

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Funkcia oxidu dusnatého v signálnych dráhach kyseliny salicylovej v odpovedi rastlín na teplotný stres

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Štefan Šatka
Študijný program:	N1406 Biochemie
Študijný odbor:	Biochemie
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúca práce:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2020

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bol som zoznámený s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 11. 5. 2020

Bc. Štefan Šatka

Týmto by som rád poďakoval svojmu školiteľovi, doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr za odborné vedenie, konzultácie a literatúru poskytnutú pre vypracovanie teoretickej a praktickej časti tejto diplomovej práce.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Štefan Šatka
Názov práce	Funkcia oxidu dusnatého v signálnych dráhach kyseliny salicylovej v odpovedi rastlín na teplotný stres
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biochemie
Vedúca práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Zvyšovanie teploty je znateľným prejavom zmeny klímy Zeme. Teplotný stres, značné zvýšenie teploty prostredia nad úroveň optima predstavuje hrozbu obzvlášť pre sesilné organizmy, vrátane rastlín. Vysoká teplota negatívne ovplyvňuje molekulové procesy v rastlinných bunkách, čo sa odzrkadľuje v poklese výnosnosť hospodársky dôležitých plodín.

Teoretická časť diplomovej práce zhrňa aktuálne informácie o mechanizmoch rastlinnej odpovede na teplotný stres (HSR) a proteínoch teplotného šoku (HSP). Vysoká teplota v bunkách aktivuje signálnu dráhu HSR, ktorá vedie k obnove narušenej homeostázy bunky. Konzervovaným znakom HSR všetkých živých organizmov je produkcia HSP, ktoré zabezpečujú integritu a správnu funkciu proteómu. Z tohto dôvodu sú esenciálne pre zvládnutie HS, počas ktorého obnovujú teplotom narušenú priestorovú skladbu proteínov.

Experimentálna časť práce je zameraná na štúdium funkcie oxidu dusnatého a kyseliny salicylovej (SA), ktoré sú súčasťou signálnej dráhy HSR. Pozornosť bola zameraná na zmeny v expresii HSP70 a aktivite antioxidantného enzýmu askorbátperoxidázy (APX) vplyvom modulácie hladín NO a SA u divokého typu rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L. kultivar Amateur) a divokého typu *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). Bola optimalizovaná metóda pre stanovenie HSP70 založená na SDS-PAGE a Western blote. V listoch rajčiaka a *Arabidopsis* exogénna aplikácia SA a tiež donoru NO (nitroprussid sodný) potencovala expresiu HSP70 v rámci HSR. Donor NO pozitívne stimuloval aktivitu APX v odpovedi na teplotný stres. Výsledky práce ukazujú, že SA a donor NO môžu zmierňovať negatívne účinky HS.

Kľúčové slová	<i>Arabidopsis thaliana</i> , askorbátperoxidáza, heat shock proteíny, kyselina salicylová, oxid dusnatý, <i>Solanum lycopersicum</i>
Počet strán	102
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Štefan Šatka
Title	The role of nitric oxide in signalling pathways of salicylic acid and plant responses to heat stress
Type of thesis	Master
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr
The year of presentation	2020

Abstract

Rising temperature is a visible sign of the Earth's climate change. Heat stress, as a significant increase in an ambient temperature above the optimum level, represents a threat especially to the sessile organisms including plants. High temperatures negatively affect molecular processes in plant cells and these processes are reflected in the decline in the yields of economically important crops.

The theoretical part of the thesis deals with the current information about the mechanism of plants response to the Heat stress and the Heat Shock Proteins (HSP). The high temperature in the cells activates the Heat Shock Response (HSR) pathway which leads to the recovery of disrupted cell homeostasis. A conserved feature of HSRs in other living organisms is the production of Heat Shock Proteins (HSP) which ensure the integrity and proper function of the proteome. HSPs are therefore essential to handle the HS because they recover the disrupted spatial conformation of proteins by heat during the heat stress.

The experimental part of the thesis is focused on the study of the function of nitric oxide (NO) and salicylic acid (SA) which are parts of the HSR signalling pathways. Experiments were focused on the changes in the expression of HSP70 and the enzyme activity of the ascorbate peroxidase (APX) due to the modulation of NO and SA levels in wild-type tomato (*Solanum lycopersicum* L. cultivar Amateur) and in the wild-type *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). The method for the determination of HSP70 based on SDS-PAGE and Western blot was optimized. The expression of HSP70 within the HSR was reinforced by the exogenous application of SA as well as the NO donor (sodium nitroprusside) in the leaves of tomato and the leaves of *Arabidopsis*. The NO donor positively stimulated APX activity in response to the Heat stress. The results show that SA and NO donor are able to ameliorate adverse effect of heat stress.

Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , ascorbate peroxidase, heat shock proteins, heat stress, nitric oxide, salicylic acid, <i>Solanum lycopersicum</i>
Number of pages	102
Number of appendices	0
Language	Slovak

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Súčasný stav riešenej problematiky	3
2.1	Vplyv vysokej teploty a teplotného stresu na rastliny	3
2.1.1	Vplyv teplotného stresu na biochemické procesy rastlín.....	3
2.2	Kyselina salicylová a teplotný stres.....	4
2.2.1	Biosyntetický aparát SA.....	6
2.3	Oxid dusnatý	8
2.3.1	Oxid dusnatý a HS	10
2.4	Dráha odpovede na teplotný stres	12
2.4.1	Vápniková signalizácia	12
2.4.2	Konvertory vápnikovej signalizácie.....	15
2.4.3	Reaktívne formy kyslíka (ROS).....	16
2.5	Prepojenie signálnych dráh SA a NO pri teplotnom strese.....	18
2.6	Receptory SA	18
2.7	Proteíny teplotného šoku.....	20
2.7.1	Funkcia HSP	21
2.7.2	Odpovede na úrovni konformácie proteínov	22
2.7.3	Zmeny génovej expície počas teplotného stresu	25
2.7.4	Heat shock faktory rastlín	27
2.7.5	Delenie HSP podľa molekulovej hmotnosti.....	32
2.7.6	Malé HSP	33
2.7.7	HSP70	34
2.7.8	HSP60	41
2.7.9	HSP100	43
2.7.10	HSP90	46
3	Experimentálna časť.....	47
3.1	Chemikálie	47
3.2	Prístrojové vybavenie.....	48
3.3	Rastlinný materiál	48
3.3.1	Pestovanie rastlín	48
3.4	Metódy	48
3.4.1	Roztoky	48

3.4.2	Zásobné roztoky pre SDS-PAGE.....	48
3.4.3	Zásobné roztoky pre Western blot	50
3.4.4	Ostatné zásobné roztoky	51
3.4.5	Stresovanie listov rastlín	51
3.4.6	Príprava rastlinných vzoriek	52
3.4.7	SDS-PAGE.....	52
3.4.8	Western blot	53
3.4.9	Stanovenie enzýmovej aktivity APX	54
3.4.10	Stanovenie proteínov Bradfordovou metódou	55
3.4.11	Histochemická detekcia oxidu dusnatého	55
4	Výsledky	57
4.1	Histochemická detekcia reaktívnych foriem dusíka	57
4.2	Štúdium vplyvu modulácie hladín NO a SA na akumuláciu HSP70 pri teplotnom strese	64
4.3	Optimalizácia kvantifikácie HSP70 v extraktoch listov rastlín	65
4.3.1	Vplyv zloženia extraktu na stanovenie HSP70	65
4.4	Vplyv zloženia extrakčného pufru a vzorkovacieho pufru na stanovenie HSP70 67	
4.4.1	Vplyv pomeru extrakcie na stanovenie HSP70.....	69
4.5	Analýza hladiny HSP70 v listoch rastlín pri vystavení teplotnému stresu, kyseliny salicylovej, donoru NO a lapaču NO.....	70
4.6	Sledovanie zmien aktivity APX v listoch rajčiaka, pri vystavení teplotnému stresu, kyseliny salicylovej, donoru NO a lapaču NO	72
5	Diskusia.....	74
5.1	Optimalizácia stanovenia HSP70 v listoch rajčiaka a <i>Arabidopsis</i>	74
5.2	Vplyv kyseliny salicylovej, donoru NO a lapaču NO na hladiny HSP70 v listoch rastlín vystavených teplotnému stresu.....	75
5.2.1	Účinok NO a SA na akumuláciu HSP70	77
5.3	Histochemická detekcia reaktívnych foriem dusíka	79
5.3.1	Mechanizmus signalizácie SA a NO pri HS, vzťah SA a NO	81
5.4	Modulácia aktivity APX	82
6	Záver	85
7	Literatúra.....	86
8	Zoznam použitých skratiek	102

Ciele práce:

V teoretickej časti predloženej diplomovej práce bolo cieľom spracovať literárnu rešerš:

- zhrňujúcu aktuálne poznatky o rastlinných odpovediach a obrane proti teplotnému stresu so zameraním na úlohu signálnych dráh oxidu dusnatého a kyseliny salicylovej.

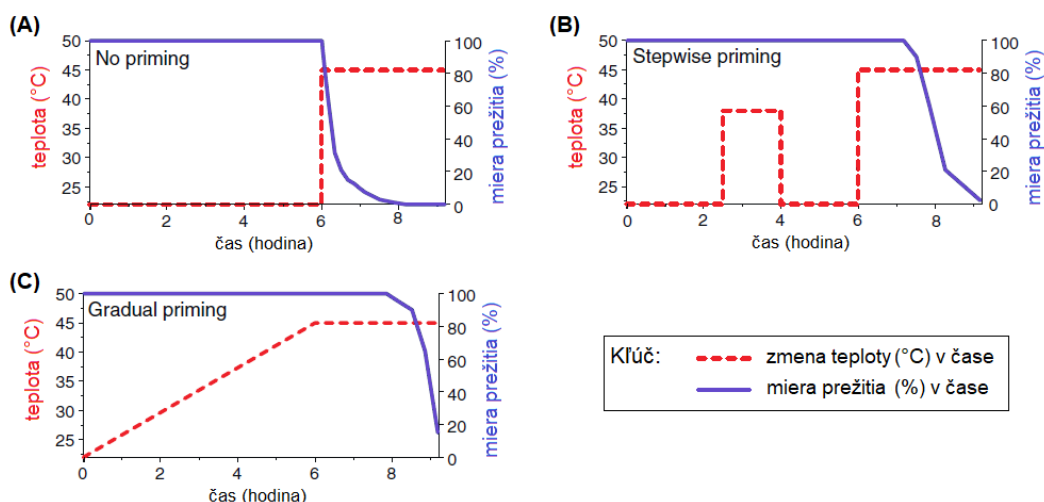
V experimentálnej časti boli cieľmi práce:

- optimalizácia metód stanovenia hladiny NO a metabolitov reaktívnych foriem dusíka a metódy sledovania aktivity enzýmov metabolizmu NO v rastlinných bunkách
- štúdium modulácie hladín NO a reaktívnych foriem dusíka v listoch modelových rastlín vystavených teplotnému stresu a pôsobeniu fytohormónu kyseliny salicylovej.

