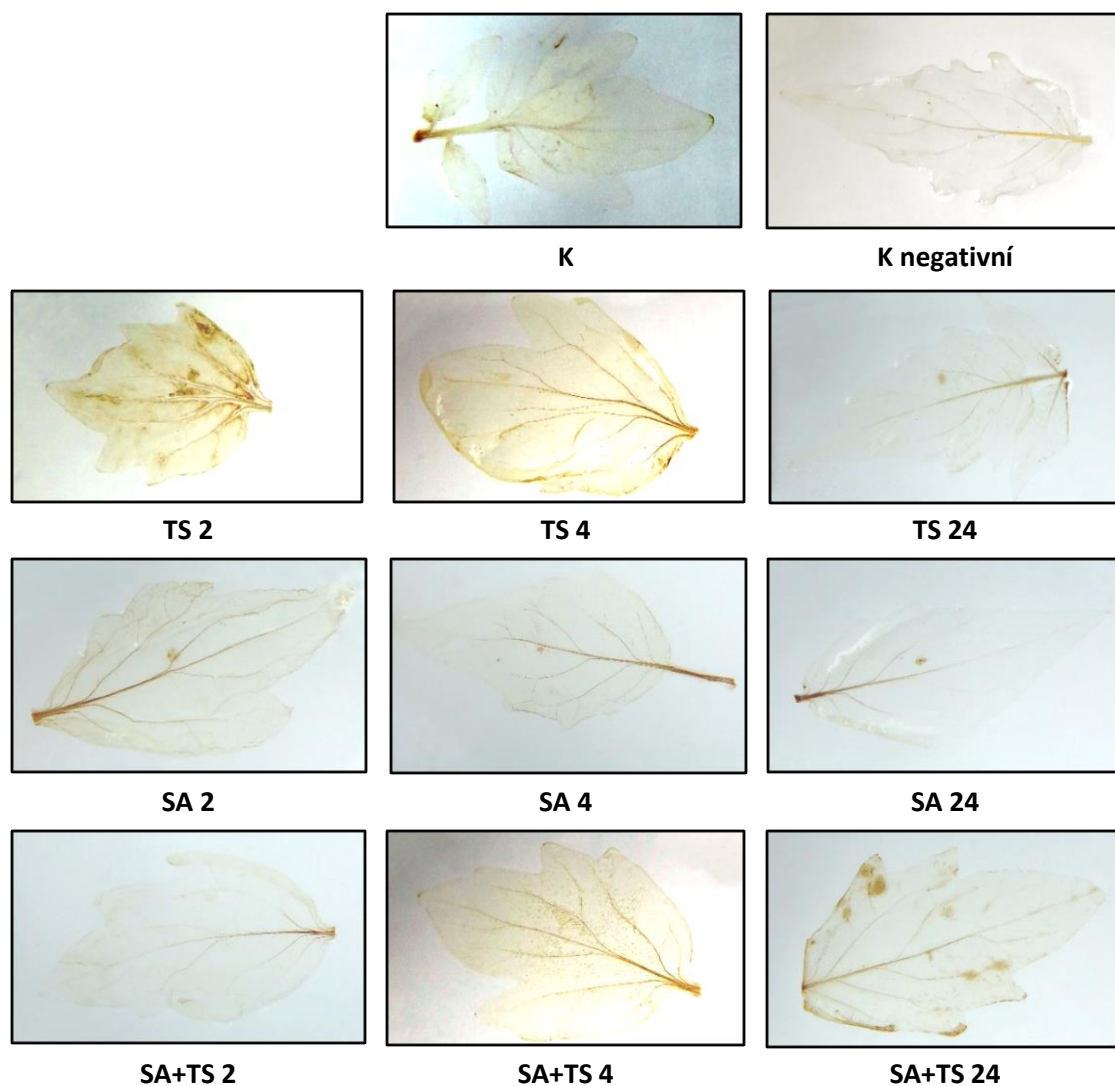
Hodnoty specifické aktivity askorbátperoxidasy jednotlivých vzorků byly převedeny na procenta, hodnota specifické aktivity kontrolní rostliny byla brána jako 100 %. Výsledky vzorků, na které bylo působeno příslušnými faktory byly statisticky vyhodnoceny vůči kontrole t-testem.

Působení teplotního stresu mělo za následek u rostliny nemutantní *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom zvýšení aktivity GSNOR po 2 h působení vůči kontrole, po 4 h následoval pokles pod aktivitu kontroly a v posledním intervalu opět nárůst. U nahG rostliny bylo dosaženo zvýšení aktivity nad kontrolu až po 4 h, v ostatních časových intervalech nebyla aktivita kontroly překročena (Obr. 31, A). Postřik kyselinou salicylovou nezpůsobil zvýšení aktivity GSNOR, pouze u nemutantního typu rajčete byl pozorován nárůst vůči kontrole po 4 h působení (Obr. 31, B). Kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu způsobila zvýšení aktivity GSNOR vůči kontrole pouze v prvním časovém intervalu u nemutantní formy *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, aktivita GSNOR v ostatních časových intervalech u obou typů rajčat byla vůči kontrole nižší (Obr. 31, C). Působení samotného patogenu vyvolalo v listech nemutantní rostliny zvýšení aktivity enzymu ve všech časových intervalech vůči kontrole, naopak u nahG rostliny byla aktivita ve všech časech působení snížena (Obr. 31, D). Podobný výsledek byl zaznamenán i u působení kombinace patogenu a kyseliny salicylové a patogenu a teplotního stresu (Obr. 31, E, F).

4.4 Vliv teplotního stresu, kyseliny salicylové a infekce patogenem na produkci ROS a RNS v listech rajčete

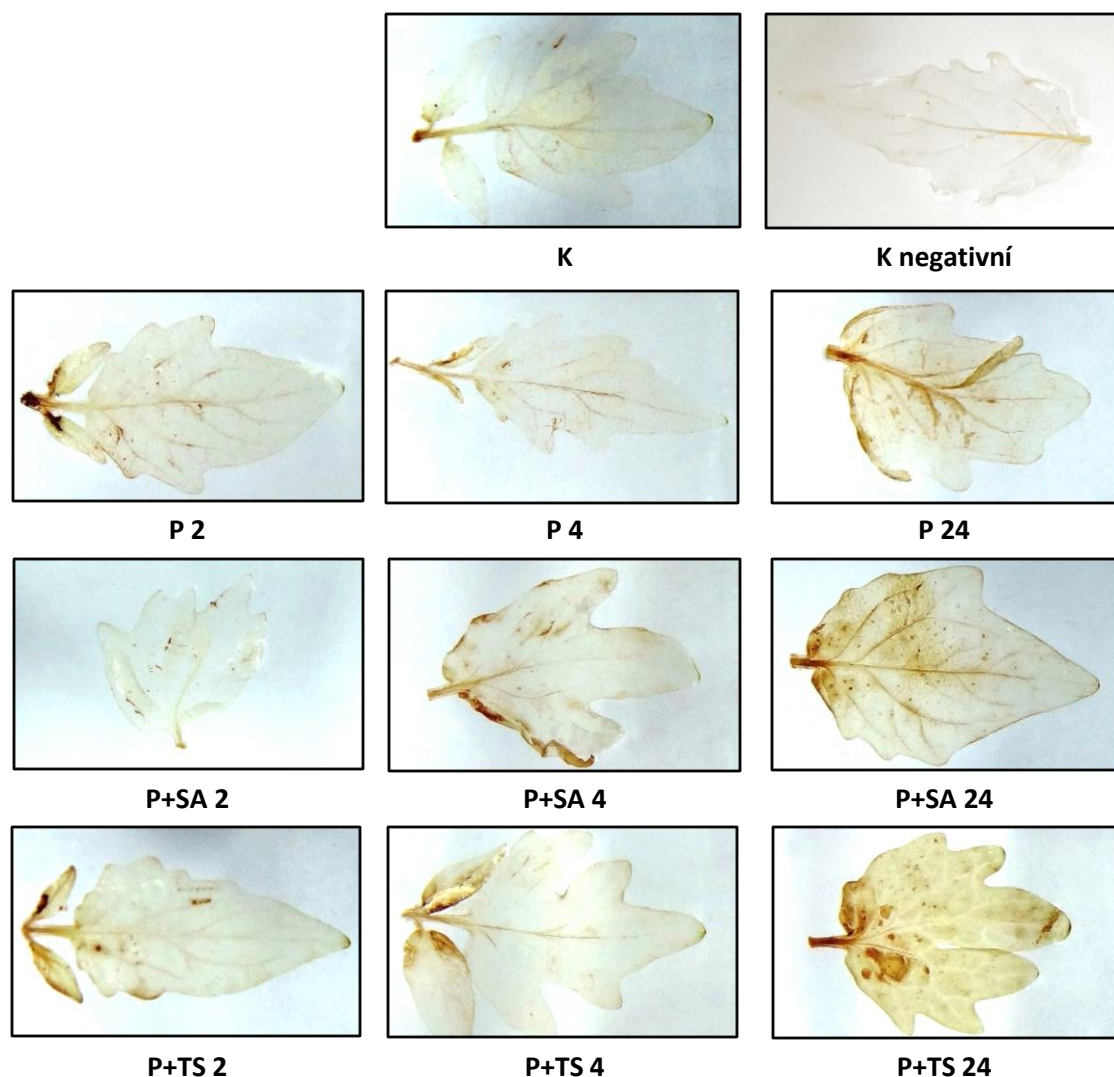
4.4.1 Histochemická detekce peroxidu vodíku

Peroxid vodíku byl detekován v čerstvých vzorcích listů rajčete *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom nemutantního typu, na které bylo působeno teplotním stresem, kyselinou salicylovou či kombinací teplotního stresu a kyseliny salicylové v časových intervalech 2, 4 a 24 h, roztokem DAB. Rostlinný materiál byl inkubován v barvicím roztoku DAB a následně odbarven v odbarvovacím roztoku. Přítomnost H₂O₂ se projevila hnědým zbarvením.



Obr. 32: Detekce H_2O_2 roztokem DAB v listech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po působení teplotního stresu (TS), kyseliny salicylové (SA) a jejich kombinace (SA+TS); K = kontrola, K negativní = kontrola s přidavkem kyseliny askorbové.

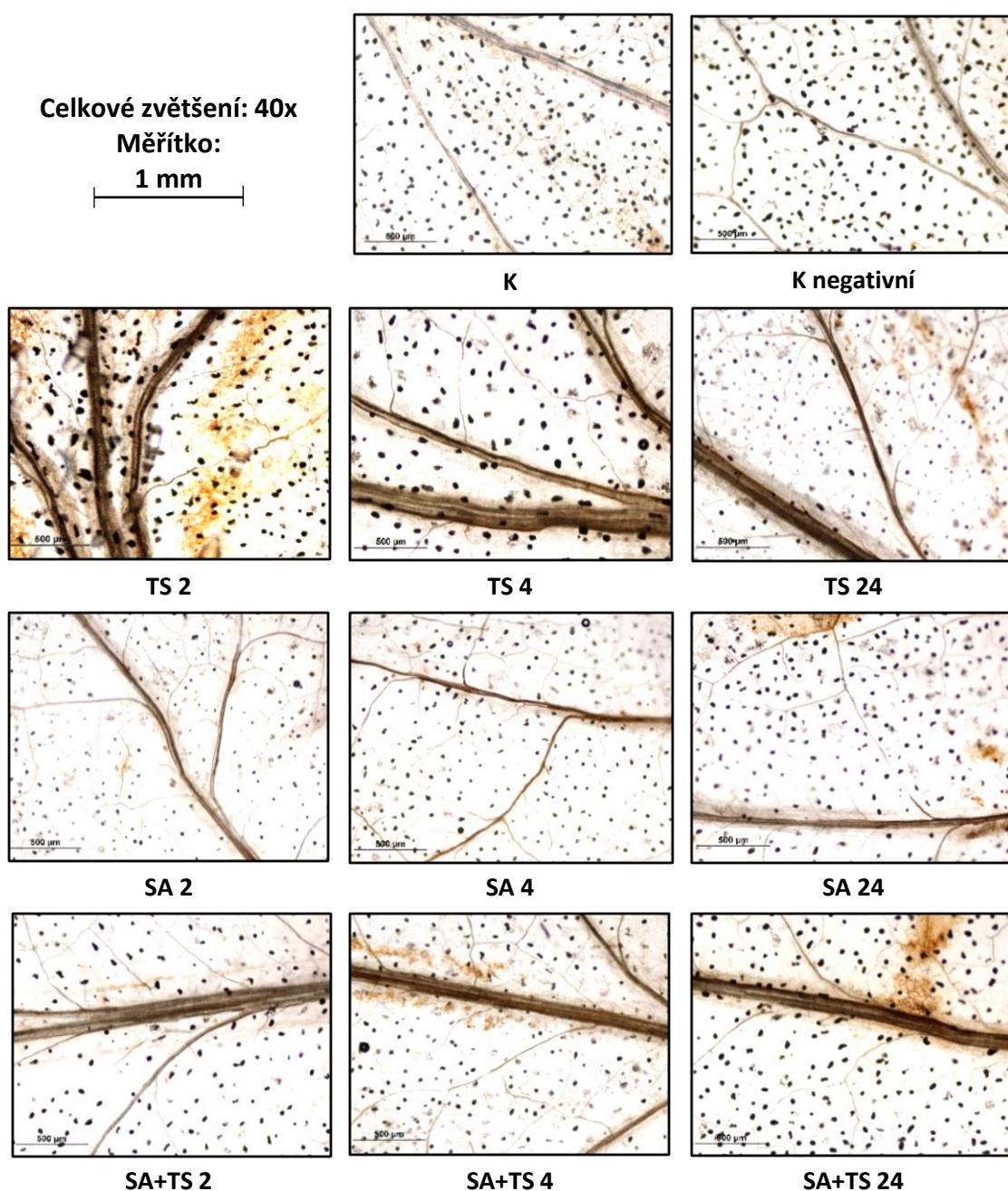
Vysoká akumulace peroxidu vodíku v listech vůči kontrole byla zaznamenána při působení teplotního stresu v časovém intervalu 2 h. Postupně s časem akumulace peroxidu vodíku za podmínek působení tohoto stresového faktoru klesala. Působení postřiku kyselinou salicylovou mělo za následek zhnědnutí žilnatiny a drobné hnědé skvrnky i mimo ni, které u kontroly přítomny nebyly. Akumulace peroxidu vodíku za podmínek působení kyseliny salicylové a teplotního stresu rostla s časem. Po 24 h jsou na listu viditelné větší hnědé skvrny, žilnatina je také hnědě zbarvena (Obr. 32).



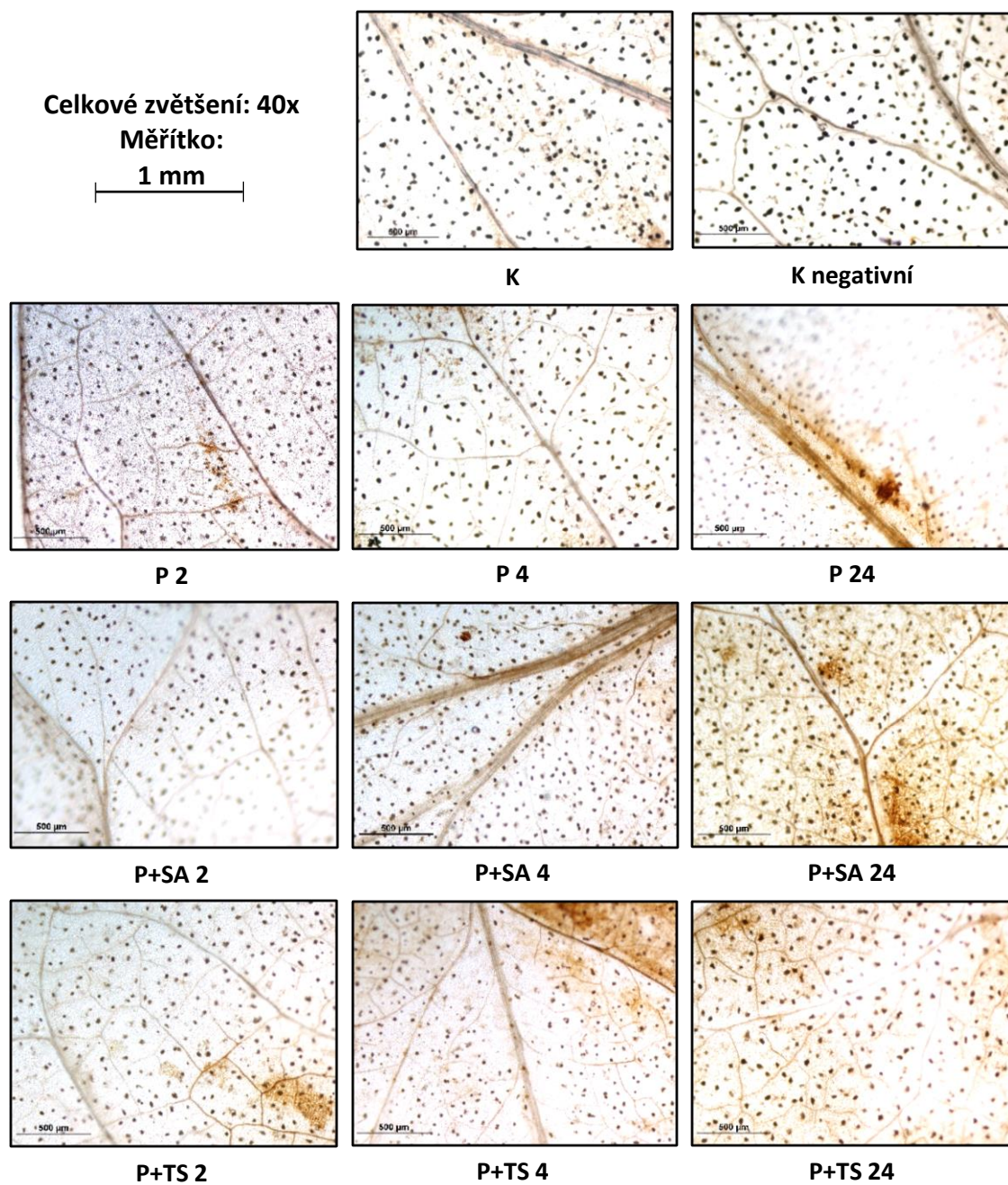
Obr. 33: Detekce peroxidu vodíku roztokem DAB v listech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po působení patogenu (P), patogenu a kyseliny salicylové (P+SA) a patogenu a teplotního stresu (P+TS); K = kontrola, K negativní = kontrola s přidavkem kyseliny askorbové.