1 ÚVOD

Teplota je kľúčový enviromentálny faktor, ktorý ovplyvňuje rast rastlín a ich prežitie. Teplotné variácie sa podieľajú na regulácii fyziologických procesov, napr. počas dňa a noci, diurnálna perióda, riadi biologické hodiny rastliny, z dlhodobého hľadiska sezónne zmeny riadia časovanie prechodu z vegetatívneho do reprodukčného štádia (Gould *et al.*, 2006). V prirodzenom prostredí sa rastliny stretávajú s viacerými biotickými a abiotickými stresmi, spravidla kombináciou hneď niekoľkých. Teplotný stres (HS) je často definovaný ako perióda, počas ktorej pôsobenie vysokých teplôt zapríčini nevratné poškodenie vývoja rastliny (Hemantaranjan *et al.*, 2014).

Teplotný stres narúša fyziologické procesy rastlín v rôznom rozsahu, v závislosti od konkrétneho rastlinného druhu a vývojového štádia. Rovnako rozhodujúcou je intenzita, doba pôsobenia a rýchlosť zvyšovania teploty (obr. 1). Vplyv HS sa negatívne odzrkadľuje na vývoji a raste, pričom intenzívny a dlhotrvajúci HS vo výsledku končí smrťou buniek a úhynom celej rastliny. Miera prežitia HS sa však zvyšuje v prípade, keď samotnému HS predchádza expozícia rastliny mierne zvýšenej teplote nasledovaná jej poklesom (obr. 1b) (Larkindale a Vierling, 2008). Tento dej môžeme eventuálne označiť ako tzv. prípravu na HS. Rastlina sa týmto spôsobom aklimatizuje a stáva tolerantnejšou k inak letálnemu HS, pretože spúšťa expresiu proteínov teplotného šoku (HSP) a detoxikačných enzýmov pre reaktívne druhy kyslíka (ROS) (Li *et al.*, 2018). Tento fenomén sa nazýva získaná termotolerancia. Naopak, bazálna termotolerancia sa vzťahuje na schopnosť odolať vysokým teplotám bez predchádzajúcej aklimatizácie (Clarke *et al.*, 2004).



Obr. 1 Všeobecná schéma znázorňujúca mieru prežitia rastlín v závislosti od teploty a jej dynamiky. A) bazálna termotolerancia, B) získaná termotolerancia, C) postupné zvyšovanie teploty (upravené podľa Mittler *et al.*, 2012).

Napokon sa prírode stretávame s postupným zvyšovaním teploty k hodnote predstavujúcej HS (obr. 1c). V tomto prípade je miera prežitia rastliny najvyššia v porovnaní s prechádzajúcimi dvoma prípadmi (Larkindale a Vierling, 2008).

Schopnosť vnímať a odpovedať na stresové podnety je vitálnou funkciou všetkých živých organizmov. Narušenie homeostázy bunky a poškodenie bunkových štruktúr (DNA, proteínov, membrán apod.) v bunke aktivuje špecifické a nešpecifické obranné odpovede. Bunky sú schopné rozpoznať mieru poškodenia a následne aktiváciou viackrokových obranných mechanizmov obnoviť homeostázu alebo zahájiť proces programovanej bunkovej smrti, apoptózy (Balogh *et al.*, 2013). HS podnecuje narušenie normálneho priebehu bunkových dejov, čo u buniek vedie k spusteniu odpovede na teplotný stres (heat-shock odpovede, heat-shock response, HSR). HSR je považovaná za jednu z najviac evolučne konzervovaných biochemických dráh naprieč rôznymi typmi organizmov. HSR predstavuje dočasné preprogramovanie génovej expresie sprevádzané syntézou HSP (Verghese *et al.*, 2012).

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Vplyv vysokej teploty a teplotného stresu na rastliny

Medzi makroskopicky pozorovateľné známky mierne zvýšenej teploty, všeobecne o 5 až 6°C patria inhibícia tvorby semien ale urýchlenie klíčenia semien, predčasné kvitnutie, mikroskopicky možno pozorovať napr. zníženú tvorbu prieduchov (Fitter a Fitter, 2002), zmena organizácie bunkových kompartmentov, cytoskeletu a mikrodomén membrán (Niu a Xiang, 2018). Do určitej miery zvýšená teplota zrýchľuje rast vegetatívnych listov a koreňa (Fitter a Fitter, 2002). Významný je pokles odolnosti voči infekciám, odpoveď a vysporiadanie sa s vysokou teplotou je pre rastliny prvoradé (Alcázar a Parker, 2011). Z uvedených informácií vyplýva, že zvýšená teplota čiastočne pozitívne vplýva na fyziológiu rastlín, to však neplatí o HS (Kanno *et al.*, 2009).

Teplotný stres, všeobecne teplota presahujúca optimum asi o 10°C sa manifestuje nízkou klíčivosťou semien, zhoršeným rastom koreňa a nadzemnej časti, zníženým kvitnutím (Wahid *et al.*, 2007), že reprodukčné štádium rastlín je najviac citlivé na HS (Sage *et al.*, 2015). HS zapríčiňuje nedostatočný vývoj plodov, predčasnú senescenciu, ukladanie kalózy a opadávanie listov (Wahid *et al.*, 2007).

HS redukuje výnosnosť hospodársky dôležitých plodín. Medzi rokmi 1980 a 2008 bol zaznamenaný pokles výnosnosti kukurice o 3,8 % a pšenice o 5,5 % v dôsledku globálneho otepľovania (Lobell *et al.*, 2011) a predpokladá sa, že nárast priemernej svetovej teploty o 1°C zníži výnosnosť týchto plodín o ďalších 7,4 % a 6 % v prípade pšenice (Zhao *et al.*, 2017). Pri súčasnom trende sa predpovedá nárast priemernej svetovej teploty o 2,6 až 4,8°C do konca 21. storočia. Nie len tento predpoklad ale aj fakt, že populácia našej planéty z roka na rok rastie zdôrazňuje potrebu získať detailné poznatky rastlinnej biochémie za podmienok HS, ktoré budú v budúcnosti použité na zmiernenie nežiadúcich prejavov vysokej teploty (Li *et al.*, 2018). Napriek tomu, že HS často krát sprevádza salinitný stres, sucho a intenzívne svetelné žiarenie je potrebné samostatne objasniť účinok HS a jeho dôsledky, aby sa zmiernili efekty kombinovaných stresov (Bita a Gerats, 2013).

2.1.1 Vplyv teplotného stresu na biochemické procesy rastlín

Narušenie homeostázy HS sa na bunkovej a molekulovej úrovni prejavuje rýchlou inhibíciou fotosyntézy, čo sa odzrkadľuje poklesom fotosyntetickej kapacity, výkonu asimilácie, zmenou štruktúry tylakoidov, ktoré opúchajú a strácajú svoje charakteristické

usporiadanie. Poškodenie fotosystému II (PSII), cytoskeletárnych a iných proteínov spôsobuje vysoká teplota (Nazar *et al.*, 2017), pretože negatívne vplýva na konformáciu proteínov a podnecuje oxidačný stres. Vplyvom HS najskôr dochádza k strate kvartérnej štruktúry proteínových komplexov, tým k redukovaniu produktívnych proteín-proteínových interakcií, čo ruší nadväznosť reakcií v biochemických dráhach vrátane plynulosti transportu elektrónov (v respiračnom reťazci a primárnej fáze fotosyntézy) a vedie k produkcii veľkého množstva ROS (Suzuki a Mittler, 2006). Vysoká teplota inhibuje transfer elektrónov na akceptorovej strane PSII. Peroxidácia membránových lipidov a strata iónov mangánu z mangánového klastru sú hlavnými dôvodmi inaktívácie transportu elektrónov na donorovej strane PSII počas HS (Niu a Xiang, 2018).

Proteíny vplyvom HS denaturujú a vo väčšej miere sú degradované, tak isto zoxidované proteíny sú viac citlivé na účinok proteáz (Reichmann *et al.*, 2018). Oxidačne poškodené a denaturované proteíny majú pozmenenú terciárnu štruktúru. Na povrchu proteínov sa objavia hydrofóbne aminokyselinové reziduá normálne sa vyskytujúce vo vnútri proteínovej štruktúry, čo proteínom umožňuje agregovať (Pospíšil a Yamamoto, 2017). Proteíny PSII sú vplyvom radikálov oxidované, štiepené, pričom môžu medzi sebou vytvárať kovalentné väzby, a týmto spôsobom ireverzibilne agregovať (Pospíšil a Yamamoto, 2017). Nadmerná produkcia ROS vyvoláva oxidačný stres, ktorý sekundárne sprevádza HS (Niu a Xiang, 2018).

Zvýšená produkcia ROS modifikuje natívnu štruktúru makromolekúl, poškodzuje nukleové kyseliny, inhibuje aktivitu RUBISCO a ďalších enzýmov. Enzýmy taktiež dokážu byť inaktívované reaktívnymi formami dusíka (RNS) prostredníctvom nitrácie tyrozínov (Begara-Morales *et al.*, 2018). ROS navyše môžu priamo fragmentovať RUBISCO (Ishida *et al.*, 1999). Oxidačný stres znižuje množstvo fotosyntetických pigmentov (Nazar *et al.*, 2017). Nadmerná peroxidácia membránových lipidov podnecuje osmotický stres v dôsledku zvyšovania permeability membrán, kedy z bunky unikajú elektrolyty a voda (Parankusam *et al.*, 2017).

ROS napriek svojim toxickým účinkom plnia signálnu funkciu v biochemických procesoch za normálnych aj stresových podmienok. Pri ich nadprodukcii však prevláda práve toxicita (Suzuki a Mittler, 2006).