Působení patogenu a patogenu v kombinaci s kyselinou salicylovou či teplotním stresem vyvolalo u většiny listů akumulaci peroxidu vodíku vyšší než u kontrolního listu. Samotný patogen způsobuje nejvyšší akumulaci peroxidu vodíku v posledním časovém intervalu, kdy jsou kromě zhnědlé žilnatiny na listu patrné i hnědé skvrny okolo ní. V případě působení patogenu a kyseliny salicylové v prvním časovém intervalu nedochází k žádným výrazným změnám vůči kontrole, po 4 h již akumulace narůstá a v posledním časovém intervalu se zdá být opět nejvyšší díky výraznému hnědému zabarvení kolem zhnědlé žilnatiny. Zvyšování akumulace peroxidu vodíku s časem byl zaznamenán taktéž při působení kombinace patogenu a teplotního stresu, kdy po 24 h je přítomnost hnědých skvrn kolem žilnatiny opět největší (Obr. 33). Rostliny nahG nebyly pro tyto experimenty k dispozici z důvodu nedostatku semen.

Všechny listy byly mikroskopovány pod viditelným světlem. U následujících fotografií (Obr. 34, Obr. 35) si lze detailně prohlédnout místa detekce peroxidu vodíku v listech stresovaných vysokou teplotou, ošetřených kyselinou salicylovou či po působení kombinace těchto dvou faktorů, dále v listech po působení patogenu a kombinace patogenu s kyselinou salicylovou či teplotním stresem.



Obr. 34: Mikroskopická detekce peroxidu vodíku roztokem DAB v listech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po působení teplotního stresu (TS), kyseliny salicylové (SA), a jejich kombinace (SA+TS); K = kontrola.

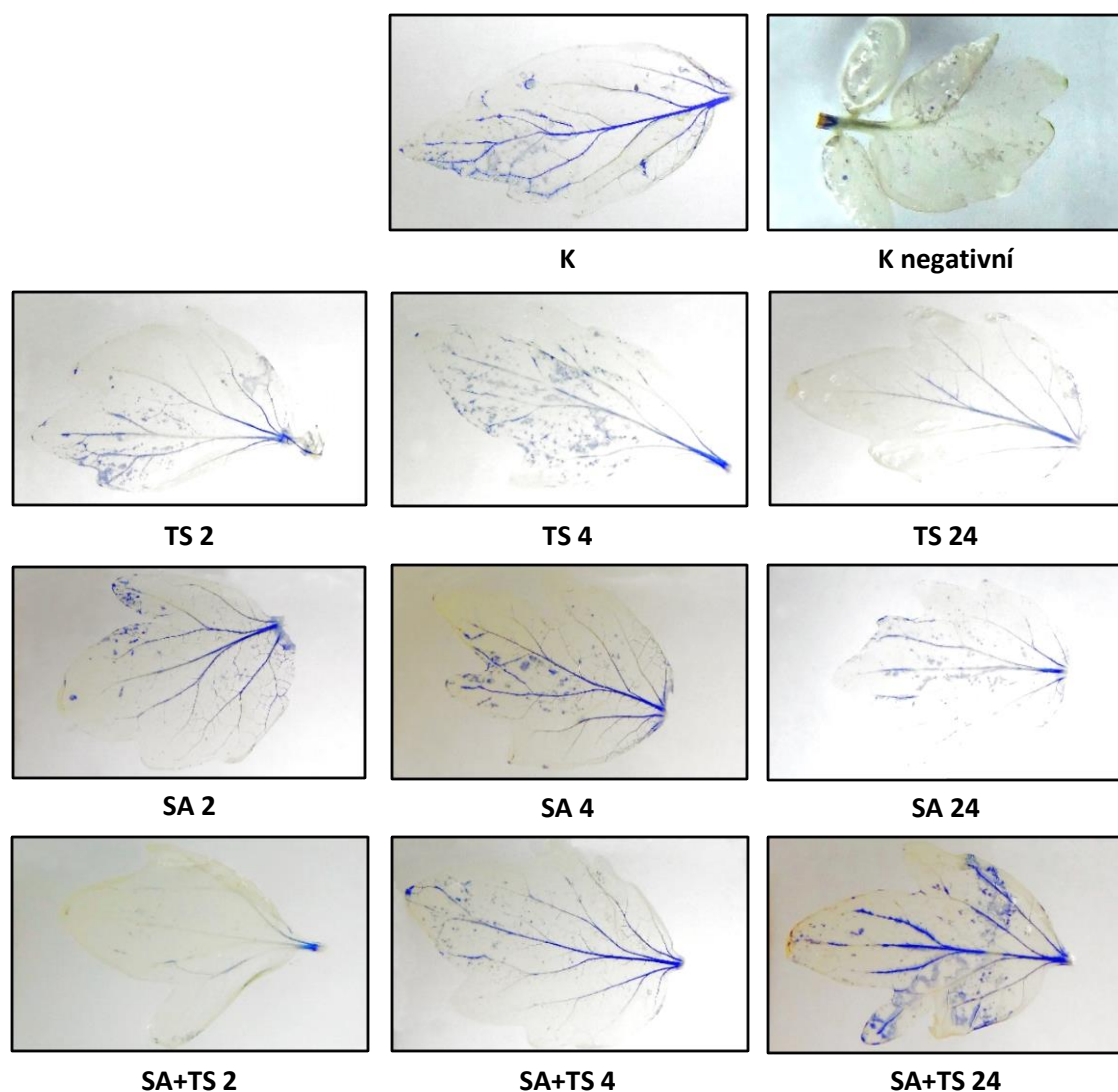


Obr. 35: Mikroskopická detekce peroxidu vodíku roztokem DAB v listech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po působení patogenu (P), patogenu a kyseliny salicylové (P+SA) a patogenu a teplotního stresu (P+TS); K = kontrola.

Na detailním zobrazení listů můžeme zaznamenat kromě hnědě zbarvené žilnatiny i míst kolem ní tmavé tečky, které jsou pravděpodobně sraženinami barviva DAB.

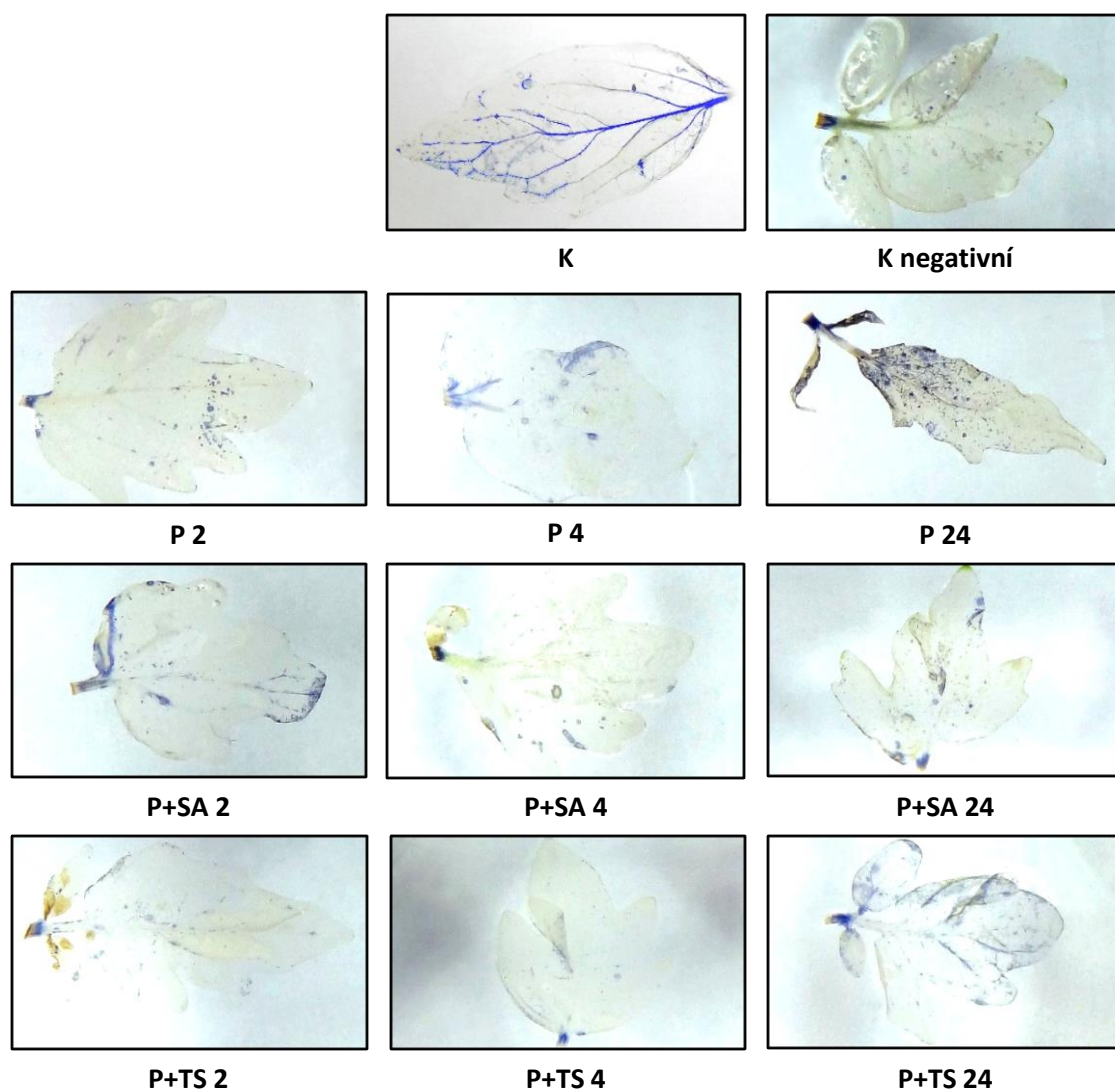
4.4.2 Histochemická detekce superoxidu

Obdobným způsobem byl v listech detekován i superoxid s použitím roztoku NBT. Přítomnost superoxidu v listech se projevila modrým zbarvením. Na následujících snímcích (Obr. 36, 37) lze pozorovat místa lokalizace superoxidu v listech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom nemutantní formy po působení teplotního stresu, postřiku kyselinou salicylovou, kombinace postřiku kyselinou salicylovou a teplotního stresu, dále po působení samotného patogenu, kombinace patogenu a postřiku kyselinou salicylovou a patogenu a teplotního stresu. Přítomnost superoxidu v listech se projevila modrým zbarvením. Rostliny nahG nebyly pro tyto experimenty k dispozici z důvodu nedostatku semen.



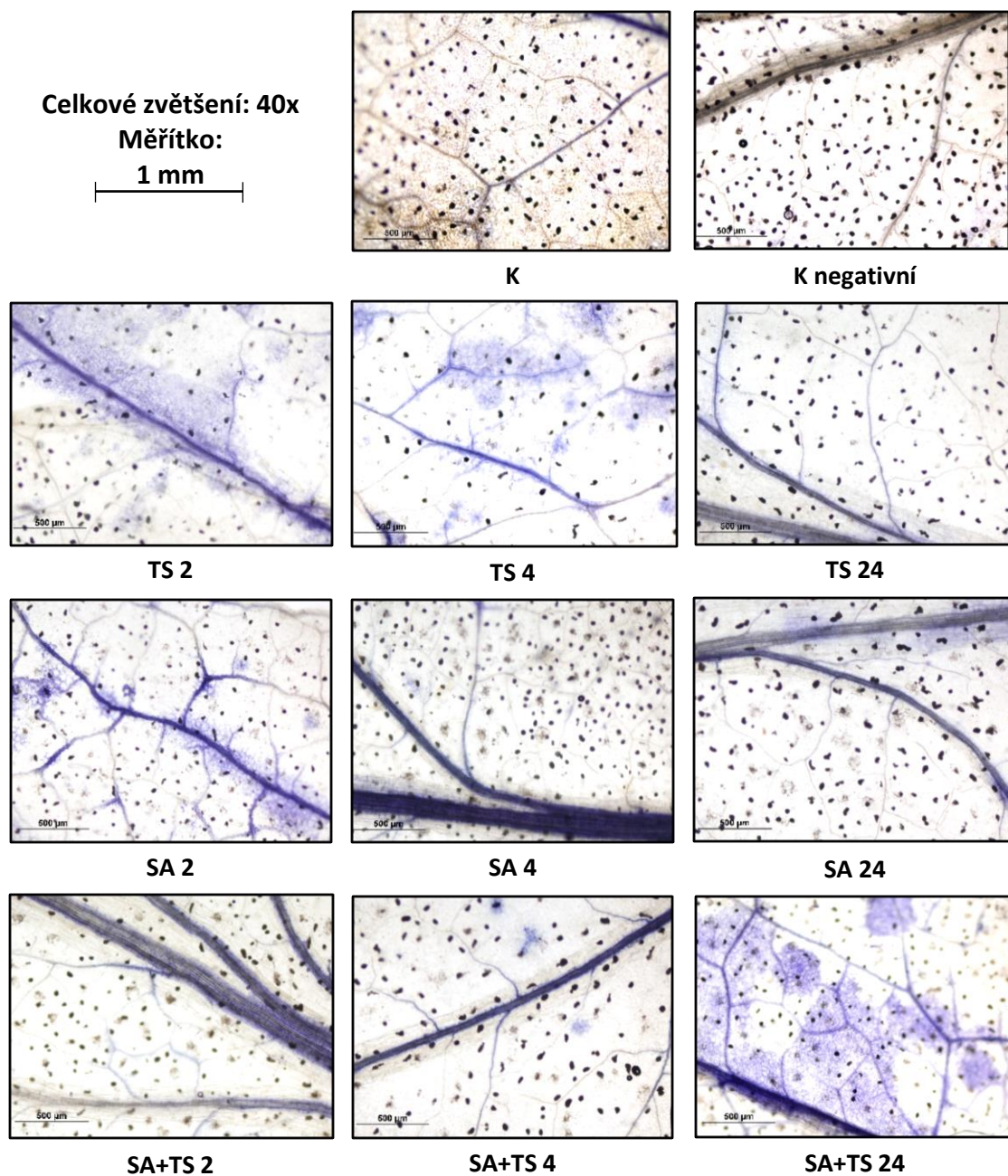
Obr. 36: Detekce superoxidu roztokem NBT v listech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po působení patogenu (P), patogenu a kyseliny salicylové (P+SA) a patogenu a teplotního stresu (P+TS); K = kontrola, K negativní = kontrola s přidavkem kyseliny askorbové.