2.2 Kyselina salicylová a teplotný stres

Kyselina salicylová (SA) je derivát kyseliny bezoovej s hydroxylovou skupinou na druhom uhlíku zaraďujúci sa medzi fytohormóny. Jej bazálna hladina sa u jednotlivých

druhov rastlín líši. Je známa hlavne pre svoju nezastupiteľnú úlohu v interakcii rastlina-patogén, kedy na podnet biotických stresov ako signálna molekula sprostredkúva lokálne odpovede a systémovú získanú rezistenciu (SAR; Hartmann a Zeier, 2019). Priamo a nepriamo, ovplyvňujúc signalizáciu a syntézu iných hormónov alebo rastlinných regulátorov, sa podieľa na riadení mnohých fyziologických procesov rastlín vrátane zatvárania stomat, kvitnutia (Cleland a Tanaka, 1979), termogenézy (Raskin, 1992) a klíčenia semien (Lee *et al.*, 2010), ďalej fotosyntézy, respirácie, senescencie (Nazar *et al.*, 2017).

Je dôležitá pre odpoveď rastlín na abiotické stresy ako sú teplo (Clarke *et al.*, 2004), mráz, ťažké kovy, salinita, sucho, vodný stres, počas ktorých ovplyvňuje fotosyntézu, metabolizmus osmolytov, antioxidantnú obranu a vodný režim (Koo *et al.*, 2020), avšak molekulové mechanizmy pôsobenia SA nie sú zatiaľ detailne známe (Nazar *et al.*, 2017).

Rastliny, ktoré nedokážu akumulovať SA, nie sú schopné prežiť akútny HS. SA je nvyhnutná pre bazálnu termotoleranciu. Tie isté rastliny, ktoré sa na krátko vystavia zvýšenej teplote, dokážu prežiť nasledujúci akútny HS aj v neprítomnosti signalizácie SA, sú teda schopné dosiahnuť získanú termotoleranciu, zvýšiť svoju viabilitu na inak letány HS (Clarke *et al.*, 2004).

Hladina SA sa zvyšuje v odpovedi na HS. U teplom stresovanej *Arabidopsis* jej krátkodobý mierny nárast možno zaznamenať po 10 min. (Suzuki *et al.*, 2008), pričom k výraznej akumulácii SA dochádza v čase 1,5 h od začiatku HS a jej hladina zostáva zvýšená minimálne 7 hodiny pri kontinuálnom pôsobení HS. Hladina glykozylovanej formy SA tiež narastá v odpovedi na HS (Clarke *et al.*, 2004).

Transkripčný koaktivátor AtMBF1c je jedným z hlavných regulátorov termotolerancie u *Arabidopsis*. AtMBF1c je v signálnej kaskáde HSR nadradený SA, trehalóze a etylénu (Suzuki *et al.*, 2008).

Účinok exogénne aplikovanej SA závisí od koncentrácie (Rai *et al.*, 2019). SA spôsobuje zlepšenie odolnosti voči chorobám, zvyšuje expresiu proteínov súvisiacich s patogenézou (pathogenesis-related, PR) (Zhang *et al.*, 2010), fotosyntetickú aktivitu, elektrónový transport, množstvo chlorofylu (Khan *et al.*, 2013) aktivitu nitrátreduktázy, (Fariduddin *et al.*, 2003). SA podporuje akumuláciu osmoprotektantu prolínu, a ten zvýšenie aktivity fotosyntézy (Khan *et al.*, 2013). Rastlinné pletivá a orgány ošetrované SA akumulujú výrazne viac dusíka, fosforu, draslíka a spravidla aj mikronutrientov horčína, vápnika, medi, zinku, mangánu, bóru a železa (Tucuch-Haas *et al.*, 2017).

2.2.1 Biosyntetický aparát SA

Syntéza prekursorov SA sa u rastlín odohráva v plastidoch. Transport hlavného prekursoru, izochorizmátu, do cytosolu naprieč membránami plastidu sprostredkúva transportný proteín ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5 (EDS5) (Rekhter *et al.*, 2019).

Zatiaľ čo u baktérií na produkciu SA z kyseliny chorizmovej stačia 2 enzýmy: izochorizmátsyntáza (ICS) a izochorizmátpyruvátlyáza, u rastlín je syntéza komplexnejšia v tom, že za metabolitom, chorizmátom produkovaným ICS, dochádza k rozdeleniu biosyntézy SA do dvoch dráh. V prípade infekcie patogénom *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst) DC3000 rastlina *Arabidopsis* na svoju obranu produkuje SA, ale z celkového vytvoreného množstva SA je len 10 % syntetizovaný fenylpropanoidovým metabolizmom závislým od aktivity cytosolickej fenylalaninamoniak lyázy. Zvyšných 90% má pôvod v aktivite ICS (Wildermuth *et al.*, 2001). Neprítomnosť homológu bakteriálnej izochorizmátpyruvátlyázy u rastlín (Klessig *et al.*, 2018) nasvedčuje, že majoritné množstvo SA je produkované odlišným enzýmovým aparátom (Chen *et al.*, 2009).

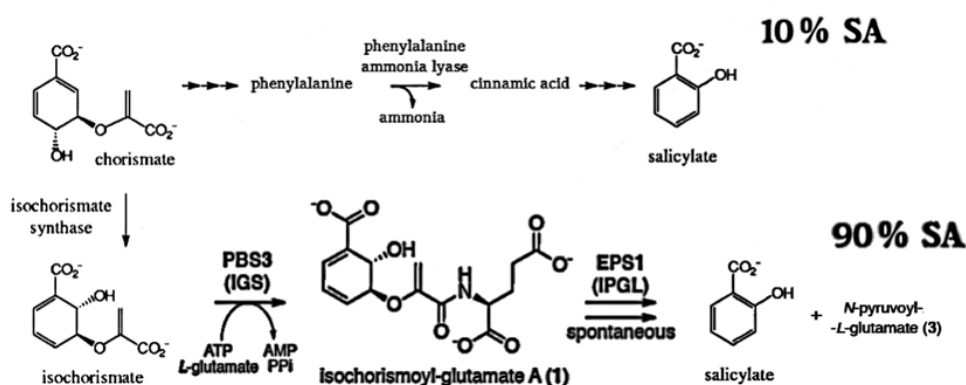
Torrens-Spence a kolektív (2019), doplnili prázdne miesta biosyntetickej dráhy SA u rastlín, tým, že priradili funkciu dvom cytosolickým proteínom, podieľajúcim sa na akumulácii SA (obr. 2). Proteín AvrPphB SUSCEPTIBLE 3 (PBS3) dôležitý pre akumuláciu SA pri útoku patogénu, patrí do rodiny GH3 acyladenyláz. Aktivita PBS3 je spätne inhibovaná SA. Druhým enzýmom je ENHANCED PSEUDOMONAS SUSCEPTIBILITY 1 (EPS1) katalyzujúci rozpad produktu PBS3 na dva koncové produkty, t.j. SA a N-pyruvoyl-L-glutamát (Torrens-Spence *et al.*, 2019).

PBS3 sa vyskytuje len u rastlín čeľade *Brassicaceae* (Weng a Noel, 2013), do ktorej spadá *Arabidopsis*, a produkuje *in vitro* a *in vivo* dva izoméry izochorizmoysl-glutamátu, pričom EPS1 vykazuje výrazne vysokú afinitu len pre jeden z nich, navyše tento izomér podlieha samovoľnému rozkladu za vzniku SA a L-pyruvoyl-L-glutamátu (Torrens-Spence *et al.*, 2019). EPS1 je proteín z rodiny BAHD acyltransferáz (Zheng *et al.*, 2009), ktorý na rozdiel od ostatných členov tejto rodiny obsahuje vo svojom aktívnom mieste dva seríny ako substituenty konzervovaných aromatických aminokyselín, Trp a His, vďaka ktorým vykazuje vyššie uvedenú aktivitu (Zheng *et al.*, 2009).

S výsledkami Torrens-Spence a kolektív (2019), súhlasí aj iná nezávislá štúdia (Rekhter *et al.*, 2019). Rekhter a kolektív (2019), do svojho experimentu nezahrnuli EPS1

a do úvahy berú hlavne samovoľný rozpad produktu PBS3 na SA a ďalej rozpad izochorizmatu na SA a pyruvát, druhá uvedená reakcia je však veľmi pomalá. Títo autori tiež uvádzajú a experimentálne potvrdili, že funkcia a kompartmentácia proteínov ICS1 (plastid), EDS5 (membránový obal plastidu) a PBS3 (cytosol), umožňuje účinný tok metabolitov do cytosolu, čo vo výsledku vedie k akumulácii SA v cytosole (Rekhter *et al.*, 2019). Proteín EPS1 sa nezdá byť koexprimovaný spolu s ďalšími proteínmi biosyntézy SA, a tak môže mať len doplnkovú funkciu. Pozorovania Torrens-Spence a kolektívu (2019) naznačujú, že počiatkové zvýšenie SA v obrannej odpovedi následne pozitívnu spätnú väzbu zvyšuje produkciu SA, pričom do tohto procesu je zapojený receptor SA, proteín NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED 1 (NPR1, vid'. kapitola 2.6). Vzťahy medzi obidvoma dráhami syntézy SA za rôznych podmienok potrebujú byť ďalej skúmané a tiež ďalšie proteíny rodiny GH3 acyladenyláz, ktoré môžu mať rovnakú aktivitu ako EPS1 (Torrens-Spence, *et al.*, 2019).

Hladiny transkriptov EPS1 sa významne zvýšili po 24 a 48 hodinách od inokulácie patogénom *P. syringae*. Súčasne je táto expresia závislá na signalizácii kyseliny jasmonovej (Zheng *et al.*, 2009).

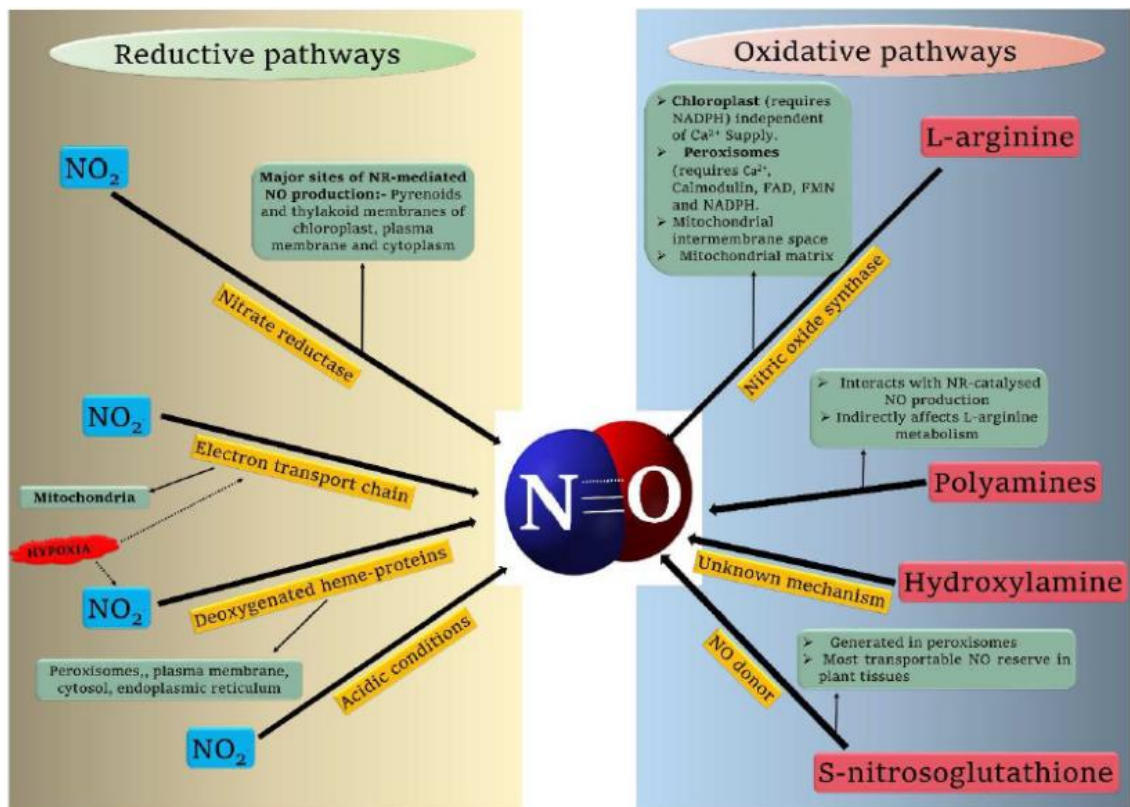


Obr. 2 Dráhy biosyntézy kyseliny salicylovej (SA) v rámci interakcie rastlina (*Arabidopsis*) – patogén (*Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst) DC3000). Majoritné množstvo, až 90 %, SA vzniká katalytickou aktivitou proteínov PBS3 (AvrPphB SUSCEPTIBLE 3), ktorý vykazuje ATP-dependenčnú a Mg^{2+} dependenčnú izochorizmoyl-glutamát syntázovú aktivitu (IGS, t.j. tvorbu amidovej väzby medzi C_9 uhlíkom izochorizmatu a alfa-amino skupinou L-glutamátu za vzniku izochorizmoyl-glutamátu). EPS1 (ENHANCED PSEUDOMONAS SUSCEPTIBILITY 1) zastáva funkciu izochorizmoyl-glutamát pyruvoyl-glutamát lyázy (IPGL), (katalyzujúcej rozpad izochorizmoyl-glutamátu na SA a L-pyruvoyl-L-glutamát). Isochorizmoyl glutamát sa spontánne rozpadá významnou rýchlosťou na SA (upravené podľa Torrens-Spence *et al.*, 2019).

2.3 Oxid dusnatý

Voľným radikálom produkovaným rastlinnými bunkami v odpovedi na HS spolu s ROS je taktiež oxid dusnatý (NO), ako bolo prvýkrát preukázané v listoch tabaku vystavených teplote 40°C (Gould *et al.*, 2003). Vysoká reaktivita je spoločnou vlastnosťou s ROS. NO plní signálnu funkciu u živočíchov, mikroorganizmov a rastlín. Považuje sa za univerzálnu signálnu molekulu, ktorá sa zúčastňuje množstva hormónmi regulovaných odpovedí v rastlinách (Li *et al.*, 2018) napr. zatvárania prieduchov, apoptózy obrany proti mikroorganizmom SAR (Li *et al.*, 2018). NO možno označiť za rastový regulátor, pretože u rastlín sa významne uplatňuje vo vývoji a raste, vrátane klíčenia semien, organogenézy koreňa, kvitnutia, senescencie, fotosyntézy (Sami *et al.*, 2018).

K produkcii NO v rastlinných bunkách vedie viacero oxidačných a redukčných procesov, niektoré sú katalyzované enzýmami, zvyšné prebiehajú nezávisle od enzýmovej katalýzy (obr. 3; Jahnová *et al.*, 2019).



Obr. 3 Procesy vedúce k tvorbe NO v rastlinných bunkách. Nitrátreduktáza (NR). Prevzaté z Sami *et al.*, 2018.

Procesy redukcie dusitanov vedúce k tvorbe NO sú zatiaľ u rastlín najlepšie preskúmané a zdá sa, že majoritný podiel NO vzniká práve týmto spôsobom (Astier *et al.*, 2018). Nitrátreduktáza je zatiaľ jediným potvrdeným enzymatickým zdrojom NO u rastlín (Rai *et al.*, 2019). Primárnou funkciou nitrátreduktázy je redukcia NO_3^- na NO_2^- , okrem toho v menšej miere dokáže premieňať dusitany na NO. Produkcia NO v rastlinách však dodnes nie je uspokojivo objasnená (Parankusam *et al.*, 2017). U živočíchov je NO syntetizovaný NO syntázou (NOS), u rastlín však nebol nájdený živočíšny homológ NOS, napriek tomu je táto enzymatická aktivita detegovaná v rastlinných pletivách (tzv. NOS-like aktivita) a inhibovaná inhibítorom živočíšnej NOS, NG-nitro-L-arginín metyl esterom (L-NAME; Jeandroz *et al.*, 2016).

NO dokáže posttranslačne modifikovať cysteínové reziduá, vo svojej podstate ide o redoxnú reakciu -SH skupiny cysteínu a molekuly NO, čím vzniká S-nitrosothiolová funkčná skupina (Stamler *et al.*, 2001).

Táto kovalentná modifikácia nazývaná S-nitrosylácia je reverzibilná a moduluje funkciu množstva proteínov. Mení konformáciu proteínov, rozpája intermolekulové disulfidové mostíky, ovplyvňuje subcelulárnu lokalizáciu, aktivity enzýmov, väzbu kofaktorov (Hu *et al.*, 2015). a zmenu expresie génov prostredníctvom modifikovania transkripčných faktorov (Hussain *et al.*, 2016). S-nitrosylácia môže svojím spôsobom brániť ireverzibilnej karbonylácii proteínov (Sami *et al.*, 2018).

Anabolizmus a katabolizmus S-nitrosothiolov nie je výhradne enzymatický proces (Sami *et al.*, 2018), na tvorbe, odstraňovaní a stabilizácii, tejto funkčnej skupiny sa podieľajú bazické a kyslé aminokyselinové reziduá nachádzajúce sa v tesnej blízkosti tejto skupiny (približne 0,8 nm) (Marino a Gladyshev, 2009).

S-nitrosylácia má svoj význam aj v odpovedi na biotické a abiotické stresy, týkajúce sa proteínov metabolických dráh (enzýmy glykolýzy, RuBisCO, fotosystémy I a II), signálnych dráhach (transkripčné faktory), cytoskeletu, transportné proteíny, antioxidantný systém (Sami *et al.*, 2018). Rôzne enzýmy zahrnuté do metabolizmu ROS a reaktívnych forime dusíka podliehajú S-nitrosylácii (Sami *et al.*, 2018).

Na modifikovanie proteínov S-nitrosyláciou je predovšetkým potrebný GSNO. Presun nitrózoskupiny medzi thiolmi proteínov a nízkomolekulových peptidov (GSNO) sa označuje trans-nitrosácia (Jahnová *et al.*, 2019). Molekuly GSNO slúžia ako donor NO, zásoba NO a dokážu byť transportované floémom rastliny (Kovacs *et al.*, 2015) Hladinu GSNO v bunkách reguluje GSNOR1 reduktáza, premenou GSNO na oxidovaný glutation

a amoniak. Katalytická aktivita GSNOR1 je inhibovaná S-nitrosyláciou, čo vedie k zníženiu premeny GSNO (Jahnová *et al.*, 2019).

Autori Frungillo a kolektív (2014) uvádzajú, že u rastlín je NO centrálnym komponentom regulujúcim dusíkovú homeostázu, a to prepojením s dráhou asimilácie dusičnanov. NO je jedným z koncových produktov dusíkového metabolizmu a sám kontroluje svoju dostupnosť modulovaním vlastnej spotreby. V princípe ide o spätno-väzbovú inhibíciu, konkrétne NO reaguje s glutationom za vzniku GSNO, následne GSNO inhibuje aktivitu GSNOR1 jej S-nitroslovaním a súčasne inhibuje dráhu asimilácie dusičnanov, pričom inhibícia tejto dráhy znamená v konečnom dôsledku zníženie akumulácie NO. GSNOR1 nepriamo ovplyvňuje množstvo biologicky aktívnych S-nitrosylovaných proteínov (Frungillo *et al.*, 2014).

Reakciami NO s ROS (hlavne superoxidový anión-radikál a H_2O_2) vznikajú reaktívne formy dusíka (RNS). RNS hrajú dôležitú úlohu v biologických procesoch, ich nadmerná tvorba má však negatívny dopad na bunky (stres), a môže viesť k apoptóze. RNS dokážu reagovať s množstvom biomolekúl, napr. DNA (nitrácia, deaminácia, nitrosácia, dvojvláknové zlomy), sacharidy (depolymerizácia reťazcov) lipidy (nitrácia, oxidácia), proteíny (nitrácia, oxidácia) (Tharmalingam *et al.*, 2017). Nitrácia tyrozínov má tak isto ako S-nitrosylácia dopad na funkciu mnohých proteínov a dochádza k nej reakciou peroxodusitanu (vzniká reagovaním NO so superoxidovým anión-radikálom) s vedľajším reťazcom tyrozínu (Barteseighi a Radi, 2018).