Působení teplotního stresu na rostlinu rajčete vyvolalo v listech vysokou akumulaci superoxidu v prvních dvou časových intervalech, kdy je na listech vidět modře zbarvená žilnatina i okolí mimo ni. Akumulace superoxidu s časem klesá, po 24 h už není okolí žilnatiny vůbec zbarveno. Postřik kyselinou salicylovou vyvolal poměrně intenzivní akumulaci superoxidu ve všech časových intervalech, kdy na listech je opět patrná modrá žilnatina i skvrny mimo ni. Kombinace postřiku kyselinou salicylovou a teplotního stresu měla za následek postupné zvyšování akumulace superoxidu v čase, kdy po 24 h lze pozorovat výrazně modrou barvu žilnatiny i okolí (Obr. 36).



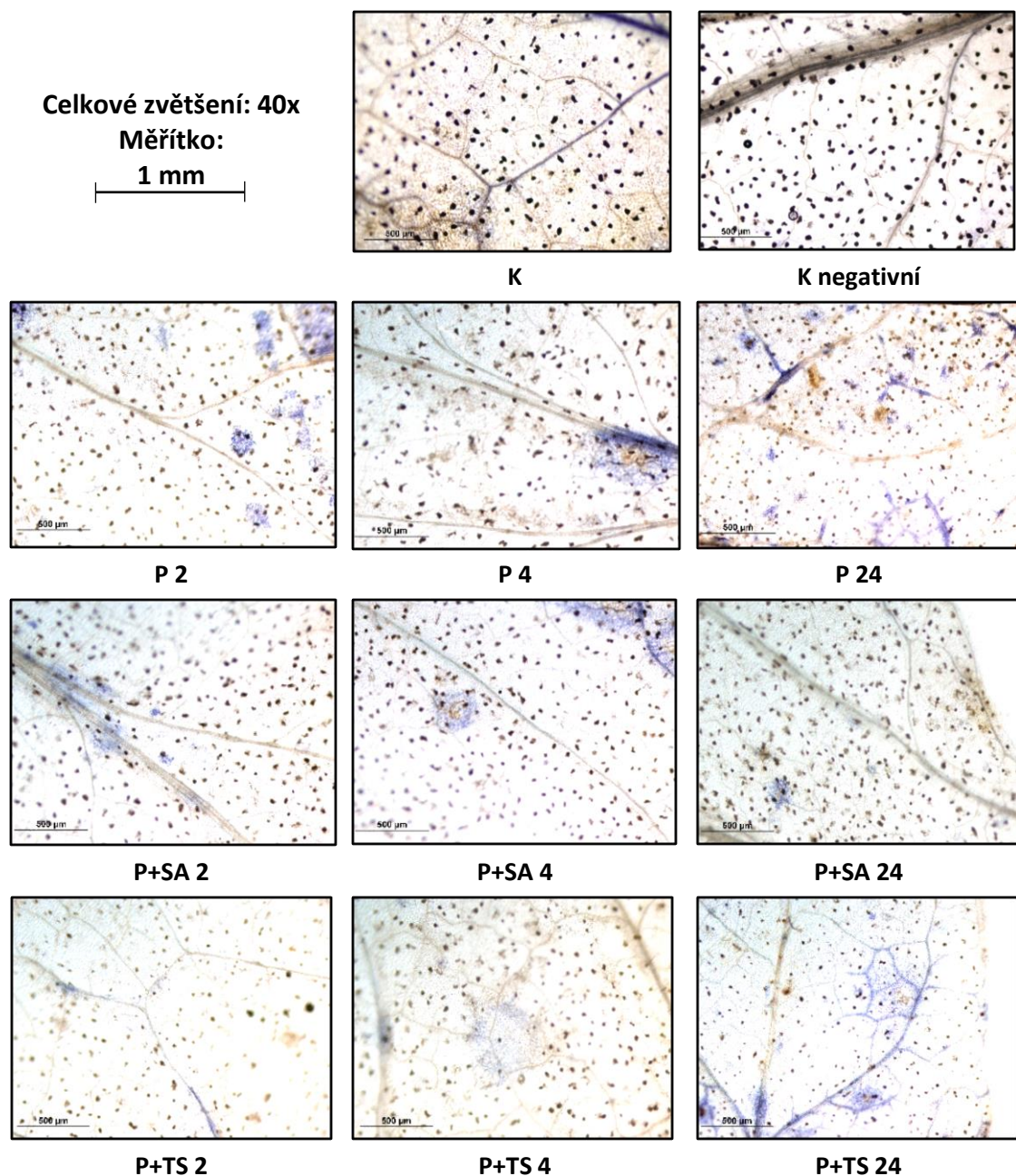
Obr. 37: Detekce superoxidu roztokem NBT v listech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po působení patogenu (P), patogenu a kyseliny salicylové (P+SA) a patogenu a teplotního stresu (P+TS); K = kontrola, K negativní = kontrola s přidavkem kyseliny askorbové.

Akumulace superoxidu dle výsledků není příliš vysoká v listech rostlin, na které bylo působeno patogenem, kombinací patogenu a kyseliny salicylové a patogenu a teplotního stresu. Ani v jednom z listů kromě kontroly nebyla zbarvena žilnatina. Působení patogenu vyvolalo zvýšenou akumulaci po 24 h. Kombinace patogenu a kyseliny salicylové vyvolaly mírné zmodrání listů, ale ne výraznější než u kontroly. Působení kombinace patogenu a teplotního stresu mělo za následek nejintenzivnější zbarvení po 24 h, avšak nepřevyšovalo intenzitu zbarvení kontrolního listu (Obr. 37).



Obr. 38: Mikroskopická detekce superoxidu roztokem NBT v listech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po působení teplotního stresu (TS), kyseliny salicylové (SA), a jejich kombinace (SA+TS); K = kontrola.

Na následujících snímcích (Obr. 38, 39) je zobrazení listů, na které bylo působeno teplotním stresem, kyselinou salicylovou a kombinací teplotního stresu a kyseliny salicylové, dále patogenem, kombinací patogenu a kyseliny salicylové a patogenu a teplotního stresu, pod mikroskopem, ve kterých byl roztokem NBT lokalizován superoxid. Snímky poskytují detailní pohled na modro-fialové zbarvení žilnatiny a skvrnek mimo ni. Tmavé tečky jsou podobně jako v případě detekce peroxidu vodíku roztokem DAB pravděpodobně sraženiny barviva NBT.



Obr. 39: Mikroskopická detekce superoxidu roztokem NBT v listech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po působení patogenu (P), patogenu a kyseliny salicylové (P+SA) a patogenu a teplotního stresu (P+TS); K = kontrola.

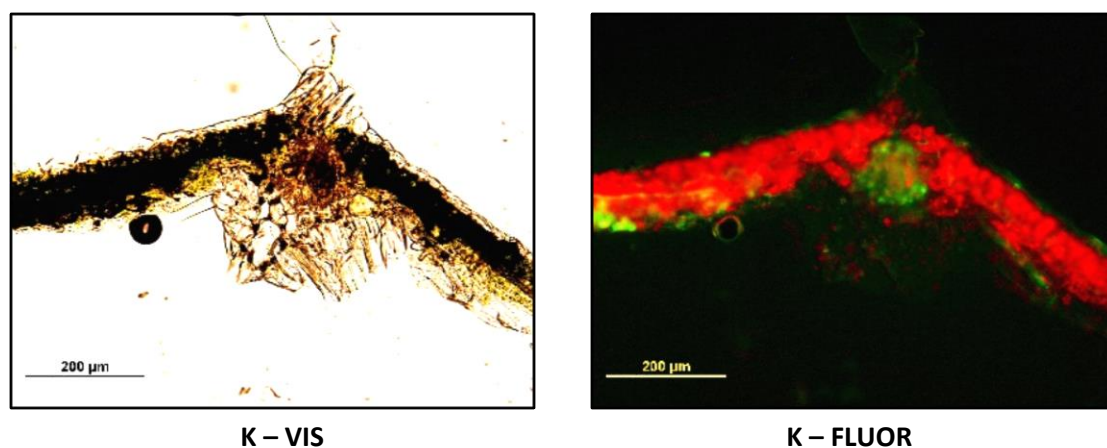
4.4.3 Histochemická detekce NO

Řezy listů byly za tmy inkubovány v příslušných roztocích látek pro histochemickou detekci NO. Mikroskopické fotografie řezů listů s fluorescenčním signálem byly vyhodnoceny programem ImageJ.

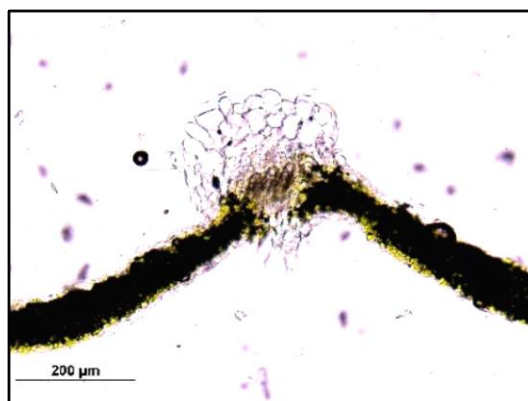
První série snímků (Obr. 41-43) tohoto experimentu zachycuje detailně řezy listů, na které bylo působeno vysokou teplotou, postříkem kyselinou salicylovou či jejich kombinací. Řezy byly pozorovány pod viditelným světlem, zelená fluorescence při 515 nm byla sledována s využitím UV lampy jako zdroje excitačního záření. Excitační vlnová délka byla 495 nm. Časové intervaly působení jednotlivých faktorů byly 2, 4 a 24 h. Intenzita fluorescenčního signálu listů, na které bylo působeno různými faktory, byla srovnávána s intenzitou fluorescenčního signálu v listu kontrolní rostliny (Obr. 40).

Negativní kontrola není zobrazena ani na jedné ze sérií snímků, protože byl u ní fluorescenční signál srovnatelný s ostatními vzorky, ke kterým nebyl přidán roztok cPTIO. Roztok cPTIO byl pravděpodobně nefunkční. Byla vyzkoušena i jeho čtyřnásobná koncentrace, přesto byl fluorescenční signál velmi intenzivní.

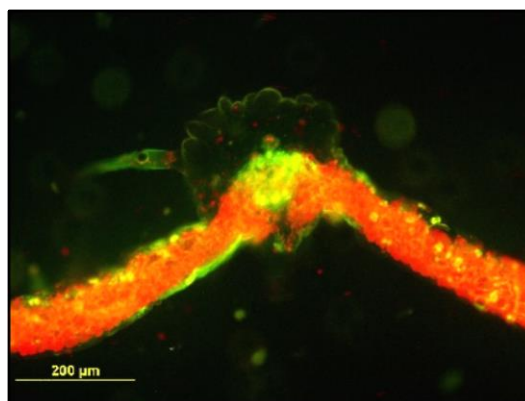
Na řezu listu je viditelný cévní svazek. V místě lokalizace NO je díky DAF-FM DA sondě možno sledovat fluorescenční signál, chlorofyl září červeně. Největší přítomnost NO je právě v cévních svazcích.



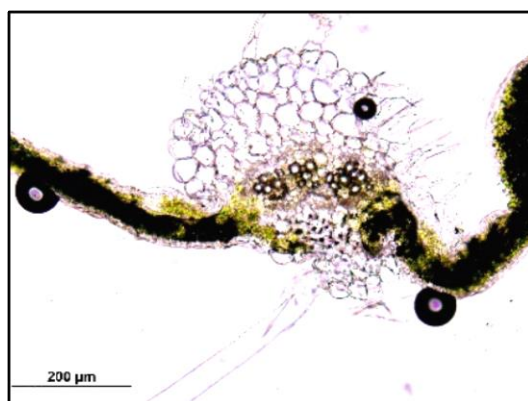
Obr. 40: Mikroskopická detekce NO v cévních svazcích listů. Zobrazení ve viditelném (VIS) a fluorescenčním (FLUOR) spektru. K = kontrola. Celkové zvětšení: 100x. Měřítka: úsečka = 200 μm.



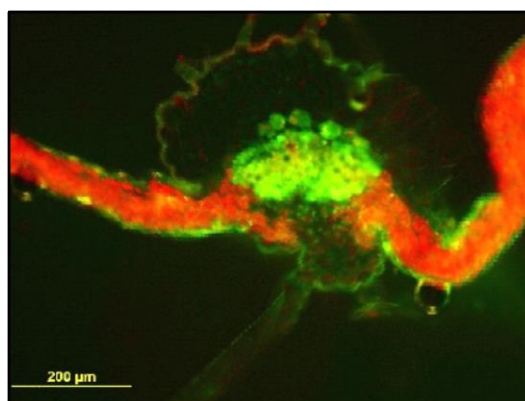
TS 2 – VIS



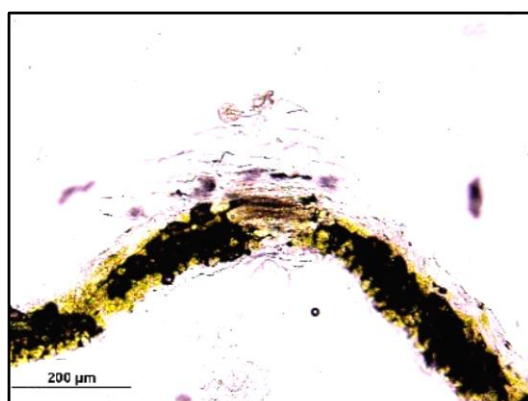
TS 2 – FLUOR



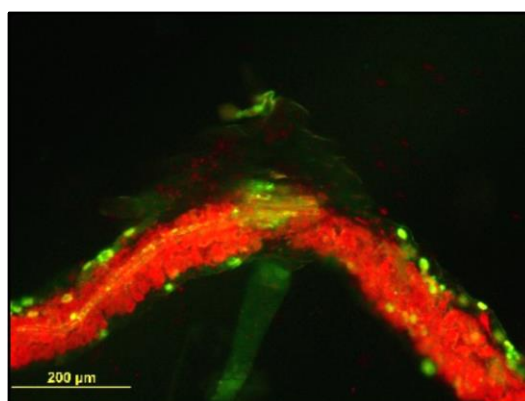
TS 4 – VIS



TS 4 – FLUOR

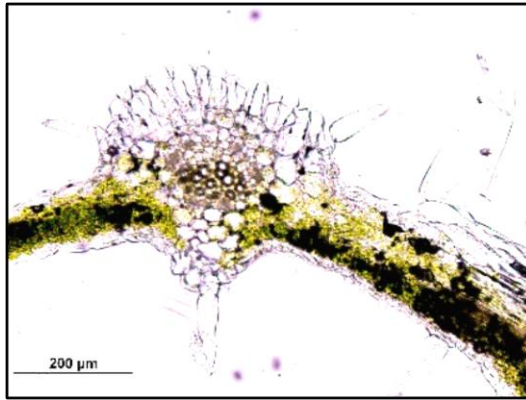


TS 24 – VIS

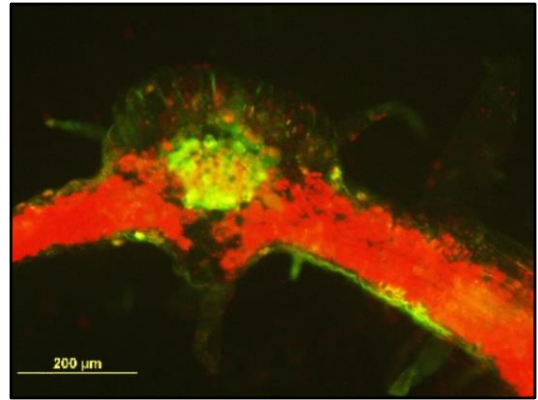


TS 24 – FLUOR

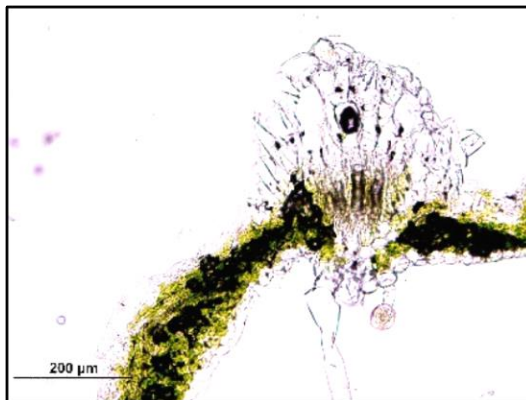
Obr. 41: Mikroskopická detekce NO v cévních svazcích listů. Zobrazení ve viditelném (VIS) a fluorescenčním (FLUOR) spektru. TS 2 = působení teplotního stresu po dobu 2 h, TS 4 = působení teplotního stresu po dobu 4 h, TS 24 = působení teplotního stresu po dobu 24 h. Celkové zvětšení: 100x. Měřítka: úsečka = 200 μm.