2.3.1 Oxid dusnatý a HS

Vplyvom HS bolo pozorované predovšetkým zvyšovanie hladín NO v rastlinách. Modulácia hladiny NO je kľúčová v odpovedi na HS, nakoľko boli zaznamenané rozmanité účinky NO na biochemické dráhy po modulácii jeho akumulácie. Výsledný efekt závisí od viacerých faktorov, dávky NO, času aplikácie, trvania HS, veku rastliny, druh rastliny a type pletiva. Tolerancia HS môže byť zlepšená donormi NO (napr. nitroprussid sodný – SNP a S-nitroso-N-acetylpenicillamín - SNAP), ktoré obmedzujú teplom spôsobené poškodenie buniek t.j. zvyšujú termotoleranciu. (Parankusam *et al.*, 2017). U *Arabidopsis* vhodne zvolená koncentrácia SNP dokáže zvýšiť termotoleranciu 6 dňových sadeníc až o 20 % (Xuan *et al.*, 2010).

Experimentálne bolo pozorované, že počas HS je NO produkovaný hlavne NOS-like aktivitou a aktivitou nitrátreduktázy, ale ďalšie zdroje nemožno vylúčiť (Parankusam *et al.*, 2017). NO počas HS je syntetizovaný najskôr v plastidoch, potom jadre a nakoniec v cytosole (Gould *et al.*, 2003). Bola pozorovaná prechodná akumulácia NO do 5 min. od

vystavia HS, druhá vlna akumulácie NO začala po 30 min. a vrcholila asi po hodine (Xuan *et al.*, 2010).

Hoci mechanizmus, ktorým NO reguluje odpovede na HS sú nejasné, dôkazy naznačujú existenciu spolupôsobenia s ROS, a to aj pri iných abiotických a biotických stresoch, pri fyziologickom raste a vývoji rastlín (Sami *et al.*, 2018). Štúdie ukazujú, že pri HS sú NO signalizácii podriadené Ca^{2+} ióny a cyklická ADP-ribóza (cADPR) (Gould *et al.*, 2003). Neznámym mechanizmom spätnej väzby je NO schopný zvyšovať intracelulárnu koncentráciu Ca^{2+} , a tým aj signalizáciu Ca^{2+} (Li *et al.*, 2018).

H_2O_2 je nadradený produkcii NO. Jedným z možných vysvetlení tohto pozorovania je nadregulácia transkripcie génov biosyntézy NO (Li *et al.*, 2018), ktoré však u rastlín nie sú známe (León a Costa-Broseta, 2019).

Exogénne aplikovaný NO a donory NO počas HS zmiernujú oxidačné poškodenie dvomi spôsobmi: obmedzovaním nadmernej produkcie ROS a udržiavaním bunkovej homeostázy (Rai *et al.*, 2019). Aplikované donory NO pôsobili protektívne minimalizovaním oxidačného poškodenia tým, že zvýšili aktivitu antioxidantných enzýmov SOD, CAT, POX počas HS (Rai *et al.*, 2019).

Wu a kolektív (2015) opísali pravdepodobný mechanizmu účinku NO v odpovedi na HS. HS indukuje oxidačný stres. Narastajúca koncentrácia H_2O_2 zvyšuje hladinu NO, a ten expresiu HSP (donory NO tiež prispievajú k akumulácii NO). HSP sú potrebné pre udržiavanie homeostázy proteómu. Akumulovaný NO následne zvyšuje aktivitu antioxidantných enzýmov, ktoré detoxikujú ROS (antioxidačné účinky). S klesajúcou koncentráciou ROS doznieva signalizácia H_2O_2 a expresia HSP (Wu *et al.*, 2015). Donory NO významne zvýšili mieru väzby HSF na DNA, čo viedlo k zvýšenej expresii a akumulácii HSP (Wang *et al.*, 2014), toto pozorovanie sčasti vysvetľuje mechanizmus pôsobenia NO v HSR a donorov NO zvyšujúcich termotoleranciu. Napriek tomu, že donory NO (SNP a SNAP) sú schopné vyvolať produkciu ROS vrátane H_2O_2 aktiváciou NADPH oxidáz (Tewari *et al.*, 2008).

U *Arabidopsis* pri HS je aktivovaný kalmodulín CaM3 a súčasne je nadregulovaná expresia príslušného génu (Xuan *et al.*, 2010). Jednou z funkcií AtCaM3 v HSR je *in vitro* a *in vivo* priamo interagovať s GSNOR, čo stimuluje aktivitu GSNOR. Tento kontrolný mechanizmus, ktorým CaM3 obmedzuje nadmernú akumuláciu NO zabraňujej poškodeniu buniek. Napriek vysokej podobnosti sekvencie kalmodulínov *Arabidopsis*, AtCaM1 a AtCaM4 pôsobia na aktivitu GSNOR opačne – obidva kalmodulíny aktivitu znižujú (Zhang *et al.*, 2020).

Aplikácia SNP zvyšuje rýchlosť čistej fotosyntézy a transpirácie počas HS (Yan *et al.*, 2011). Bolo identifikovaných veľa S-nitrosylovaných proteínov vrátane signálnych proteínov, z ktorých nasledovné súvisia s odpoveďou na HS: kalcium-dependentné proteínkinázy (CDPK2, CDPK4, CDPK26, kalmodulín), proteíny teplotného šoku (HSP70, HSP90, HSP91, HSP88, a HSP60) a enzýmy, ktoré regulujú bunkový redoxný potenciál (kataláza, askorbátperoxidáza, monodehydroascorbátreduktáza, superoxiddismutáza, glutatiónpoxidázy, glutaredoxiny, a glutatión-S-transferázy) (Hu *et al.*, 2015). Iné proteíny podstupujú nitráciu tyrozínov počas HS, napr.: Oxygen-evolving enhancer protein 2 (OEE 2), veľká a malá podjednotka RuBisCO a ďalšie (Sami *et al.*, 2018).

GSNOR1 nie je indukovaná HS (Lee *et al.*, 2008). Nemusí to však pratisť pre všetky rastliny. Aktivita GSNOR je u teplom stresovaného hrachu (*Pisum sativum* L., cv. Lincoln) v porovnaní s kontrolou vyššia (Xuan *et al.*, 2010), súčasne boli zvýšené hladiny NO, celkových SNO a proteínov s nitrovanými tyrozínmi (Jahnová *et al.*, 2019). U slnečnice (*Helianthus annuus* L. X55) bol tiež pozorované zvýšenie hladiny celkových SNO ale znížená aktivita GSNOR počas HS (Chaki *et al.*, 2011). Pri stresovaní (HS) obidvoch uvedených druhov rastlín boli dodržané totožné podmienky (čas a teplota).

2.4 Dráha odpovede na teplotný stres

Odpoveďou na narušenie homeostázy bunky a poškodenie bunkových štruktúr vplyvom HS je aktivácia adaptívneho viacstupňového procesu – odpovede na teplotný stres (heat shock response, HSR), ktorej trvanie je dočasné a ukončené po dosiahnutí ustálenia homeostázy (Balogh, *et al.*, 2013).

Na začiatku signalizačnej kaskády HSR stoja senzorové molekuly, ktoré sú aktivované zvýšením teploty. Rastliny disponujú minimálne 4 typmi senzorov schopnými iniciovať signalizáciu HSR, menovite ide o kanálíky v plazmaléme sprostredkujúce flux vápnikových iónov, histónový senzor v jadre a dva senzory proteínov s nesprávnou konformáciou prítomné v endoplazmatickom retikule a cytosole, t.j. homológy HSP (Mittler *et al.*, 2012).

2.4.1 Vápniková signalizácia

Biologické membrány, semipermeabilné rozhrania pozostávajúce z dvojvrstvy predovšetkým fosfolipidov, sú práve pre svoju štruktúrnu organizáciu najviac citlivé na zmeny v teplote. Nárast teploty sa odzrkadľuje zvýšením fluidity a permeability membrány. Membrány preto môžu slúžiť zároveň na monitorovanie teploty

a identifikovanie druhu stresu (Niu a Xiang, 2018). Na základe doterajších poznatkov sa predpokladá, že špecifické vápnikové kanáliky ako prvé a najrýchlejšie registrujú čo i len mierne zvýšenie teploty, resp. zvýšenie fluidity membrány, pričom následne indukujú krátkodobý influx Ca^{2+} z apoplastu do cytosolu, a týmto spôsobom aktivujú rastlinnú HSR. HS spôsobuje signifikantný nárast cytosolického vápnika v listoch aj koreni rastlín, pričom v epiderme listov pšenice k nemu dochádza 90 sekúnd od vystavenia 37°C (Liu *et al.*, 2003), a u 10 dňových sadeníc *Arabidopsis* 60 sekúnd od vystavenia 45°C (Liao *et al.*, 2017).

Influx Ca^{2+} je sprostredkovaný vrátkovými kanálikmi (cyclic nucleotide gated channels, CNGC) u *Arabidopsis* a *Physcomitrella patens* (Finka *et al.*, 2012). Genóm *Arabidopsis* obsahuje 20 putatívnych členov rodiny CNGC (Talke *et al.*, 2003), z ktorých práve CNGC6 sa uplatňuje v HSR (Gao *et al.*, 2012). Stimulom pre jeho aktiváciu je zvýšenie membránovej fluidity (Saidi *et al.*, 2009). CNGC6 je exprimovaný vo všetkých orgánoch *Arabidopsis* (Gao *et al.*, 2012) a experimentálne bolo zistené, že CNGC6 je aktivované cAMP. Zvýšenie fluidity plazmalémy tedy zrejme primárne aktivuje nejakú membránovú nukleotidcyklázu, ktorá katalyzuje vznik cAMP, ktorý následne aktivuje CNGC6 (Ohama *et al.*, 2017).