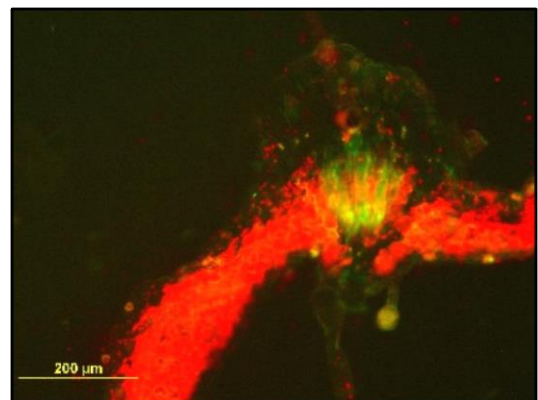
SA 2 – VIS



SA 2 – FLUOR



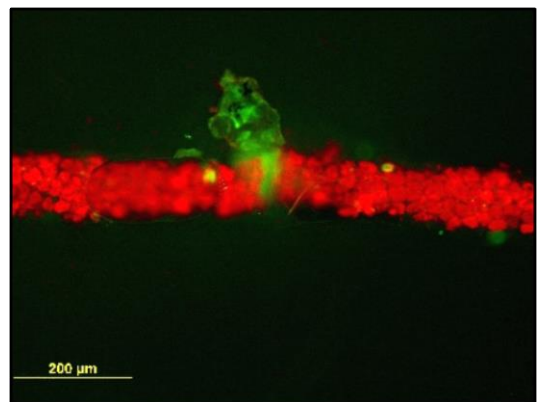
SA 4 – VIS



SA 4 – FLUOR

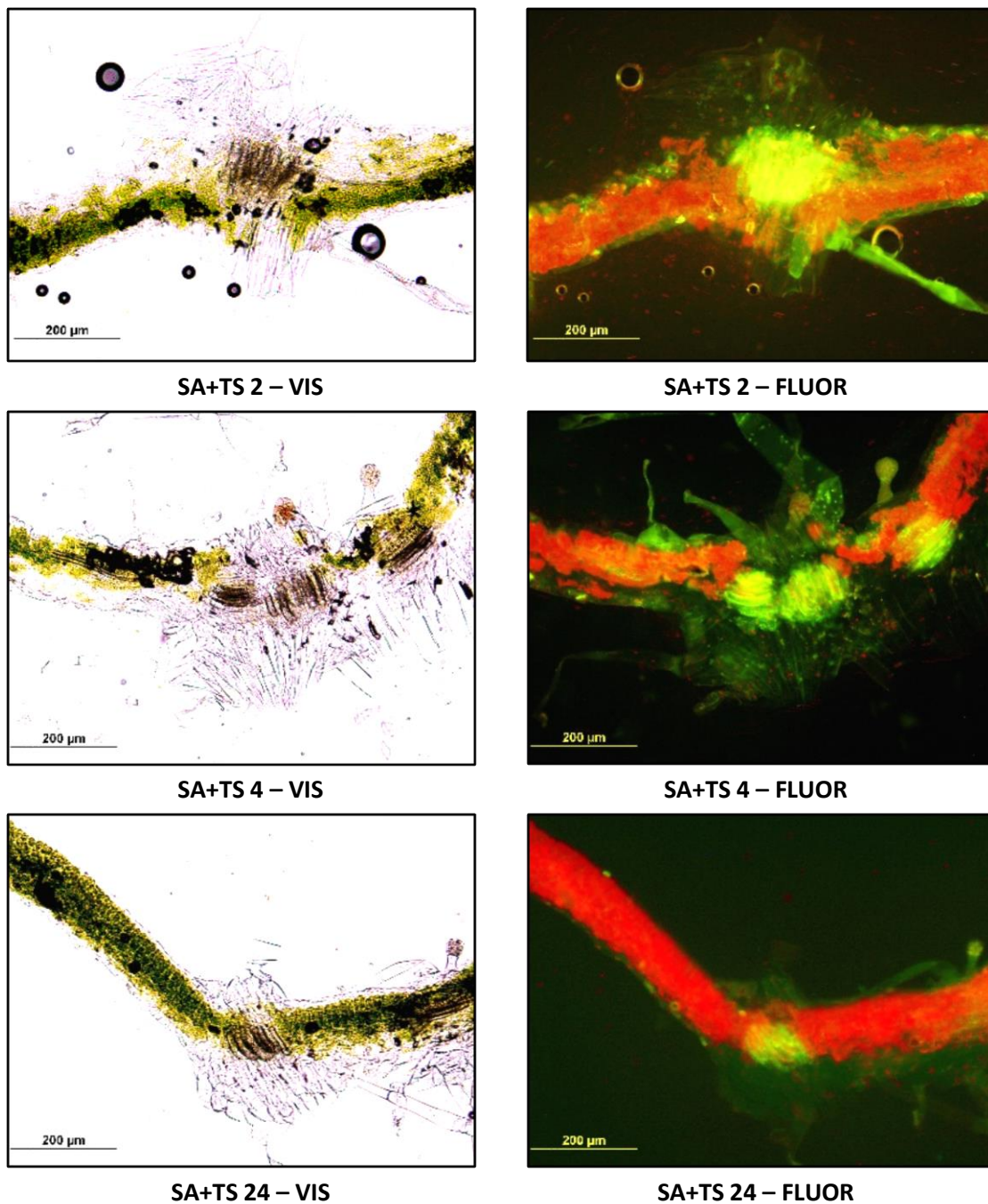


SA 24 – VIS



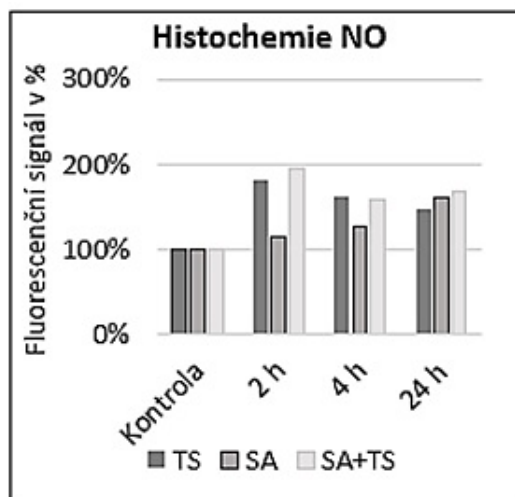
SA 24 – FLUOR

Obr. 42: Mikroskopická detekce NO v cévních svazcích listů. Zobrazení ve viditelném (VIS) a fluorescenčním (FLUOR) spektru. SA 2 = působení postřiku kyselinou salicylovou po dobu 2 h, SA 4 = působení postřiku kyselinou salicylovou po dobu 4 h, TS 24 = působení postřiku kyselinou salicylovou po dobu 24 h. Celkové zvětšení: 100x. Měřítka: úsečka = 200 μm.



Obr. 43: Mikroskopická detekce NO v cévních svazcích listů. Zobrazení ve viditelném (VIS) a fluorescenčním (FLUOR) spektru. SA+TS 2 = působení postřiku kyselinou salicylovou a teplotního stresu po dobu 2 h, SA+TS 4 = působení postřiku kyselinou salicylovou a teplotního stresu po dobu 4 h, SA+TS 24 = působení postřiku kyselinou salicylovou a teplotního stresu po dobu 24 h. Celkové zvětšení: 100x. Měřítko: úsečka = 200 µm.

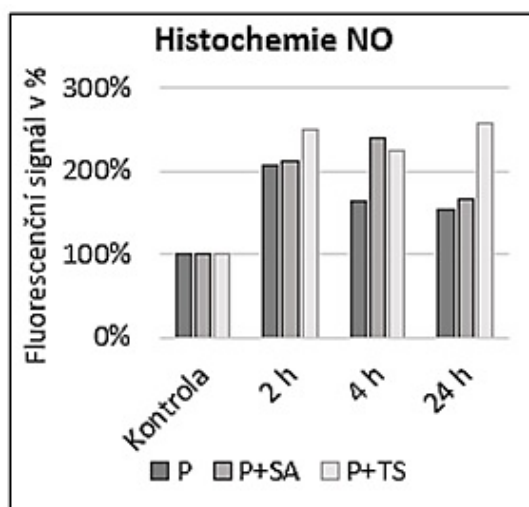
Výsledky densitometrického vyhodnocení snímků (Obr. 44) ukazují, že akumulace NO v listech byla v podmínkách působení všech faktorů vyšší než u kontroly. Nejvyšší nárůst hladiny NO byl pozorován po 2 h působení kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu, kdy hladiny NO dosáhla téměř dvojnásobku oproti kontrole.



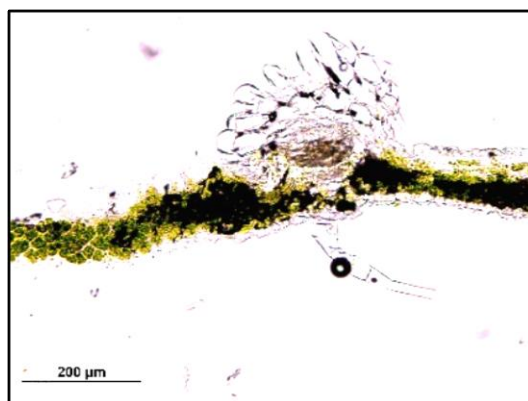
Obr. 44: Denzitometrické vyhodnocení fluorescenčního signálu histochemické detekce NO. TS = teplotní stres, SA = kyselina salicylová, SA+TS = kombinace postřiku kyselinou salicylovou a teplotního stresu, K = kontrola. Kontrola brána jako 100 %.

V druhé sérii snímků (Obr. 46-48) lze opět sledovat detailně řezy listů pod viditelným světlem a s fluorescenčním signálem. Na listy bylo působeno působeno patogenní infekcí, kombinací patogenní infekce a kyseliny salicylové a kombinací patogenní infekce a teplotního stresu. Časové intervaly působení jednotlivých faktorů byly 2, 4 a 24 h.

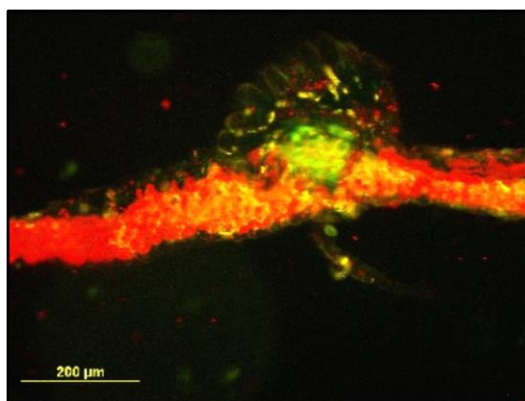
Z výsledků denzitometrického vyhodnocení (Obr. 45) fluorescenčního signálu u listů rostlin, na které bylo působeno patogenem, kombinací patogenu a kyseliny salicylové a patogenu a teplotního stresu, plyne, že všechny tyto faktory mají vliv na zvýšení akumulace oxidu dusnatého v listech. U všech listů ovlivněných zmíněnými faktory byla vyšší hladina NO než u listů kontrolní rostliny.



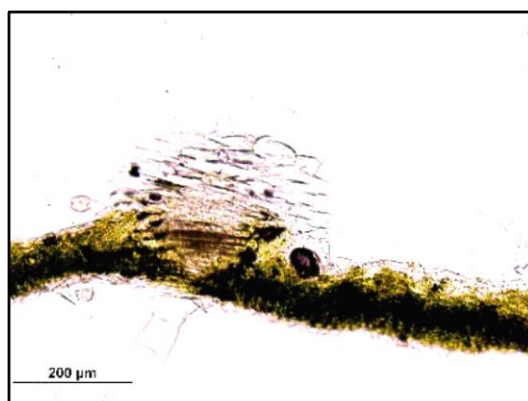
Obr. 45: Denzitometrické vyhodnocení fluorescenčního signálu histochemické detekce NO. P = patogen, P+SA = kombinace patogenu a postřiku kyselinou salicylovou, P+TS = kombinace patogenu a teplotního stresu. K = kontrola. Kontrola brána jako 100 %.



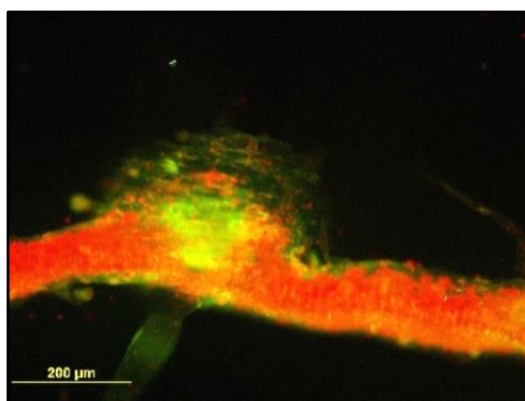
P 2 – VIS



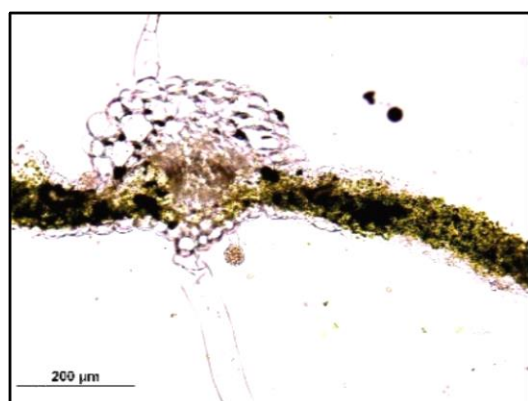
P 2 – FLUOR



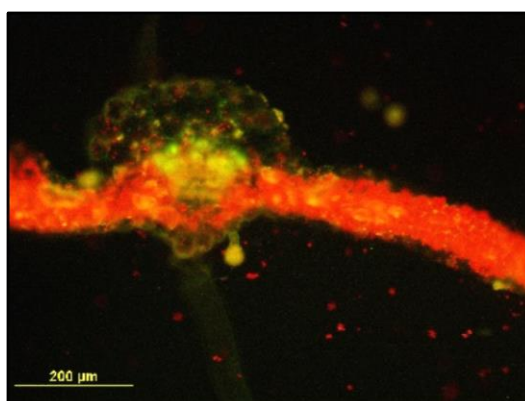
P 4 – VIS



P 4 – FLUOR

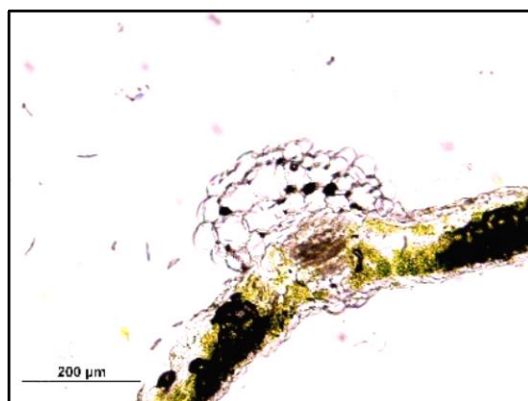


P 24 – VIS

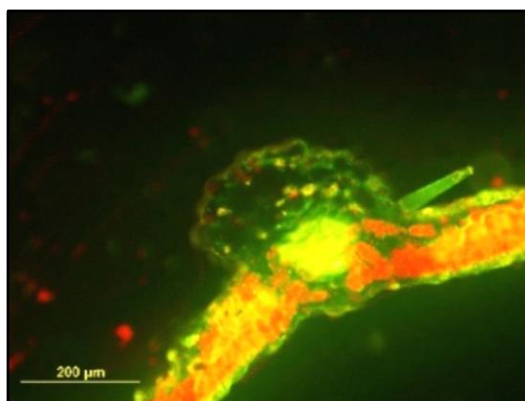


P 24 – FLUOR

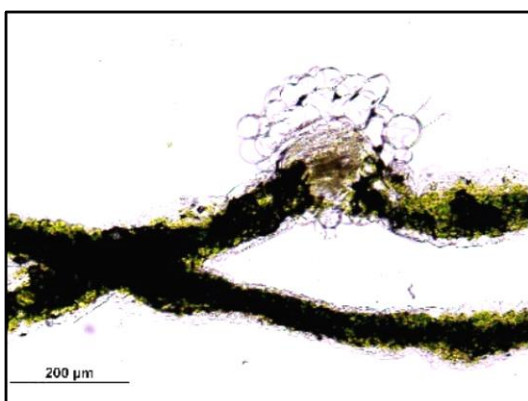
Obr. 46: Mikroskopická detekce NO v cévních svazcích listů. Zobrazení ve viditelném (VIS) a fluorescenčním (FLUOR) spektru. P 2 = působení patogenu po dobu 2 h, P 4 = působení patogenu po dobu 4 h, P 24 = působení patogenu po dobu 24 h. Celkové zvětšení: 100x. Měřítka: úsečka = 200 μm.