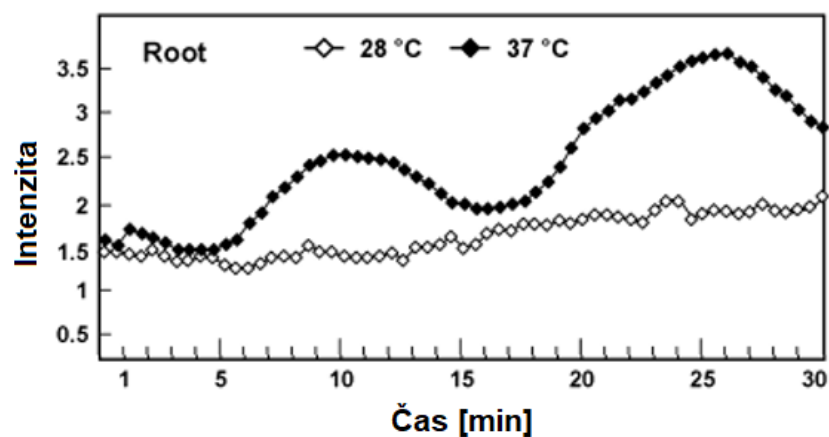
Finka a kolektív (2012) ukázali, že pravdepodobne existuje viacero termosenzorov, z ktorých každý má rozdielny prah aktivácie teplom a že pri rôznych teplotách sú aktivované minimálne tri rôzne iónové kanáliky. Genóm *Arabidopsis* obsahuje spolu viac ako 40 putatívnych vápnikových kanálikov, ktoré súčasne môžu slúžiť ako potenciálne senzory teploty (Niu a Xiang, 2018). Ďalším kanálikom je annexin1 (ANN1), ktorý sa podieľa na udržiavaní vysokej koncentrácie Ca^{2+} v cytosole, potrebnej pre stimulovanie podriadených signálov pri HS. Je aktivovaný neskôr ako CNGC6 (Li *et al.*, 2018). Z pozorovaní vyplýva, že vápnikové kanáliky v plazmaléme môžu byť striedavo otvárané a zatvárané v procese termotolerancie (Niu a Xiang, 2018).

Medzi skoré udalosti vyvolané HS patrí aj aktivácia fosfoinozitolovej signálnej dráhy. Zvýšenie membránovej fluidity počas HS pravdepodobne aktivuje okrem iónových kanálikov aj fosfolipázy a kinázy. U ryže a *Arabidopsis* boli v plazmaléme identifikované fosfolipáza D (PLD) and fosfatidylinozitol-4-fosfát-5-kináza (PIP2K). Aktivácia týchto enzýmov sa prejavuje rýchlou akumuláciou kyseliny fosfatidovej (PA) a fosfatidylinozitol-bisfosfátu (PIP₂) do 2 min. (Mishkind *et al.*, 2009).

HS aktivuje fosfolipázy C (PLC), najskôr AtPLC9, ktorá sa tiež podieľa na zvyšovaní Ca^{2+} v cytosole (Gao *et al.*, 2012) a dodatočne pri dlhšie trvajúcim HS aj AtPLC3 (Gao

et al., 2014). AtPLC3 sa nachádza v plazmaléme a jadre, zatiaľ čo AtPLC9 iba v plazmaléme (Ren *et al.*, 2017). Koncentrácia Ca^{2+} v cytosole je pri HS zvyšovaná taktiež fluxom Ca^{2+} z vnútorných zásob, ktorý je spôsobený nárastom cytosolického inositol-1,4,5-trifosfátu (IP_3). Nárast IP_3 dosahuje maximum po 2,5 min od začiatku pôsobenia HS (Zheng *et al.*, 2012). IP_3 vzniká spolu s diacylglycerolom, ktorý zostáva v membráne, hydrolýzou jednej molekuly PIP_2 , ktorú katalyzujú aktivované PLC. IP_3 môže byť následne fosforylovaný na IP_6 , pričom obe tieto zlúčeniny zvyšujú hladinu Ca^{2+} jeho mobilizáciou z intracelulárnych zásob (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2003), a to napriek tomu, že žiadne vápnikové kanáliky, s ktorými by ako ligandy interagovali IP_3 a IP_6 neboli u rastlín doposiaľ objavené (Li *et al.*, 2018).

HS a iné abiotické stresy spôsobujú prechodný nárast cytosolického vápnika s charakteristickým priebehom v čase, ktorý sa môže opakovať, pričom frekvencia a úroveň akumulácie vápnika závisia od konkrétneho stimulu. Tento koordinovaný influx a eflux Ca^{2+} sa označuje ako tzv. vápnikový profil (calcium signature) (obr. 4), ktorý sa svojim priebehom môže líšiť v jednotlivých orgánoch rastliny (Wu *et al.*, 2012).



Obr. 4 Vápnikový profil cytosolu koreňových buniek ryže *Oryza sativa* L.. Záznam dynamiky cytosolickej koncentrácie Ca^{2+} koreňových buniek ryže u kontroly (28°C) a po vystavení teplotnému stresu 37°C (upravené podľa Wu *et al.*, 2012).

2.4.2 Konvertory vápnikovej signalizácie

Signál Ca^{2+} je ďalej prenášaný vápnik viažucimi proteínmi, t.j. kalmodulínom (CaM), kalcium dependentnými proteínkinázami (CDPK) a NADPH-oxidázami (RBOH, respiratory burst oxidase homolog), ktoré sú aktivované naviazaním Ca^{2+} iónov čo im dovoľuje ďalej regulovať veľa podriadených bunkových procesov (Bergey *et al.*, 2014). Kalmodulin AtCaM3 u *Arabidopsis* je jedným z esenciálnych článkov v signalizačnej kaskády HS (Zhang *et al.*, 2009), schopným aktivovať transkripčné faktory napr. heat shock faktor A1a (HSFA1a), čo vykonáva prostredníctvom aktivácie calcium/calmodulin-binding protein kinase 3 (AtCBK3, tiež známej ako CDPK-related protein kinase 1) (Mittler *et al.*, 2012). AtCBK3 fosforyluje HSFA1a *in vitro* (Liu *et al.*, 2008), avšak nie je známe či HSFA1a je fosforylovaný taktiež *in vivo* (Ohama *et al.*, 2017). AtCaM3 je primárne zahrnutý v aktivácii aj ďalších transkripčných faktorov MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR 1c (MBF1c), WRKY DNA-BINDING DOMAIN SUPERFAMILY PROTEIN (WRKY39) a DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN (DREB) (Niu a Xiang, 2018). Ca^{2+} a CaM inhibujú aktivitu GSNOR, čo v bunke spôsobuje akumuláciu NO zvyšujúcu termotoleranciu rastliny (Xuan *et al.*, 2010).

Proteíny z rodiny CDPK po naviazaní Ca^{2+} aktivujú svoju kinázovú doménu spúšťajúc fosforylačnú kaskádu, ktorej súčasťou sú pravdepodobne aj mitogenom aktivované proteínkinázy (MAPK) (Sangwan *et al.*, 2002).

RBOH, transmembránové proteíny v plazmaléme s NADPH oxidázovou aktivitou, produkujú superoxidové aniónradikály do apoplastu v odpovedi na abiotické a biotické stresové stimuly (Suzuki *et al.*, 2011a). RBOH je aktivovaný naviazaním Ca^{2+} iónov motívmi EF-ruky (EF-hand) na strane cytosolu, RBOHs sú následne schopné oxidovať cytosolický NADH a elektrón získaný týmto dejom prechádza redoxnými centrami v membránovej doméne RBOH až na stranu apoplastu, kde reaguje s molekulou kyslíku za vzniku superoxidového anión-radikálu (Kadota *et al.*, 2015). Aktivita RBOH je priamo regulovaná koncentráciou Ca^{2+} v cytosole (Ogasawara *et al.*, 2008). Okrem toho ju fosforylovaním dokážu aktivovať aj CDPK a CBL INTERACTING PROTEIN KINASE 26 (CIPK26) (Drerup *et al.*, 2013), čo však nebolo zisťované v rámci odpovede na teplotný stres (Li *et al.*, 2018). Aktivita RBOH je regulovaná S-nitrosyláciou. Táto posttranslačná modifikácia inhibuje aktivitu AtRBOHD (Yun *et al.*, 2011)

2.4.3 Reaktívne formy kyslíka (ROS)

Rovnováha medzi produkciou a odstraňovaním ROS je dôležitá pre prežitie organizmov a jej zmeny vedú ke zmenám hladiny ROS a predstavujú tak formu signalizácie. Počas HS rastlinné bunky produkujú zvýšené množstvo ROS. V protoplastoch *Arabidopsis* vplyvom teploty 42°C po dobu 45 sekúnd dochádza k signifikantnej akumulácii ROS, ktorá vrcholí po 3 minútach a následne 10 min. postupne klesá na základnú hladinu. ROS spolu s vápnikom sú teda súčasťou skorej fázy HSR (Li *et al.*, 2018).

HS indukované ROS majú pôvod hlavne v chloroplaste, mitochondriách, peroxizómoch a plazmaléme (Choudhury *et al.*, 2017). Vápnikom aktivované RBOHD produkujú superoxidový anión-radikál, ktorý je premieňaný superoxididizmutázou (SOD) na H₂O₂ schopný prechádzať cez akvaporíny (Bienert *et al.*, 2007), do vnútra bunky, kde regulujú bunkové odpovede na teplo. H₂O₂ je považovaný za jedného z kľúčových druhých poslov, k jeho akumulácii dochádza pár min. od vystavenia HS (Niu a Xiang, 2018). H₂O₂ môže aktivovať špecifické MAPK, *Arabidopsis* NPK1-LIKE proteín kinázu (ANP1), ktorá iniciuje fosforylačnú kaskádu, aktivujúcu podradené kinázy MAPK3 a MAPK6, ktoré počas HS fosforylujú HSFA2 (Evrard *et al.*, 2013) a HSFA4a (Pérez-Salamó *et al.*, 2014), čo podmieňuje aktiváciu a presun oboch týchto faktorov do jadra HSFA2 do jadra. HS aktivuje tiež MAPK4, ktorá fosforyluje HSFA4a (Andrási *et al.*, 2019).