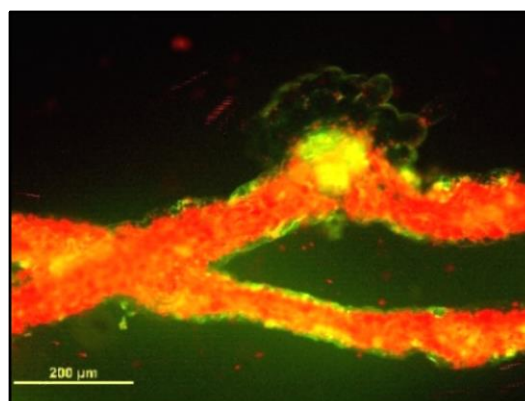
P+SA 2 – VIS



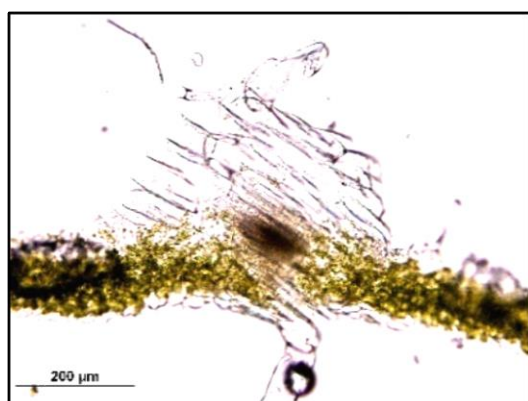
P+SA 2 – FLUOR



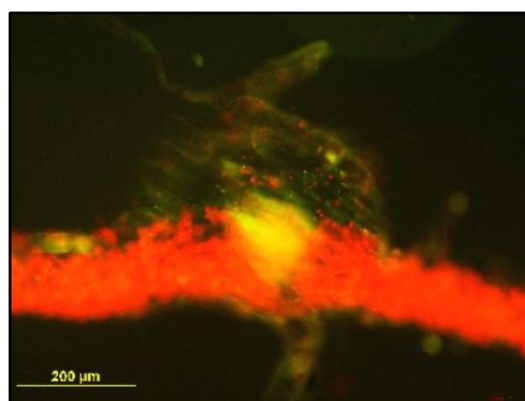
P+SA 4 – VIS



P+SA 4 – FLUOR

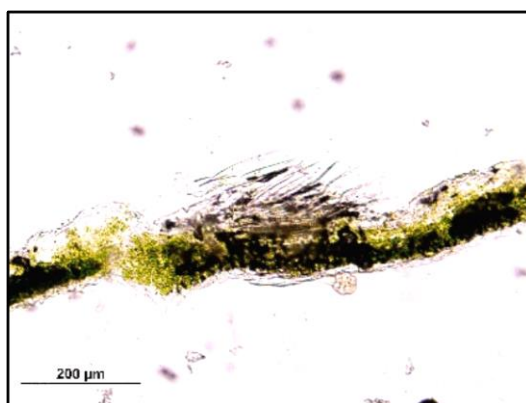


P+SA 24 – VIS

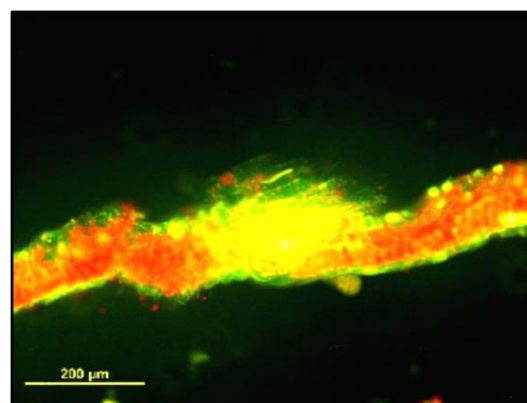


P+SA 24 – FLUOR

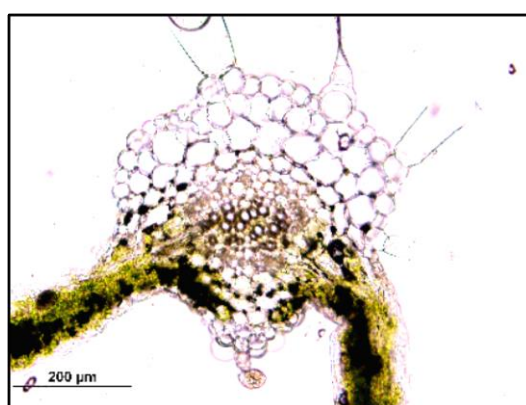
Obr. 47: Mikroskopická detekce NO v cévních svazcích listů. Zobrazení ve viditelném (VIS) a fluorescenčním (FLUOR) spektru. P+SA 2 = působení patogenu a postřiku kyselinou salicylovou po dobu 2 h, P+SA 4 = působení patogenu a postřiku kyselinou salicylovou 4 h, P+SA 24 = působení patogenu a postřiku kyselinou salicylovou po dobu 24 h. Celkové zvětšení: 100x. Měřítka: úsečka = 200 μm.



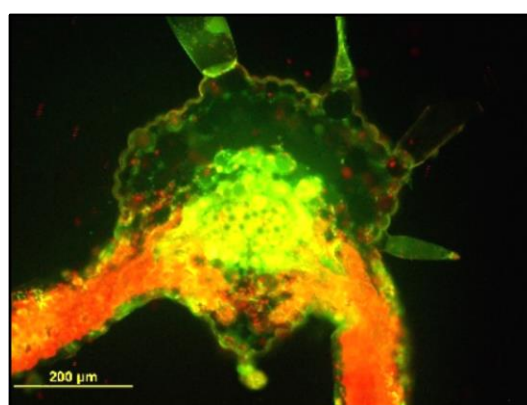
P+TS 2 – VIS



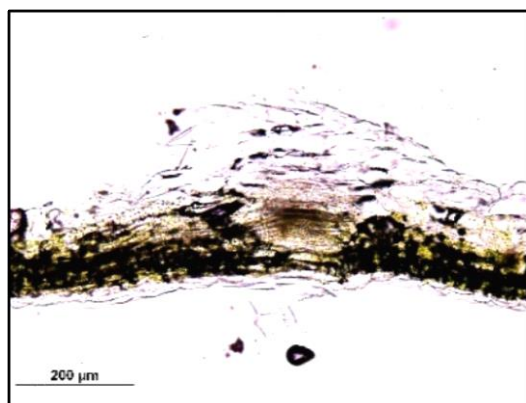
P+TS 2 – FLUOR



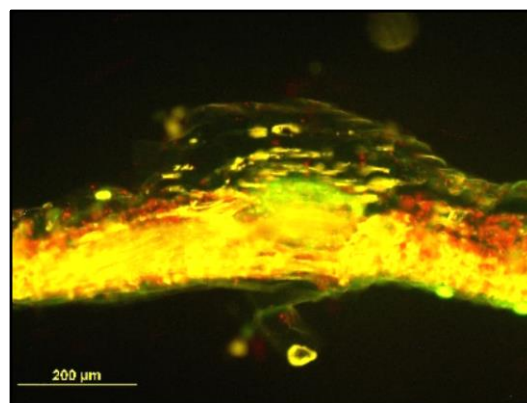
P+TS 4 – VIS



P+TS 4 – FLUOR



P+TS 24 – VIS



P+TS 24 – FLUOR

Obr. 48: Mikroskopická detekce NO v cévních svazcích listů. Zobrazení ve viditelném (VIS) a fluorescenčním (FLUOR) spektru. P+TS 2 = působení patogenu a teplotního stresu po dobu 2 h, P+TS 4 = působení patogenu a teplotního stresu po dobu 4 h, P+TS 24 = působení patogenu a teplotního stresu po dobu 24 h. Celkové zvětšení: 100x. Měřítka: úsečka = 200 µm.

5 DISKUZE

Vliv stresových faktorů zvýšené teploty a patogenní houbové infekce na změnu hladin HSP70 a akumulaci signálních molekul H_2O_2 a NO byl studován již v několika publikacích (Kubienová *et al.*, 2013a, Piterková *et al.*, 2013). V mnoha patosystémech bylo dokázáno, že předcházející teplotní stres a s ním spojená indukce HSP70 teoreticky může vést k hostitelské rezistenci vůči patogenní infekci (Kubienová *et al.* 2013a). Působení patogenní infekce mělo vliv na změnu hladiny HSP75, zatímco teplotní stres vyvolal zvýšení hladiny HSP72 (Piterková *et al.*, 2013).

Změny genové exprese a hladin HSP70, vyvolané zvýšenou teplotou a patogenní infekcí, byly studovány na genotypch rajčete lišících se ve své odolnosti vůči patogenní infekci a jejich toleranci vůči extrémním změnám teplot. Akumulace HSP70 u listových disků středně tolerantního kultivaru vůči vysokým teplotám a méně náchylného k infekci padlím *S. chmielewskii* byla v reakci na současně působící mechanický, teplotní a patogenem způsobený stres významně nižší ve srovnání s teplotně citlivým kultivarem *S. lycopersicum* cv. Amatér (Piterková *et al.*, 2013).

Signální molekuly NO a ROS se podílejí na regulaci produkce a akumulace HSP70 při abiotickém a biotickém stresu. Jejich důležitost v signalizaci produkce HSP70 byla potvrzena použitím látek zabraňujících tomuto jejich účinku (Piterková *et al.*, 2013).

Vliv NO na produkci HSP70 byl potvrzen v experimentech s lapačem NO PTIO, kdy byla v listových terčících vystavených kombinaci biotických a abiotických stresů významně snížena akumulace HSP70 oproti kontrolním diskům inkubovaným bez modulátoru NO. DPI, ireverzibilní inhibitor NADPH oxidasy podílející se na produkci H_2O_2 , také snížil akumulaci HSP70 v případě listových disků *S. lycopersicum*, ve srovnání s kontrolními disky inkubovanými bez modulátoru ROS (Piterková *et al.*, 2013).

5.1 Optimalizace metody Western blot pro stanovení hladiny HSP v listech rajčete

K vyhodnocení hladiny HSP byla použita metoda Western blot, která byla nejprve optimalizována pro potřeby experimentů se vzorky extraktů rajčete.

Bylo zjištěno, že nejcitlivější metodou detekce HSP70 je ředění primární monoklonální myší protilátky pro HSP70 v poměru 1:1000 (Obr. 16). Množství spotřebované protilátky není příliš velké a intenzita jednotlivých bandů je při tomto ředění

protilátky vhodná k následnému densitometrickému vyhodnocování. Výrobce produktu doporučoval při použití pro metodu Western blot nejvyšší ředění protilátky maximálně 1:5000.

K detekci smHSP byly k dispozici dvě primární protilátky a bylo potřeba vybrat, která bude v následujících experimentech využívána. Obě primární protilátky k detekci HSP17,6 a HSP17,7 poskytovaly kvalitní výsledky, avšak bandy v případě použití primární protilátky k detekci HSP17,6 byly intenzivnější (Obr. 17). Z tohoto důvodu byla nadále používána primární králičí anti-HSP17,6 (cytosolická třída I) protilátka k detekci smHSP.

Primární protilátka k detekci HSP17,6 byla použita také ve studii, která se zabývala vlivem reaktivních těkavých látek s krátkým řetězcem na genovou expresi proteinů souvisejících s abiotickým stresem u rostliny *A. thaliana*. Byla aplikována k detekci HSP17,6 v rostlinách vystavených teplotnímu stresu, s následným použitím sekundární protilátky značené alkalickou fosfatase. Se zvyšující se teplotou hladina HSP17,6 vzrůstala. Posledním časovým intervalem působení teplotního stresu byly 2 h, kdy byla hladina nejvyšší (Yamauchi *et al.*, 2014).

V experimentech diplomové práce nebyla detekce HSP17,6 vždy optimální. V případě dalších pokusů navazujících na diplomovou práci by bylo vhodné vyzkoušet detekci prostřednictvím sekundární protilátky značené křenuvou peroxidase z důvodu její vyšší citlivosti.

Posledním krokem optimalizace bylo při elektroforéze vyzkoušet dělicí gely o dvou koncentracích, a to 7% a 10% dělicí gel, a následně provést detekci HSP protilátkami (Obr. 18). Koncentrace (T) gelu v procentech je určena celkovou koncentrací akrylamidu a bis-akrylamidu. Čím je procento složení gelu nižší, tím jsou póry větší (Bárta *et al.*, 2010). Mobilita proteinů se s rostoucí velikostí pórů zvyšuje, což umožňuje detekovat dvě izoformy HSP70 v 7% dělicím gelu oproti 10% dělicímu gelu. V diplomové práci bylo tohoto využito pouze k ověření výskytu teplotně indukované izoformy, nikoli ke kvantifikaci jednotlivých izoform zvláště, protože v některých případech, zejména u působení samotného teplotního stresu, nedošlo k jejich dokonalému rozdělení či přenosu na membránu a kvantifikace by tak byla obtížná a neobjektivní. Bylo tak tedy dokázáno, ve kterých případech působení teplotního stresu a jeho kombinací s ostatními faktory byla produkována i druhá izoforma HSP70 – teplotně indukovaná. Ve všech případech, kdy byl teplotní stres součástí působení, tomu tak totiž nebylo (Obr. 24).

5.2 Vliv působení teplotního stresu, kyseliny salicylové a infekce patogenem na hladiny HSP

HSP70 působí jako molekulární chaperony a hrají nezbytnou roli při ochraně rostliny před škodlivými účinky teplotního stresu (Wang *et al.*, 2016). Detekce HSP70 Western blotem v rostlinách rajčat stresovaných vysokou teplotou prokázala produkci dvou izoform HSP70. Jsou jimi konstitutivní (HSC70 – 75 kDa) a vysokou teplotou indukovaná izoforma (HSP70 – 72 kDa) (Piterková *et al.*, 2013). Nejvyšší nárůst HSP70 byl pozorován po 2 h působení teplotního stresu, zejména u nahG rostlin (Obr. 20). Největší nárůst HSP70 v rané fázi obranné odpovědi nastává pravděpodobně proto, že dochází k aktivaci jednotlivých HSF a spuštění intenzivní genové exprese HSP (Qu *et al.*, 2013).

Hladiny HSP70 v listech nahG rostlin byly ve všech časových intervalech vyšší než v listech rostlin *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Transgenní rostliny nahG nesoucí gen pro bakteriální nedokáži akumulovat kyselinu salicylovou po expozici abiotickému či biotickému stresu, která je přitom v rostlině důležitou signální molekulou v obranné odpovědi proti stresům (Fragnière *et al.*, 2011). Jsou tak více stresovány, a proto u nich může být akumulace HSP70 vyšší.

Postřik listů kyselinou salicylovou vyvolal zvýšenou hladinu konstitutivní izoformy HSP70 oproti kontrole u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom (Obr. 22). Naopak u nahG rostlin, u kterého se předpokládá rychlejší katabolismus SA, byla hladina konstitutivních HSP70 ve všech časových intervalech nižší než u kontroly. Kyselina salicylová ve vysokých koncentracích v buňce rostliny může působit cytotoxicky. Dochází k akumulaci ROS, peroxidace lipidů vede k oxidativnímu poškození membrán a proteinů, což vede k indukci HSC70. Působení SA v koncentraci $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ na buněčnou suspenzi rajčete *S. esculentum* v rámci experimentu studie (Cronje a Bornman 1999) způsobilo po 8 h za normální teploty taktéž zvýšení hladiny HSC70. Dřívější publikace uvádí, že kyselina salicylová má schopnost zlepšit vazbu HSF na DNA, avšak nepůsobuje produkci teplotně indukované izoformy HSP70 (Snyman a Cronje, 2008).

Současné působení kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu na rostliny v případě použití 7% dělicího gelu vedlo k produkci obou izoform HSP70, ale pouze v některých časových intervalech působení těchto faktorů (Obr. 24). U kontrolní rostliny nebyla teplotně indukovaná izoforma HSP70 produkována, protože rostlina nebyla

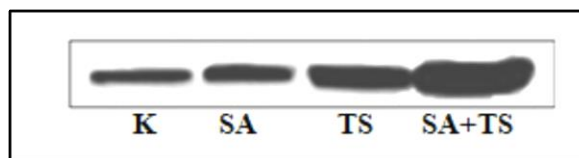
teplotně stresována. Toto zjištění je velmi zajímavé a v žádné publikaci nebyla tato skutečnost zmíněna. Důvod této skutečnosti se nepodařilo objasnit.

V souvislosti s působením kombinace kyseliny salicylové o koncentraci $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a teplotního stresu na rostlinu bylo také zjištěno, že kyselina salicylová v přítomnosti teplotního stresu vyvolává vyšší expresi HSP70 než samotný teplotní stres (Obr. 26). Již po 4 h působení kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu byl zaznamenán u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom značný nárůst hladiny HSP70 oproti předchozímu časovému intervalu a po 24 h již hladina HSP70 u kombinace obou faktorů jednoznačně převyšovala samotný teplotní stres.

Naproti tomu u mutanta nahG intenzita bandu HSP70 u kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu nikdy nepřevyšovala samotný teplotní stres, což bylo způsobeno sníženou hladinou kyseliny salicylové. Z experimentu plyne, že kyselina salicylová v kombinaci s teplotním stresem výrazně zvyšuje expresi HSP70.

K obdobným závěrům vedla i studie, kterou byl inspirován tento experiment (Snyman a Cronje, 2008) (Obr. 49). Kyselina salicylová o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ působila na rostlinu po dobu 17 h, teplotní stres byl způsoben expozicí teplotě 40°C po dobu 30 minut, poté byla rostlina ponechána při pokojové teplotě 2,5 h, aby se zotavila. Kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu byla provedena tak, že 17 h působila kyselina salicylová na rostlinu za normální teploty, poté byla rostlina stresována teplotou 40°C . Bylo také zjištěno, že právě po 17 hodinách je hladina HSP70 při působení kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu nejvyšší. K separaci byl použit 10% dělicí gel. Kombinované působení kyseliny salicylové a teplotního stresu zvyšuje vazbu HSF na DNA a dochází k nárůstu množství mRNA HSP70.

Působení samotného patogenu na rostliny rajčete nevyvolalo žádné výrazné změny v expresi konstitutivních HSP70 proti kontrole (Obr. 27). Dle studie (Byth *et al.*, 2001), HSP nejsou produkovány obrannou reakcí proti patogenní infekci, což může být důvodem, proč nebylo možno sledovat výrazné zvýšení hladiny HSP70 při působení patogenu na rostlinu. Předchozí studie na listových discích genotypů rajčete *S. lycopersicum* také nezaznamenala výrazné změny v akumulaci konstitutivních HSP70 u rostlin rajčat inokulovaných padlím oproti kontrolní rostlině (Piterková *et al.*, 2013). V některých studiích ovšem naopak byly zaznamenány nárůsty hladiny HSP70 během patogenní infekce, např. u tabáku při infekci *P. cichorii* (Kanzaki *et al.* 2003) nebo u papriky a citrusů při infekci *X. axonopodis* pv. *citri* (Garavaglia *et al.*, 2009).



Obr. 49: Detekce HSP70 – výsledky studie. K = kontrola, SA = kyselina salicylová, TS = teplotní stres, SA+TS = kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu (upraveno podle Snyman a Cronje, 2008).

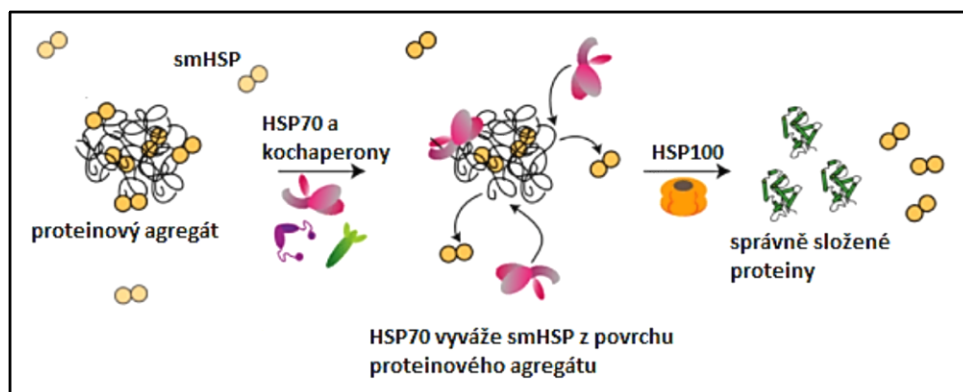
Hladina konstitutivních HSP70 při současném působení patogenu a kyseliny salicylové rostla v čase (Obr. 28). U *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom hladina HSP70 rostla mnohem výrazněji než u nahG rostlin, z čehož bylo opět pozorováno, že kyselina salicylová má pravděpodobně pozitivní vliv na produkci konstitutivně exprimované izoformy HSP70. Kyselina salicylová hraje důležitou signální úlohu v aktivaci různých mechanismů na obranu rostlin vůči patogenní infekci, ke kterým může patřit i produkce HSP70. Akumulace HSP70 by mohla mít vliv na potlačení buněčné smrti u rostlin (Cronje *et al.*, 2008).

Působení kombinace patogenu a teplotního stresu vyvolala ze všech případů působení různých faktorů největší nárůst hladiny HSP70 oproti kontrole (Obr. 29). Po 4 h byla hladina HSP70 zhruba šestinásobná v porovnání s kontrolou, poté byl pozorován značný pokles. Byla sledována konstitutivní i teplotou indukovaná izoforma HSP70.

U nahG rostlin byly hladiny HSP70 při současném působení patogenu a teplotního stresu nižší než u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Patogen ve spojení s teplotním stresem pravděpodobně intenzivně stimuloval signální dráhu kyseliny salicylové přirozeně se vyskytující v rostlině *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Rostliny nahG mají velmi nízkou hladinu kyseliny salicylové z důvodu jejího katabolismu na katechol. To může být důvodem nižších hladin HSP70, protože současný účinek teplotního stresu a nízké koncentrace endogenní SA na akumulaci HSP70 není tak silný jako v případě nemutované formy rajčete.

SmHSP17,6 byly detekovány pouze v případě působení kyseliny salicylové a kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu (Obr. 23, 25). V obou případech detekce smHSP byly nejvíce akumulovány HSP17,6 po 24 h. Důvodem mohlo být, že v tomto časovém intervalu způsobil stres v rostlině největší škody na proteinech, proto byly HSP17,6 přítomny ve vysokých hladinách.

Neúspěšná detekce v ostatních případech mohla být způsobena stářím protilátky, jelikož tyto ostatní experimenty byly provedeny asi 6 měsíců po úspěšné detekci touto



Obr. 50: Schéma znovusložení proteinu pomocí smHSP, HSP70 a HSP100. smHSP se váží na proteinový agregát. Následně jsou smHSP vyváženy z povrchu proteinového agregátu HSP70. smHSP v jádře proteinového agregátu zůstávají. Spolupůsobením HSP70 a HSP100 dochází následně k uvolnění jednotlivých proteinů z agregátu a k jejich správnému složení (upraveno podle Zwirowski *et al.*, 2017).

protilátkou. Pro budoucí experimenty detekce smHSP by se nabízela také citlivější detekce prostřednictvím sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou. Densitometrické vyhodnocení nebylo v případě detekce HSP17,6 provedeno, jelikož intenzita bandů nebyla vysoká jako u HSP70, mnohdy nebyly ani okem patrné.

smHSP jsou v rostlinách exprimovány za stresových podmínek z toho důvodu, že se váží na poškozené proteiny shluklé do agregátů a usnadňují přístup pro HSP70 (Obr. 50) (Smýkal *et al.*, 2000). Hladiny smHSP v reakci na abiotický a oxidativní stres byly studovány i v případě patogenní houby sněti kukuřičné, kdy byly sledovány účinky různých stresů na její patogenitu. Studie se domnívá, že smHSP hrají významnou roli v organismu při působení biotického či abiotického stresu (Ghosh, 2014). Další studie se zabývala rolí smHSP v pšenici při stresových abiotických faktorech, jako jsou sucho a teplotní stres. Největší akumulace těchto proteinů byla zaznamenána při působení obou faktorů současně (Grigorova *et al.*, 2011).

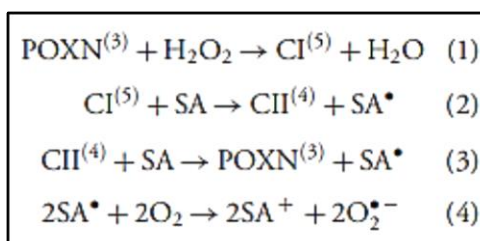
5.3 Vliv působení teplotního stresu, kyseliny salicylové a infekce patogenem na aktivitu enzymů metabolismu ROS a RNS

ROS jsou v buňkách akumulovány v rámci oxidativního stresu a předpokládá se, že mohou mít vliv jako signální molekuly na produkci HSP70 za podmínek biotického a abiotického stresu. Obdobně se NO, nejvýznamnější zástupce RNS, podílí na schopnosti rostlin vyvolat obranné mechanismy a bylo u něj prokázáno, že zvyšuje hladiny HSP70 při stresových podmínkách u rostlin (Piterková *et al.*, 2013).

Množství peroxidu vodíku je v buňkách regulováno několika enzymy, mezi které se řadí i askorbátperoxidasa, která katalyzuje redukci peroxidu vodíku na vodu (Cansev *et al.*, 2011).

Teplotní stres způsobil nárůst aktivity APX po 2 h a 4 h oproti kontrole, v posledním časovém intervalu 24 h nastává pokles (Obr. 30, A). Tato skutečnost naznačuje, že v prvních hodinách působení teplotního stresu bylo produkováno zvýšené množství ROS, které vedlo ke zvýšení aktivity APX. Aktivita enzymu byla vyšší u mutantních rostlin nahG, což může být způsobeno katecholem vzniklým rozkladem kyseliny salicylové, který se podílí na produkci ROS včetně H₂O₂ (Schweigert *et al.*, 2001). Pokles po 24 h může být vysvětlen procesem aklimatizace rostliny nebo také narušením funkce enzymu vysokou teplotou.

Samotná kyselina salicylová snížila aktivitu APX oproti kontrole ve všech časových intervalech působení u obou typů rostlin (Obr. 30, B). Většina studií však uvádí, že SA zesiluje tvorbu ROS. Podle předchozí studie (Kimura a Kawano, 2015) může být snížená aktivita APX důsledkem oxidace kyseliny salicylové, při které je redukován peroxid vodíku na vodu, vzniká superoxid. Průběh reakce je znázorněn níže (Obr. 51). Hladina peroxidu vodíku je tedy nižší na úkor hladiny superoxidu, což může být důvodem snížené aktivity askorbátperoxidasy v případě působení kyseliny salicylové.



Obr. 51: Oxidace kyseliny salicylové (SA). Enzymy peroxidasy mají ve svém centru molekulu hemu obsahující železo, které může přecházet do různých oxidačních stavů. Oxidační stavy jsou uvedeny v závorkách nad sloučeninami. V rostlinné buňce se peroxidasy vyskytují v nativním stavu s oxidačním čísle 3 (POXN). Dojde-li k jejich interakci s peroxidem vodíku, dochází k jejich oxidaci, peroxid vodíku je redukován za vzniku vody. Oxidovaná peroxidasa (CI) reaguje s molekulou kyseliny salicylové, dojde k přenosu jednoho elektronu za vzniku radikálu kyseliny salicylové (SA[•]), přičemž příslušná peroxidasa se nachází v oxidačním stavu 4. Tato peroxidasa (CII) reaguje s další molekulou kyseliny salicylové, dochází opět k přenosu elektronu z peroxidasy za vzniku dalšího radikálu kyseliny salicylové a obnovení původního oxidačního stavu peroxidasy. Dvě molekuly radikálu kyseliny salicylové reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku dvou molekul superoxidu (převzato z Kimura a Kawano, 2015).

Působení kyseliny salicylové spolu s teplotním stresem v prvních dvou časových intervalech způsobilo pokles aktivity enzymu APX oproti kontrole, na což mohla mít vliv kyselina salicylová. Po 24 h bylo pozorováno zvýšení aktivity enzymu (Obr. 30, C). To mohlo být způsobeno tím, že teplotní stres způsobil tak vysokou akumulaci peroxidu vodíku v tomto časovém intervalu, že již všechen nemohl být přeměněn na superoxid procesem oxidace kyseliny salicylové (Kimura a Kawano, 2015), a proto došlo ke zvýšení aktivity APX.

Aktivita APX v listech, na které působil patogen, byla v prvních dvou časových intervalech snížena oproti kontrole (Obr. 30, D). Mohlo to být zapříčiněno přirozeně se v rostlině vyskytující kyselinou salicylovou, která svou oxidací měla vliv na tvorbu superoxidu a na redukci peroxidu vodíku. Po 4 h obecně nastává tvorba klíčního vlákna klíčovými spory patogenu, takže produkce H_2O_2 nebyla ještě zdaleka tak vysoká jako po 24 h, kdy nastalo zvýšení aktivity enzymu, protože H_2O_2 produkované v odpovědi na obranu proti patogenu už bylo pravděpodobně přítomno v toxické koncentraci a bylo nutno jej odbourat enzymem APX. Po 10 h vývoje patogenu dochází ke vzniku struktury appresoria na konci klíčního vlákna. Tato struktura mechanicky či enzymaticky narušuje buněčnou stěnu, aby se vlákno mohlo dostat k plasmatické membráně buňky a čerpat živiny. Po 24 h už hyfy padlí pravděpodobně pronikaly do dalších buněk rostlinného pletiva a reakce rostlinné obrany vůči patogenu tak byla intenzivní a produkce H_2O_2 vysoká (Hückelhoven, 2005).

Kombinace patogenu a kyseliny salicylové ve všech časových intervalech způsobila pokles aktivity APX proti kontrole, stejně jako u působení samotné kyseliny salicylové (Obr. 30, E). Kyselina salicylová tedy jednoznačně snižuje aktivitu enzymu i v přítomnosti patogenu, pokud není peroxid vodíku přítomen v toxicky vysoké koncentraci, která již musí být snížena enzymem APX. Stále není zcela objasněn důvod snižování aktivity APX vlivem SA, nicméně možným důvodem je oxidace kyseliny salicylové, kdy akceptorem elektronu je peroxid vodíku (Kimura a Kawano, 2015).

Působení patogenu a teplotního stresu také snížilo aktivitu APX proti kontrole ve všech časových intervalech (Obr. 30, F). Teplotní stres by mohl teoreticky zesilovat účinek endogenní kyseliny salicylové (Snyman a Cronje, 2008).

ROS může mít signální úlohu při produkci HSP70. Mezi výsledky detekce HSP70 metodou Western blot a aktivity APX a byly nalezeny určité souvislosti, které tomu nasvědčují. V případě samotného teplotního stresu měly změny aktivity APX podobný trend jako změny hladin HSP70. Čím více byla rostlina vysokou teplotou stresována, tím

bylo více potřeba katalyzovat rozklad H_2O_2 enzymem APX, aby nebylo dosaženo jeho toxických koncentrací pro buňku. Zvýšená produkce H_2O_2 navíc také mohla být signálem pro navýšení hladiny HSP70, aby bylo zabráněno nevratnému poškození proteinů. Při současném působení kyseliny salicylové a teplotního stresu byla naměřena nejvyšší aktivita po 24 h u obou kultivarů, a současně při působení této kombinace faktorů byly v tomto časovém intervalu detekovány HSP70 v nejvyšších hladinách, což také nasvědčuje o možné úloze H_2O_2 v signálních drahách aktivace akumulace HSP70.

Dále byla měřena aktivita enzymu GSNOR. Tento enzym katalyzuje rozklad S-nitrosoglutathionu, který je považován za zásobní formu oxidu dusnatého (Kubienová *et al.*, 2013b). Všechny druhy abiotického stresu způsobují zvýšení aktivity GSNOR (Kubienová *et al.*, 2013b). GSNOR se stejně jako kyselina salicylová účastní na aktivaci systémové získané rezistence. GSNOR se zdá být tedy důležitou součástí v rezistenci proti patogenním infekcím (Espunya *et al.*, 2012).

Působení teplotního stresu způsobilo zvýšenou hodnotu GSNOR oproti aktivitě kontrolních rostlin u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po 2 a 24 h působení stresu. U nahG rostlin byla zvýšená aktivita GSNOR pouze po 4 h působení stresu (Obr. 31, A). Vliv teplotního stresu na aktivitu GSNOR byl dříve pozorován také v rostlinách okurky a melounu. Bylo zjištěno, že aktivita enzymu závisí na orgánu, kde je měřena a také se liší v rámci druhů rostlin. V listech okurky byl pozorován nárůst aktivity s časem, naopak u kořenů a stonků pokles. U melounu byl pozorován nárůst aktivity u všech třech orgánů v čase, avšak u stonku byla aktivita jednoznačně nejvyšší (Kubienová *et al.*, 2014). Enzym GSNOR má pravděpodobně významnou funkci v aklimatizaci rostliny na vysoké teploty a je důležitý pro její růst a plodnost (Parankusam *et al.*, 2017).