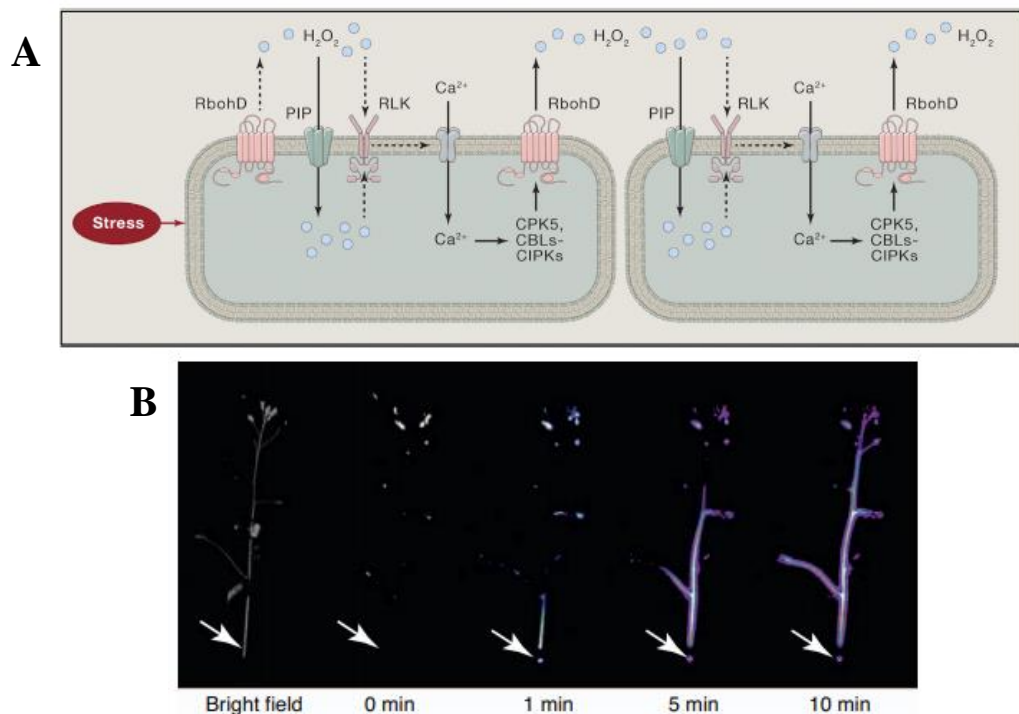
Zvýšená hladina ROS v apoplaste môže tiež indukovať akumuláciu intracelulárneho Ca²⁺, pravdepodobne prostredníctvom Ca²⁺ kanáliku ANN1 (Liao *et al.*, 2017). Hoci vysoké hladiny ROS sú škodlivé pre bunky, nižšie hladiny ROS, plnia dôležitú úlohu v bunkovej signalizácii, v rámci regulácie získanej termotolerancie je to predovšetkým H₂O₂ (Volkov *et al.*, 2006). Predpokladá sa, že niektoré heat shock transkripčné faktory u rastlín môžu byť priamo aktivované H₂O₂ (Miller a Mittler, 2006).

2.4.3.1 Súhra ROS a Ca²⁺ signálov v podobe vln

Mnohé abiotické stresy ako sucho, salinita, chlad, teplo a vysoké ožiarenie pôsobiace lokálne vyvolávajú systémové odpovede prostredníctvom elektrických a hydraulických signálov schopných šíriť sa z bunky na bunku do vzdialených pletív. Obdobný jav dokáže sprostredkovať striedavá produkcia ROS sprevádzaná fluxom Ca²⁺ iónov (Miller *et al.*, 2009). Signalizácia prostredníctvom takýchto Ca²⁺ a ROS vln sa šíri pletivami postupne do celej rastliny (obr. 5A) (Gilroy *et al.*, 2016), kde spúšťa systémové odpovede na abiotický stres (Miller *et al.*, 2009).

Pre propagáciu ROS vln je potrebná RBOHD izoforma, ktorá je fosforylovaná CDPK5 (CPK5), prípadne inými CDPK, ktoré môžu byť aktivované ROS (Dubiella *et al.*, 2013) a ešte SOD, ktorá dismutuje superoxidový anión-radikál na H₂O₂ (Miller *et al.*, 2009).

HS a ďalšie abiotické stresy (salinita, intenzívne svetlo, mechanické poranenie) vyvolávajú flux Ca²⁺ do cytosolu rastlinných buniek, ktorý aktivuje RBOH (Choudhury *et al.*, 2017). Aktivované RBOHs stresovaných buniek generujú ROS do apoplastu, tento signál je vnímaný okolitými aj nestresovanými bunkami, v ktorých sa spúšťa flux vápnika podmieňujúci aktiváciu RBOHD. Novoaktivované RBOHD produkujú ROS do apoplastu, čím spúšťajú nový cyklus vzájomnej aktivácie vápnikových kanálikov a RBOHD v ďalších susediacich bunkách (obr. 5B) (Miller *et al.*, 2009).



Obr. 5 Propagácia Ca²⁺ a ROS vln v rastlinných pletivách spustená abiotickými stresmi. A) Schéma propagácie Ca²⁺ a ROS vln u rastlín stresovaných teplotným stresom, NADPH-oxidáza (RbohD), akvaporín (PIP), receptor-like kináza (RLK), kalcium dependentná proteínkináza 5 (CPK5). A vápnik viažuce proteíny (CBLs) s kalcium dependentnými proteínkinázami (CIPKs) potenciálne zahrnutými do propagácie vln (prevzaté zo Zhu, 2016). B) Záznam bioluminescencie luciferinu odrážajúcej produkciu ROS a systémové šírenie ROS pletivami *Arabidopsis* (prvý obrázok – nadzemná časť rastliny vo svetelnom poli; prevzaté z Mittler *et al.*, 2011).

Počas HS dochádza rovnako k šíreniu elektrických signálov do vzdialených pletív, napr. z listu do koreňa *Arabidopsis* je potrebná izoforma RBOHD, ktorá pravdepodobne akumuláciou ROS na vonkajšej strane plazmalémy môže vyvolať depolarizáciu membrány, a tak tvorbu a šírenie elektrických signálov (Suzuki *et al.*, 2013).

Stresom spustené Ca^{2+} a ROS vlny sa môžu pohybovať rýchlosťou prevyšujúcou 1 mm/s (Choi *et al.*, 2014), limitne až 8,4 cm/min u *Arabidopsis* (Miller *et al.*, 2009). Tieto vlny spôsobujú transkripčné odpovede vo vzdialených pletivách, napr. vrátane indukcie MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR 1c (MBF1c), potrebné pre prispôsobenie sa HS (Suzuki *et al.*, 2013). Elektrické signály sú rýchle, pravdepodobne slúžia ako všeobecné stresové signály predchádzajúce tým chemickým (napr. fytohormóny a iné signálne molekuly schopné transportu rastlinou), lebo zrejme neobsahujú priveľa informácií o špecifickom podnete, ktorý ich vyvolal (Miller *et al.*, 2009).

2.5 Prepojenie signálnych dráh SA a NO pri teplotnom strese

HS zvyšuje hladinu voľného Ca^{2+} aj vplyvom signalizácie NO (Gould *et al.*, 2003). Kalmodulín reguluje mieru transkripcie izochorizmásyntázy počas HS interakciami s DNA viazucimi proteínmi, zahŕňajúc transkripčné faktory CALMODULIN BINDING PROTEIN 60-like g (CBP60g) a jeho homológ SAR Deficient 1 (SARD1) (Gilroy *et al.*, 2016), ktoré sa viažu na promotory regulátorov rastlinnej imunity (Sun *et al.*, 2015), promotor izochorizmásyntázy 1 a nadregulujú ich expresiu, čím zvyšujú produkciu SA reguláciou na transkripčnej úrovni (Gilroy *et al.*, 2016). Ďalším príkladom je transkripčný faktor CALMODULIN-BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR 3/SIGNAL RESPONSIVE GENE 1 (CMTA3/SR1), ktorý sprostredkúva aktiváciu transkripcie kanálikov chloroplastovej membrány EDS1 a jeho homológov EDS4 a EDS5 (Kohli *et al.*, 2017). EDS5 je kanál v membráne plastidov sprostredkujúci transport prekursoru SA do cytosolu (Rekhter *et al.*, 2019).

Genetické štúdie vykonané Xuan a kolektív (2010) ukázali, že NO počas HS zvyšuje transkripciu AtCaM3 a indukuje termotoleranciu prostredníctvom aktivácie AtCaM3, ktorá je podradená signalizačnej funkcii NO.

2.6 Receptory SA

Receptorom SA je NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1), ktorý ako kľúčový transkripčný regulátor podľa štúdie Ding a kolektív (2018)

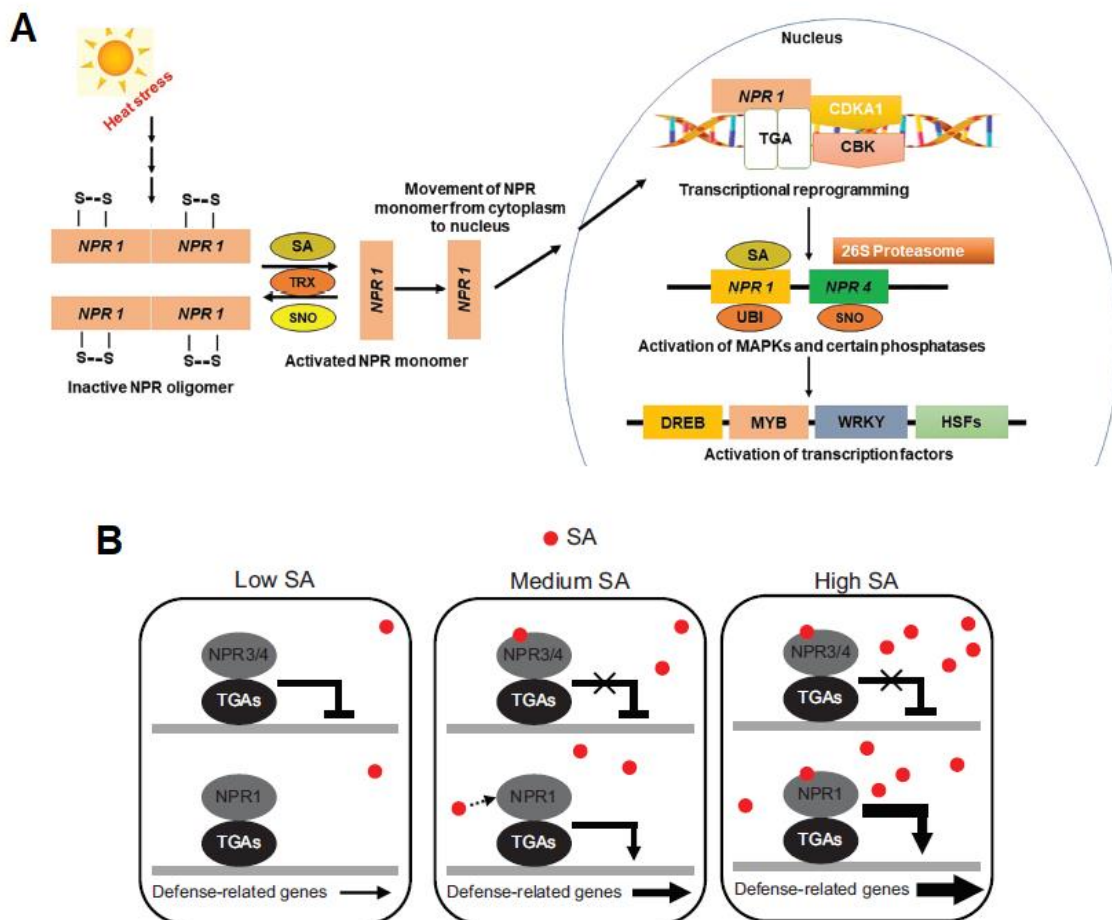
zabezpečuje indukciu expresie 1107 obranných génov *Arabidopsis* vrátane esenciálnych imunitných regulátorov.