Působení postřiku kyselinou salicylovou způsobilo nárůst aktivity GSNOR u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po 4 h od aplikace (Obr. 31, B). Aktivita GSNOR byla indukována působením kyseliny salicylové také v rostlinách tabáku či *A. thaliana* (Díaz *et al.*, 2003). U nahG rostlin pravděpodobně účinek SA nenastal díky jejímu katabolismu.

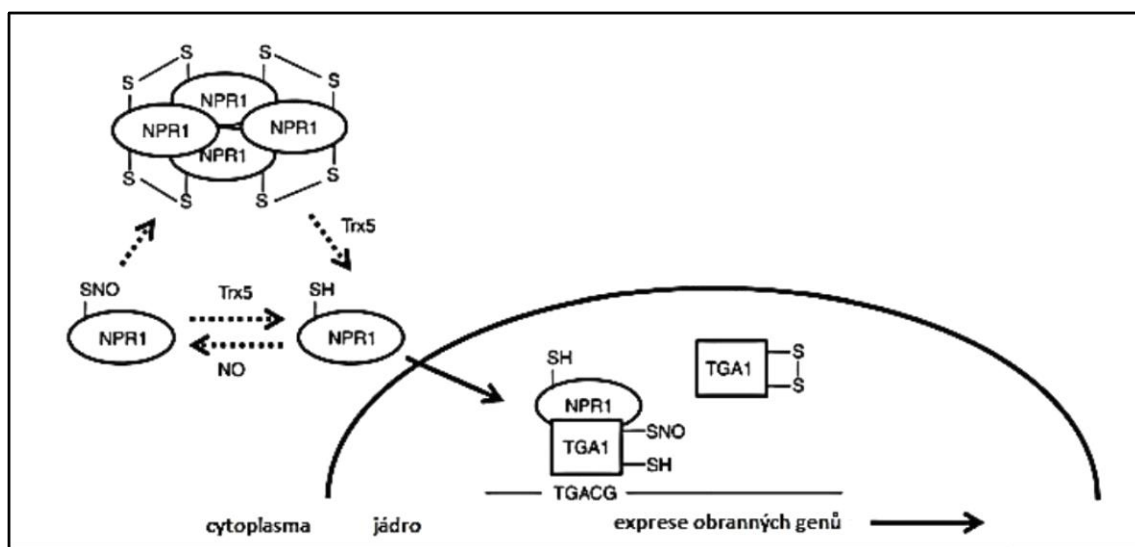
Významné zvýšení aktivity v časovém intervalu 2 h bylo pozorováno při působení kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu na *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. U nahG rostliny nedošlo ke zvýšení aktivity v žádném časovém intervalu (Obr. 31, C). V tomto případě by působení teplotního stresu mohlo zvyšovat účinek kyseliny salicylové nejen v akumulaci HSP70 (Snyman a Cronje, 2008), ale také v indukci enzymu GSNOR.

Patogen způsobil u rostlin *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom nárůst aktivity enzymu GSNOR proti kontrole ve všech časových intervalech. Naopak u mutanta nahG aktivita

nikdy nepřesáhla aktivitu kontroly (Obr. 31, D). V předešlé práci, která se zabývala významem enzymu GSNOR v patogenní infekci u rostlin bylo popsáno, že v rajčeti *S. lycopersicum* pokles aktivity enzymu způsobil špatnou odolnost rostliny vůči patogenu, naopak vyšší aktivita GSNOR vedla ke zvýšení obrany proti patogenní infekci (Hussain, 2013).

V případě současného působení postřiku kyselinou salicylovou a patogenu byla aktivita enzymu GSNOR také zvýšena oproti kontrole ve všech časových intervalech u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. U mutantu nahG aktivita nikdy nepřesáhla aktivitu kontroly (Obr. 31, E). Kyselina salicylová působí synergicky s GSNOR na aktivaci systémové získané rezistence. GSNOR se zdá být tedy důležitou součástí v rezistenci proti patogenním infekcím (Espunya *et al.*, 2012), jak již bylo uvedeno výše.

Kombinace patogenu a teplotního stresu zvýšila aktivitu GSNOR oproti kontrole u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom (Obr. 31, F). Účinek endogenní kyseliny salicylové je teplotním stresem opět nejspíše zesilován (Snyman a Cronje, 2008). Naopak tomu bylo u mutantního rajčete, kde v žádném časovém intervalu aktivita GSNOR nepřesáhla kontrolu.



Obr. 52: Redoxní regulace transkripčních faktorů NPR-1 a TGA-1. V nepřítomnosti patogenu existuje NPR-1 jako oligomer v cytoplasmě s intermolekulárními disulfidovými vazbami mezi monomery. TGA-1 se nachází v jádře s intramolekulárními disulfidovými vazbami, které mu zabraňují ve vazbě na promotor. Po napadení patogenem dojde ke změně redoxního stavu buňky a rozpadu oligomeru NPR-1 na monomery, což usnadňuje jejich translokaci do jádra. NPR-1 monomery pak mohou reagovat s TGA-1, který se následně může vázat na promotor a může nastat exprese ochranných genů. S-nitrosylace monomeru NPR-1 podporuje jeho oligomerizaci v cytoplasmě, zatímco Trx-5 může denitrosylovat SNO (S-nitrosylované) -NPR1, což podporuje jeho translokaci do jádra. S-nitrosylace TGA-1 může chránit proti tvorbě disulfidové vazby, čímž se zvyšuje jeho aktivita vazby na DNA (upraveno dle Li a Loake, 2016).

S-nitrosothioly, které vznikají kovalentní vazbou nitrososkupiny na thiolovou skupinu cysteinu v thiolech s nízkou molekulovou hmotností a proteinech, mohou být vzhledem k jejich stabilitě a nižší reaktivitě zdrojem NO ve vzdálených místech od jejich vzniku. S-nitrosoglutathion patří mezi S-nitrosothioly a jeho funkcí je uvolňování oxidu dusnatého nebo jeho přenos na thiolové skupiny jiných molekul. Enzym GSNOR hraje roli v metabolismu NO tím, že se účastní regulace vnitrobuněčné hladiny GSNO a nepřímo i dalších S-nitrosothiolů (Kubienová *et al.*, 2013b). S-nitrosylace HSP proteinů může mít negativní vliv na jejich chaperonovou funkci. Např. HSP90 vlivem S-nitrosylace ztrácí svou ATP-asovou aktivitu (Ali *et al.*, 2010). Ukázalo se, že v rostlinách hraje S-nitrosylace důležitou roli v modulaci aktivity imunního koaktivátoru NPR1, který je regulačním proteinem účinků signální dráhy kyseliny salicylové. V klidovém stavu buňky je NPR-1 přítomen v cytoplasmě buňky ve formě neaktivního oligomeru spojeného disulfidovými vazbami. Při patogenní infekci buněčná redukce podporuje vznik aktivních monomerů (Obr. 52), které jsou translokovány do jádra a podílejí se jako koaktivátory na expresi obranných genů (Spoel *et al.*, 2010).

Řada publikací popisuje významnou úlohu GSNOR v rostlinné odpovědi na stresové faktory. Je známo, že mechanický stres způsobuje represi genu pro GSNOR a snižuje aktivitu GSNOR, naopak aktivace genu a aktivita enzymu je zvýšena působením kyseliny salicylové (Kubienová *et al.*, 2013b).

5.4 Vliv působení teplotního stresu, kyseliny salicylové a infekce patogenem na hladiny ROS a NO

Histochemické metody lokalizace ROS a NO umožňují pouze relativní kvantifikaci těchto látek. V diplomové práci byl v listech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom detekován peroxid vodíku roztokem DAB, superoxid roztokem NBT a oxid dusnatý pomocí fluorescenční sondy DAF-FM DA. Listy rostliny nahG nebyly k dispozici z důvodu nedostatku semen těchto rostlin.

Listy nebo řezy listů byly následně také mikroskopovány. Mikroskopické metody jsou včetně přípravy vzorků časově náročné. Kvantifikace výsledků histochemické analýzy je poměrně subjektivní a náchylná k chybám. Vyhodnocování v programu ImageJ, který byl v diplomové práci používán, je velmi citlivé na manuálním výběru oblasti stanovení intenzity zbarvení.

Detekce peroxidu vodíku roztokem DAB poskytovala v místě lokalizace tohoto ROS hnědé zbarvení. Zdá se, že teplotní stres způsoboval maximální akumulaci H_2O_2 v prvním časovém intervalu, tedy po 2 h, poté produkce H_2O_2 postupně slábla (Obr. 32). To koresponduje s výsledky měření aktivity APX, která byla také nejvyšší v časné fázi obranné reakce.

Na listech, na které působila samotná kyselina salicylová o koncentraci $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, je viditelná hnědě zbarvená žilnatina oproti kontrole, ale jinak nejsou zaznamenány extrémně výrazné změny vůči kontrole v žádném časovém intervalu (Obr. 32). Hladiny H_2O_2 nejsou tolik zvýšeny, což může být způsobeno tím, že peroxid vodíku je používán k oxidaci kyseliny salicylové za vzniku superoxidu, přičemž je redukován na vodu (Kimura a Kawano, 2015).

Kombinace kyseliny salicylové a teplotního stresu vedla ke zvýšené akumulaci H_2O_2 vliv až po 24 h. V prvních dvou časových intervalech jsou listy bez skvrn (Obr. 32). Vysvětlení je stejné jako v případě kyseliny salicylové (Kimura a Kawano, 2015). Po 24 h je pozorován také nárůst aktivity APX, což značí že množství H_2O_2 je již toxicky vysoké vlivem působení teplotního stresu a je potřeba jej snížit enzymem APX.

U samotného působení patogenu se zdá, že nejvyšší produkce H_2O_2 nastává až po 24 h (Obr. 33), což může být zapříčiněno možným klíčením houbového vlákna až do rostlinného pletiva. Vlákno na svém konci tvoří appresorium, díky kterému se dostává přes buněčnou stěnu až k plasmatickým membránám buněk a patogen tak může získávat z listů rostlin živiny. Prudká produkce H_2O_2 vede k buněčné smrti napadených buněk a k zastavení přísunu živin patogenu (Hückelhoven, 2005). Aktivita APX byla v tomto časovém intervalu také nejvyšší. V prvních dvou časových intervalech je aktivita nižší, pravděpodobně v důsledku oxidace kyseliny salicylové H_2O_2 , který je tak redukován na vodu (Kimura a Kawano, 2015).

U listů, na které působila kombinace patogenu a SA, narůstá pravděpodobně akumulace H_2O_2 také v čase, ale není příliš vysoká oproti kontrolnímu listu. Aktivita APX byla u všech těchto listů nižší než kontrola (Obr. 33). Vysvětlením může být stejné tvrzení jako u výsledku kyseliny salicylové (Kimura a Kawano, 2015).

V případě působení patogenu a teplotního stresu byla nejvyšší akumulace H_2O_2 po 24 h, v předchozích teplotních intervalech byla srovnatelná s kontrolou. Aktivita askorbátperoxidasy nepřesáhla u žádného z časových intervalů aktivitu kontroly (Obr. 33). Zde tato skutečnost může být opět způsobena endogenní kyselinou salicylovou, jejímž vlivem je hladina H_2O_2 snížena (Kimura a Kawano, 2015).

Podobné trendy lze pozorovat i u lokalizace další formy ROS – superoxidu v listech rajčete roztokem NBT. Proces akumulace superoxidu v listech byl v jednotlivých časových intervalech podobný jako u peroxidu vodíku. Místo lokalizace superoxidu je možno detekovat pomocí tvorby modrého zbarvení. Avšak u kyseliny salicylové byla pozorována poměrně intenzivní akumulace superoxidu v prvních dvou časových intervalech (Obr. 36), což by odpovídalo hypotéze studie (Kimura a Kawano, 2015), která považuje superoxid za produkt oxidace kyseliny salicylové. V případě působení patogenu a jeho kombinace s kyselinou salicylovou či teplotním stresem nebyla zaznamenána zvýšená akumulace oproti kontrole, s výjimkou působení samotného patogenu v intervalu 24 h (Obr. 37), kdy může docházet k průniku houbových vláken do rostlinného pletiva (Hückelhoven, 2005). Ostatní listy mohou být málo zbarveny v porovnání s kontrolou z toho důvodu, že kontrolní list má poměrně velmi intenzivní zbarvení i v porovnání s listy, na které působil teplotní stres, což mohlo být způsobeno jeho mechanickým poškozením v případě neopatrné manipulace.

Studium oxidu dusnatého bylo v diplomové práci provedeno jeho histochemickou lokalizací v listech. Z grafického vyhodnocení intenzity zeleného zbarvení v oblasti cévních svazků lze vidět, že po působení faktorů na rostlinu byla ve všech případech hladina NO vyšší než u kontrolní rostliny, ať už je produkce NO iniciována kyselinou salicylovou přirozeně se vyskytující v rostlině či dodanou navíc ve formě postřiku. U vzorků s patogenem lze pozorovat stálé udržování vysoké hladiny NO působením SA (Obr. 44, 45). SA indukuje produkci NO, naopak NO stimuluje akumulaci SA. Obě signální molekuly mají synergistický účinek v obraně rostlin proti patogenní infekci (Zottiny *et al.*, 2007).

6 ZÁVĚR

Diplomová práce zahrnuje literární rešerši shrnující aktuální poznatky o rostlinných odpovědích a obraně proti teplotnímu stresu, se zaměřením na úlohu tzv. heat shock proteinů (HSP) v rostlinách.

V experimentální části byla optimalizována metoda Western blot pro analýzu hladiny HSP70 v listech rajčete, která byla následně využita ke stanovení hladin HSP v rostlinách rajčete genotypu *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom. Byly studovány hladiny reaktivních forem dusíku (RNS) a kyslíku (ROS) ve vztahu ke změnám specifických forem HSP proteinů v listech rajčat vystavených teplotnímu stresu, kyselině salicylové a biotrofnímu patogenu.

Problematika studia vztahů mezi RNS, ROS, kyselinou salicylovou a jejich signalizacemi v obranných odpovědích je velmi obsáhlá. Nejdůležitějším poznatkem v diplomové práci je, že všechny signální dráhy těchto molekul jsou pravděpodobně velmi úzce propojeny a společně se mohou podílet na signalizaci obranné odpovědi vůči exogenním stresům působícím na rostlinu. Součástí obranné odpovědi může být i produkce HSP.

V mnoha studiích je uváděno, že kyselina salicylová sama o sobě nemůže vyvolat tvorbu HSP70, dokáže pouze zvýšit vazbu HSF na DNA. Dle výsledků diplomové práce kyselina salicylová sice nedokáže zvýšit hladiny teplotně indukovaných HSP70, avšak má schopnost zvýšit hladinu konstitutivně exprimovaných HSP70.

Experimenty bylo potvrzeno, že kyselina salicylová v přítomnosti teplotního stresu dokáže zvýšit hladinu HSP70. Této skutečnosti by se dalo v budoucnu využívat v oblastech s teplým podnebím. Aplikace postřiku kyselinou salicylovou na tamní plodiny by mohla v kombinaci s vyšší teplotou indukovat zvýšenou akumulaci HSP70, které by pak mohly hypoteticky zvýšit odolnost rostliny.

Při měření aktivit enzymů bylo zjištěno, že aktivita enzymu APX je snižována kyselinou salicylovou, a naopak aktivita GSNOR je kyselinou salicylovou zvyšována. Tento fakt vede k závěru, že kyselina salicylová má pravděpodobně značný vliv na hladiny ROS a RNS v rostlině.

Výsledky histochemických analýz naznačují, že molekula SA zesiluje akumulaci NO, se kterým společně synergizují v obranně rostliny proti patogenní infekci.

V rámci dalšího studia této problematiky se nabízí zaměřením se na expresi teplotně indukovaných izoform HSP70 v rostlinách po působení kombinace kyseliny salicylové

a teplotního stresu a provedení dalších metod, které by více napověděly o propojení signálních drah odpovědi rostlin na teplotní stres.

7 LITERATURA

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2007): How Cells Read the Genome: From DNA to Protein. In: *Molecular Biology of the Cell*. 5. vydání, (Anderson M., Granum S.), Garland Science, USA, 1392 stran.

Alexander M. M., Cilia M. (2016): A molecular tug-of-war: Global plant proteome changes during viral infection. *Current Plant Biology* **5**, 13–24.

Ali Y. O., Kitay B. M., Zhai R. G. (2010): Dealing with Misfolded Proteins: Examining the Neuroprotective Role of Molecular Chaperones in Neurodegeneration. *Molecules* **15**, 6859–6887.

Ambrose A. K., Tian Z., Wang Y., Smith J., Zylstra G., Huang B., Belanger F. C. (2015): Functional characterization of salicylate hydroxylase from the fungal endophyte *Epichloë festucae*. *Scientific Reports* **5**, 11–17.

Aufricht Ch. (2005): Heat-shock protein 70: molecular supertool? *Pediatric Nephrology* **20**, 707–713.

Baniwal S. K., Bharti K., Chan K. Y., Fauth M., Ganguli A., Kotak S., Mishra S. K., Nover L., Port M., Scharf K. D., Tripp J., Weber C., Zielinski D., von Koskull-Döring P. (2004): Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *Journal of Biosciences* **29**, 471–487.

Bárta J., Bártová V., Čurn V. (2010): Analýza proteinů pomocí automatické čipové elektroforézy Experion a porovnání s metodou SDS-PAGE. *Chemické listy* **104**, 33–40.

Byth H. A., Kuun K. G., Bornman L. (2001): Virulence-dependent induction of Hsp70/Hsc70 in tomato by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Psychology and Biochemistry* **39**, 697–705.

Cansev A., Gulen H., Eris A. (2011): The Activities of Catalase and Ascorbate Peroxidase in Olive (*Olea europaea* L. cv. Gemlik) under Low Temperature Stress. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **52**, 113–120.

Cronje M. J., Bornman L. (1999): Salicylic Acid Influences Hsp70/Hsc70 Expression in *Lycopersicon esculentum*: Dose- and Time-Dependent Induction or Potentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **265**, 422–427.

Cronje M. J., Weir I. E., Bornman L. (2004): Salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 induction correlates with reduced apoptosis in tobacco protoplasts. *Cytometry* **61 A**, 76–87.

Díaz M., Achkor H., Titarenko E., Martinez M. C. (2003): The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Letters* **543**, 136–139.

Dimmeler S., Haendeler J., Nehls M., Zeiher A. M. (1997): Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protei (CPP)-32-like proteases. *Journal of Experimental Medicine* **185**, 601–607.

Espunya M. C., Roberto D. M., Cadenas G. A., Martínez M. C. (2012): S-Nitrosoglutathione is a component of wound- and salicylic acid-induced systemic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3219–3227.

Fawzi N. L., Okabe Y., Yap E. H., Head-Gordon T. (2007): Determining the Critical Nucleus and Mechanism of Fibril Elongation of the Alzheimer's A β _{1–40} Peptide. *Journal of Molecular Biology* **365**, 535–550.

Foster M. W., Hess D. T., Stamler J. S. (2009): Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends in Molecular Medicine* **15**, 391–404.

Fragnière C., Serrano M., Abou-Mansour E., Métraux J. P., L'Haridon F. (2011): Salicylic acid and its location in response to biotic and abiotic stress. *FEBS Letters* **585**, 1847–1852.

Garavaglia B. S., Garofalo C. G., Orellano E. G., Ottado J. (2009): HSP70 and HSP90 expression in citrus and pepper plants in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *European Journal of Plant Pathology* **123**, 91–97.

Ghosh A. (2014): Small heat shock proteins (HSP12, HSP20 and HSP30) play a role in *Ustilago maydis* pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters* **361**, 17–24.

Gong B., Wen D., Wang X., Wei M., Yang F., Li Y., Shi Q. (2015): S-Nitrosoglutathione Reductase-Modulated Redox Signaling Controls Sodic Alkaline Stress Responses in *Solanum lycopersicum* L. *Plant and Cell Physiology* **56**, 790–802.

- Gould K. S., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A., Wendehenne D. (2003): Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant, Cell and Environment* **26**, 1851-1862
- Grigorova B., Vaseva I. I., Demirevska K., Feller U. (2011): Expression of selected heat shock proteins after individually applied and combined drought and heat stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 2041-2049.
- Gupta S. D., Ibaraki I. (2015): ROS and NOS imaging using microscopical techniques. In: *Plant Image Analysis: Fundamentals and Applications*. (Gupta S. D., Ibaraki I.), CRC Press, USA, 398 stran.
- Gurley W. B., Key J. L. (1991): Transcriptional regulation of the heat-shock response: a plant perspective. *Biochemistry* **30**, 1-12.
- Halim V. A., Lennart E. L., Altmann S., Birschwilks M., Scheel D., Rosahl S. (2007): Salicylic acid Is Important for Basal Defense of *Solanum tuberosum* Against *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 1346-1352.
- <http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp60.php> (30.9.2017)
- Hückelhoven R. (2005): Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiology Letters* **245**, 9-17.
- Hussain A. (2013): *The role of tomato S-nitrosogluthione reductase (GSNOR) in plant development and disease resistance*. Disertační práce, the University of Edinburgh, Edinburgh.
- Chennubhotla Ch. a Bahar I. (2006): Markov propagation of allosteric effects in biomolecular systems: application to GroEL–GroES. *Molecular Systems Biology* **2**, 1-13.
- Choudhary D. K., Kasotia A., Jain S., Vaishnav A., Kumaris S., Sharma K. P. (2016): Bacterial-Mediated Tolerance and Resistance to Plants Under Abiotic and Biotic Stresses. *Journal of Plant Growth Regulation* **35**, 276-300.
- Jahnová J., Tichá T., Kubienová L., Luhová L., Petřivalský M. (2013): Biologické funkce a význam S-nitrosace proteinů. *Chemické Listy* **107**, 350-355.
- Jones J. D., Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Juurling B. H. J., Azouz H. J., Aldalati A. M. Z., AlTinawi B. M. H., Ganguly P. (2014): Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system. *Nutrition Journal* **13**, ISSN 1475-2891.
- Kanzaki H., Saitoh H., Ito A., S. Fujisawa, Kamoun S., Katou S., Yoshioka H., Terauchi R. (2003): Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of ONF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology* **4**, 383-391.
- Khan M. I. R., Fatma M., Per T. S., Anjum N. A. Khan N. A. (2015): Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**, ISSN 1664-462X.
- Kimura M., Kawano T. (2015): Salicylic acid-induced superoxide generation catalyzed by plant peroxidase in hydrogen peroxide-independent manner. *Plant Signaling & Behavior* **10**, ISSN 1559-2324..
- Klessig D. F., Durner J., Noad R., Navarre D. A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J. M., Shahi J., Shuqun Z., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E., Silva H. (2000): Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 8849–8855.
- Kotak S., Larkindale J., Lee U., von Koskull-Döring P., Vierling E., Scharf K.D. (2007): Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 310-316.
- Kubienová L., Sedlářová M., Wünschová A., Piterková J., Luhová L., Mieslerová B., Lebeda A., Navrátil M., Petřivalský M. (2013a): Effect of extreme temperatures on powdery mildew development and Hsp70 induction in tomato and wild *Solanum* spp. *Plant Protection Science* **49**, S41–S54.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Mieslerová B., Petřivalský M. (2014): Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosogluthione in plants. *Planta* **239**, 139-146.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2013b): S-nitrosogluthionreduktasa: klíčový enzym regulace S-nitrosylace. *Chemické Listy* **107**, 202-208.

- Kupková Z., Beneš L. (2004): Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chemické Listy* **98**, 116-122.
- Larkindale J., Knight M. R. (2002): Protection against Heat Stress-Induced Oxidative Damage in Arabidopsis Involves Calcium, Abscisic Acid, Ethylene, and Salicylic Acid. *Plant Physiology* **128**, 682-695.
- Lee U., Wie Ch., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E. (2008): Modulation of Nitrosative Stress by S-Nitrosoglutathione Reductase Is Critical for Thermotolerance and Plant Growth in Arabidopsis. *American Society of Plant Biologists* **20**, 786-802.
- Letterier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J. M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2011): Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 789-793
- Li Y., Loake G. J. (2016): *Plant Transcription Factors*. 1 st ed., Elsevier, USA, 434 stran.
- Mainz E. R., Gunasekara D. B., Caruso G., Jensen D. T., Hulvey M. K., da Silva J. A. F., Metto E. C., Culbertson A. H., Culbertson Ch. T., Lunte S. M. (2012): Monitoring intracellular nitric oxide production using microchip electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Analytical Methods* **4**, 414-420.
- Mittler R., Finka A., Goloubinoff P. (2012): How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences* **37**, 118-125.
- Miura K., Tada Y. (2014): Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science* **5**, ISSN 1664-462X.
- Morimoto R. (2010): Shock and Age. *The Scientist Magazine* **24**, ISSN 0890-3670.
- Morse A. M., Tschaplinski T. J., Dervinis Ch., Pijut P. M., Schmelz E. A., Day W., Davis J. M. (2007): Salicylate and catechol levels are maintained in nahG transgenic poplar. *Phytochemistry* **68**, 2043–2052.
- Mostofa M. G., Fujita M., Tran L. S. P. (2015): Nitric oxide mediates hydrogen peroxide- and salicylic acid- induced salt tolerance in rice (*Oryza sativa L.*) seedlings. *Plant Growth Regulation* **77**, 265-277.
- Mulaudzi T., Ludidi N., Ruzvidzo O., Morse M., Hendricks N., Iwuoha E., Gehring Ch. (2011): Identification of novel Arabidopsis thaliana nitric oxide-binding molecule with guanylate cyclase activity in vitro. *FEBS letters* **585**, 2693-2697.
- Mur L. A. J., Carver T. L. W., Prats E. (2006): NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **57**, 489–505.
- Namdjoyan S., Kermanian H., Soorki A. A., Tabatabaei S. M. (2017): Interactive effects of Salicylic acid and nitric oxide in alleviating zinc toxicity of Safflower (*Carthamus tinctorius L.*). *Ecotoxicology* **26**, 752-761.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1237-1247.
- Parankusam S., Adimulam S. S., Bhatnagar-Mathur P., Sharma K. K. (2017): Nitric Oxide (NO) in Plant Heat Stress Tolerance: Current Knowledge and Perspectives. *Frontiers in Plant Science* **8**, ISSN 1664-462X.
- Park Ch. J., Seo Y.S. (2015): Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *The Plant Pathology Journal* **31**, 323-333.
- Pegoraro C., Mertz L. M., Maia L. C., Rombaldi C. V., Oliveira A. C. (2011): Importance of Heat Shock Proteins in Maize. *Journal of Crop Science and Biotechnology* **14**, 85-95.
- Piterková J., Luhová L., Mieslerova B., Lebeda A., Petřivalský M. (2013): Nitric oxide and reactive oxygen species regulate the accumulation of heat shock proteins in tomato leaves in response to heat shock and pathogen infection. *Plant Science* **207**, 57-65.
- Piterková L., Luhová L., Petřivalský M. (2008): Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chemické Listy* **102**, 410-416.
- Pockley A. G. (2001): Regulation of transcription of heat shock protein genes by heat shock factor. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **20**, ISSN 1462-3994.
- Qu A. L., Ding Y. F., Jiang Q., Zhu Ch. (2013): Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **432**, 203-207.
- Reis S. P., Lima A. M., De Souza C. R. B. (2012): Recent Molecular Advances on Downstream Plant Responses to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 8628-8647.

- Ruelland E., Zachowski A. (2010): How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany* **69**, 225-232.
- Santolini J., André F., Jeandroz S., Wendehenne D. (2017): Nitric oxide synthase in plants: Where do we stand? *Nitric oxide* **63**, 30-38.
- Schweigert N., Acero J. L., Von Gunten U., Canonica S., Zehnder A. J. B., Eggen R. I. L. (2001): Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiology* **3**, 81-91.
- Simontacchi M., Galatro A., Ramos-Artuso F., Santa-Maria G. E. (2015): Plant Survival in a Changing Environment: The Role of Nitric Oxide in Plant Responses to Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science* **6**, ISSN 1664-462X.
- Smýkal P., Hrdý I., Pechan P. M. (2000): High-molecular-mass complexes formed in vivo contain smHSPs and HSP70 and display chaperone-like activity. *European Journal of Biochemistry* **267**, 2195-2207.
- Snyman M., Cronje M. J. (2008): Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2125–2132.
- Song L., Ding W., Zhao M., Sun B., Zhang L. (2006): Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Science* **171**, 449–458.
- Spoel S. H., Tada Y., Loake G. J. (2010): Post-translational protein modification as a tool for transcription reprogramming. *New Phytologist* **186**, 333-339.
- Timperio A. M., Egidi M. G., Zolla L. (2008): Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics* **71**, 391-411.
- Toda N., Toda H. (2011): Coronary hemodynamic regulation by nitric oxide in experimental animals: Recent advances. *European Journal of Pharmacology* **667**, 41-49.
- Torres M. A., Jones J. D. G., Dangl J. L. (2006): Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology* **141**, 373-378.
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M. R. (2007): Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* **61**, ISSN 00988472.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004): Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* **9**, 244-252.
- Wang X., Yan B., Shi M., Zhou W., Zekria D., Wang H., Kai G. (2016): Overexpression of a *Brassica campestris* HSP70 in tobacco confers enhanced tolerance to heat stress. *Protoplasma* **253**, 637-645.
- Waters E. R., Lee G. J., Vierling E. (1996): Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* **47**, 325-338.
- Wees S. C. M., Glazebrook J. (2003): Loss of non-host resistance of *Arabidopsis* NahG to *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola is due to degradation products of salicylic acid. *The Plant Journal* **33**, 733-742.
- Wirth D., Gustin P., Drion P.V., Dessy-Doize C., Chriatians E. S. (2002): Les protéines de choc thermique (heat shock proteins): Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques. *Annales de Médecine Vétérinaire* **146**, 201-216.
- Yamamoto D., Ando T. (2016): Chaperonin GroEL–GroES Functions as both Alternating and Non-Alternating Engines. *Journal of Molecular Biology* **428**, 3090-3101.
- Yamauchi Y., Kunishima M., Mizutani M., Sugimoto Y. (2014): Reactive short-chain leaf volatiles act as powerful inducers of abiotic stress-related gene expression. *Scientific Reports* **5**, ISSN 2045-2322.
- Zafar S. A., Hussain M., Raza M., Ahmed H. G. M. D., Rana I. A., Sadia B., Atif R. M. (2016): Genome wide analysis of heat shock transcription factor (HSF) family in chickpea and its comparison with *Arabidopsis*. *Plant Omics* **9**, 136-141.
- Zheng Y., Shen L., Mengmeng Y., Fan B., Zhao D., Liu L., Shenf J. (2011): Nitric oxide synthase as a postharvest response in pathogen resistance of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* **60**, 38-46.
- Zottini M., Costa A., Michele R. D., Ruzzene M., Carimi F., Schiavo F. L. (2007): Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1397–1405.

Zwirowski S., Obuchowski I., Klosowska A., Liberek K. (2017): Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding. *The EMBO Journal* **36**, 783-796.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA/BIS	Akrylamid-N,N'-bisakrylamid
APS	Persíran amonný
ACD	α -krystalinová doména
ADP	Adenosindifosfát
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-hydrochloride
APX	Askorbátperoxidasa
ATP	Adenosintrifosfát
Avr	Gen avirulence
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
BIP	Vazebný imunoglobulinový protein
BSA	Hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCT	Chaperoninový komplex obsahující TCP1
Clp	C-typ lektinový protein
Cpn	Chaperonin
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
c-PTIO	Karboxy-PTIO
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOD	Délka optické dráhy
DPI	Diphenyleneiodonium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ETI	Efektorem vyvolaná imunita
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
HR	Hypersenzitivní odpověď
HRP	Křenová peroxidasa
HSBP1	Vazebný protein teplotního šoku
HSC	Konstitutivně exprimované heat-shock proteiny
HSE	Element teplotního šoku, sekvence vazby HSF na DNA

HSF	Faktor teplotního šoku
hsmRNA	Mediátorová RNA teplotního šoku
HSP	Proteiny teplotního šoku
HSR	Odpověď na teplotní stres
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MBF1C	Multiproteinový přemosťující faktor
mRNA	Mediátorová RNA
NAD ⁺	Nikotinamidadeninukleotid v oxidované formě
NADH	Nikotinamidadeninukleotid v redukované formě
NBT	Nitroblue tetrazolium chlorid
NOS	Syntasa oxidu dusnatého
NPR-1	Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1
P	Patogen
P+SA	Patogen a kyselina salicylová
P+TS	Patogen a teplotní stres
PAL	Fenylalaninamoniaklyasa
PAMP	S patogenem asociované vzory
PR proteiny	Proteiny spojené s patogenezí
PRR	Receptory pro nebezpečné vzory
PTI	PAMP vyvolaná imunita
PTIO	2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl 3-oxid
R	Gen rezistence
RBOH	Geny „respiratory burst oxidase homologs“
RNA	Ribonukleová kyselina
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RUBISCO	Ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa
SA	Kyselina salicylová
SA+TS	Kyselina salicylová a teplotní stres
SAR	Systémová získaná rezistence
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS
smHSP	Malé proteiny teplotního šoku
TBS	Tris-buffered Saline

TBS-T	Tris-buffered Saline s Tweenem
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TS	Teplotní stres