Väzba SA na NPR1 je Cu^{2+} dependentná, ióny Cu^{2+} interagujú s Cys521 a Cys529, čo vedie ku konformačnej zmene NPR1, kedy sa odpojí C-terminálna - transaktivačná doména od autoinhibičnej N-terminálnej domény, skrátene označovanej BTB/POZ doména (broad complex, Tramtrack and Bric-a-bric/Poxvirus and Zinc finger domain) (Wu *et al.*, 2012). Následne je NPR1 fosforylovaný, aby mohol prejsť do jadra, kde interaguje s transkripčným faktorom TGACGTCA CIS-ELEMENT-BINDING PROTEIN (TGA). (Ding *et al.*, 2018). Pre túto interakciu, regulujúcu génovú expresiu, je nevyhnutné, aby bol NPR1 vo forme monomérov. NPR1 tvorí v cytosole za normálnych podmienok oligomér. Jeho podjednotky sú kovalentne stabilizované disulfidovými väzbami medzi Cys82 a Cys216 (Mou *et al.*, 2003).

Samotná SA nie je schopná priamej monomerizácie NPR1 (Wu *et al.*, 2012). Tento dej je sprostredkovaný redoxnými udalosťami v bunke, ktoré súvisia s potlačením odpovedí kyseliny jasmonovej, čo sprostredkúva práve SA (Maruri-López *et al.*, 2019). Napriek tomu, že mechanizmus nie je presne známy, pre redukciu disulfidových väzieb sú potrebné thioredoxíny TRX-h3 a TRX-h5 (Tada *et al.*, 2008). Opačný proces, t.j. oligomerizáciu vyvoláva S-nitrosylácia Cys156, pričom donorom NO je GSNO (obr. 6; Tada *et al.*, 2008).

Arabidopsis obsahuje paralógy NPR1, konkrétne NPR2, NPR3 a NPR4, ktoré taktiež fungujú ako receptory SA viažuce súčasne TGA, ktoré plnia svoju funkciu v bunkovom jadre (Ding *et al.*, 2018). Ding a kolektív (2018), demonštrovali, že NPR3 a NPR4 majú opačnú funkciu ako NPR1. Účinok NPR proteínov závisí od koncentrácie SA. V prípade nízkych hladín SA proteíny NPR3 a NPR4 reprimujú génovú expresiu obranných génov (napr. SARD1 a transkripčných faktorov WRKY70, čím sa predchádza negatívnemu dopadu na rastlinné imunitné odpovede (Ding *et al.*, 2018).

Zvýšené a vysoké hladiny SA inhibujú funkciu transkripčných korepresorov, NPR3 a NPR4, a naopak aktivujú transkripčný koaktivátor NPR1, takže vo výsledku dochádza k aktívnej expresii inak umlčaných génov, SA v princípe vystupuje ako induktor génov podriadených NPR1 (obr. 6) (Ding *et al.*, 2018).



Obr. 6 Regulácia transkripčnej aktivity NPR1/3/4 vplyvom SA a NO. A) Posttranslačné modifikácie NPR1 sprostredkované signalizáciou SA a NO. Stručné znázornenie expresie podriadených génov NPR1 (prevzaté z Rai *et al.*, 2019). B) Vplyv koncentrácie SA na expresiu génov. Pri nízkej koncentrácii SA regulátory NPR3 a NPR4 reprimujú expresiu. Vysoká koncentrácia SA indukuje expresiu prostredníctvom NPR1 (prevzaté z podľa Ding *et al.*, 2018).

Transkripcia týchto génov je dodatočne regulovaná ubikvitináciou. Cullin-RING Ligase 3 (CLR3) pripojením menšieho množstva ubikvitínov na NPR1 maximalizuje intenzitu transkripce, v porovnaní s tým polyubikvitinácia pôsobením E4 ligázy UBE4 podporuje jeho proteazómovú degradáciu. Naproti tomu tzv. proteazómom asociované deubikvitinázy UBP6 a UBP7 vykazujú opačnú funkciu než UBE4, ktorou obmedzujú degradáciu NPR1 (Skelly *et al.*, 2019). Pre aktiváciu NPR1 je tiež dôležitá jeho sumoylácia (Saleh *et al.*, 2015).

2.7 Proteíny teplotného šoku

Proteíny teplotného šoku (heat shock proteins, HSP), boli objavené v spojitosti s HS, kedy sú rýchlo a účinne akumulované v prokaryotických a eukaryotických bunkách rôznych typov organizmov. Pod toto označenie spadá rada evolučne konzervovaných

proteínov s cytoprotektívnymi účinkami, ktoré chránia bunky udržiavaním proteínovej homeostázy počas HS. Proteíny sú dlhé reťazce aminokyselín, ktoré pre správnu funkciu musia v priestore zaujať určitú sekundárnu, terciárnu, prípadne kvartérnu štruktúru, t. j. natívny stav. Vysoká teplota narúša priestorovú skladbu proteínov, denaturuje ich, a proteíny v tomto stave majú škodlivý vplyv na bunky. Udržiavanie homeostázy proteómu, proteostázy, zahŕňa kontrolu a riadenie biosyntézy, degradácie, správneho skladania, translokácie a pod. v prostredí bunky plnom veľkého množstva rôznych proteínov (Chen *et al.*, 2018).

V živých bunkách za fyziologických podmienok ATP-dependentné HSP môžu tvoriť 3 až 5% celkového množstva proteínov a pri HS toto číslo narastá (Goloubinoff *et al.*, 2018).

Hlavnými a konzervovanými regulátormi HSR sú transkripčné faktory tzv. heat shock faktory (HSF), ktoré ako terminálne zložky signálnej kaskády HSR priamo zabezpečujú zvýšenú expresiu HSP a ďalších HSF responzívnych génov. HSF sa uplatňujú v rámci odpovede na akumuláciu cytosolických nesprávne zbalených proteínov, hovoríme o tzv. cytoplazmatickej proteínovej odpovedi (CPR; Lin *et al.*, 2018).

HSP nie sú indukované výhradne HS, ale aj inými abiotickými a biotickými stressormi, napr. patogénmi (Tuang *et al.*, 2019), vplyvom ťažkých kovov, UV, aj chladovým stresom (Park a Seo, 2015). Okrem toho HSP sú konštitutívne prítomné v nízkych koncentráciách nie len v cytosole ale aj v ďalších bunkových kompartmentoch: mitochondriách, plastidoch, endoplazmatickom retikule a jadre (Park a Seo, 2015), nakoľko sú nevyhnutné pre životaschopnosť a normálne bunkové deje, pretože udržiavajú homeostázu proteómu (Qu *et al.*, 2013). Niektoré HSP sú produkované výhradne v určitých vývojových štádiách (Tian *et al.*, 2012), napr. cytosolárny HSP100, ktorý je inak indukovaný HS (Lee *et al.*, 2007).

2.7.1 Funkcia HSP

Široké spektrum funkcií HSP bolo dosiahnuté v priebehu evolúcie amplifikáciou a diverzifikáciou HSP. Rôzne HSP môžu kooperovať s kochaperónmi (proteíny potrebné pre funkciu HSP) aj medzi sebou navzájom, čím sa expanduje repertoár funkcií HSP (Mayer a Bukau, 2005). Za fyziologických podmienok plnia viacero nezastupiteľných funkcií v udržiavaní funkčného proteómu. Ako tzv. chaperony zabezpečujú správne skladanie denaturovaných proteínov aj nascentných polypeptidových reťazcov. Ďalej sprostredkovávajú translokáciu organelových a sekrečných proteínov naprieč

membránami, kedy dočasne udržiavajú proteín v nezloženom alebo čiastočne zloženom stave, zabraňujú agregovaniu a solubilizujú proteínové agregáty, sprostredkujú nekovalentné spájanie a disociáciu proteínových podjednotiek oligomérov, podieľajú sa všeobecne na degradácii proteínov (Santoro, 2000). Proteíny určené na odstránenie sú degradované ubiquitin-proteazómovým systémom alebo autofágiou (Amm *et al.*, 2014). Ma a kolektív (2019), demonštrovali, že malý mitochondriálny GhHSP24.7 fyziologicky aktivuje klíčenie semien pri dosiahnutí priaznivej teploty prostredia.

HSP v skutočnosť neobsahujú informáciu o správnom skladaní ale skôr zabraňujú neproduktívnym interakciám (Sekhar *et al.*, 2018). Rozpoznanie substrátu je esenciálne pre biologickú funkciu HSP. Rozpoznanie sa uskutočňuje interakciami s hydrofóbnymi oblasťami nezložených, čiastočne denaturovaných a nesprávne zbalených (misfolded) proteínov a obnovujú ich funkčnú konformáciu v závislosti od energie ATP (Bukau a Horwich, 1998).

HSP, ktorým sa pripisuje iba tvorba natívnej konformácie sa označujú ako chaperoniny. Chaperoniny sú triedou chaperonov, a preto sa môžu zovšeobecnene nazývať chaperony. Najčastejšie sa chaperoninmi označujú HSP60 (Slavotinek a Biesecker, 2001). Hlavnými ATP dependentnými molekulovými chaperonmi buniek sú práve chaperoniny a systém chaperónov HSP70 (Feldman a Frydman, 2000).

HSP počas HS zabraňujú misfoldingu proteínov, obnovujú ich správnu konformáciu, čím obmedzujú tvorbu agregátov, zabezpečujú ich solubilizáciu a pomáhajú stabilizovať membrány (Chen *et al.*, 2018), pomáhajú chrániť DNA pred fragmentáciou a degradáciou (Cho a Choi, 2009).

2.7.2 Odpovede na úrovni konformácie proteínov

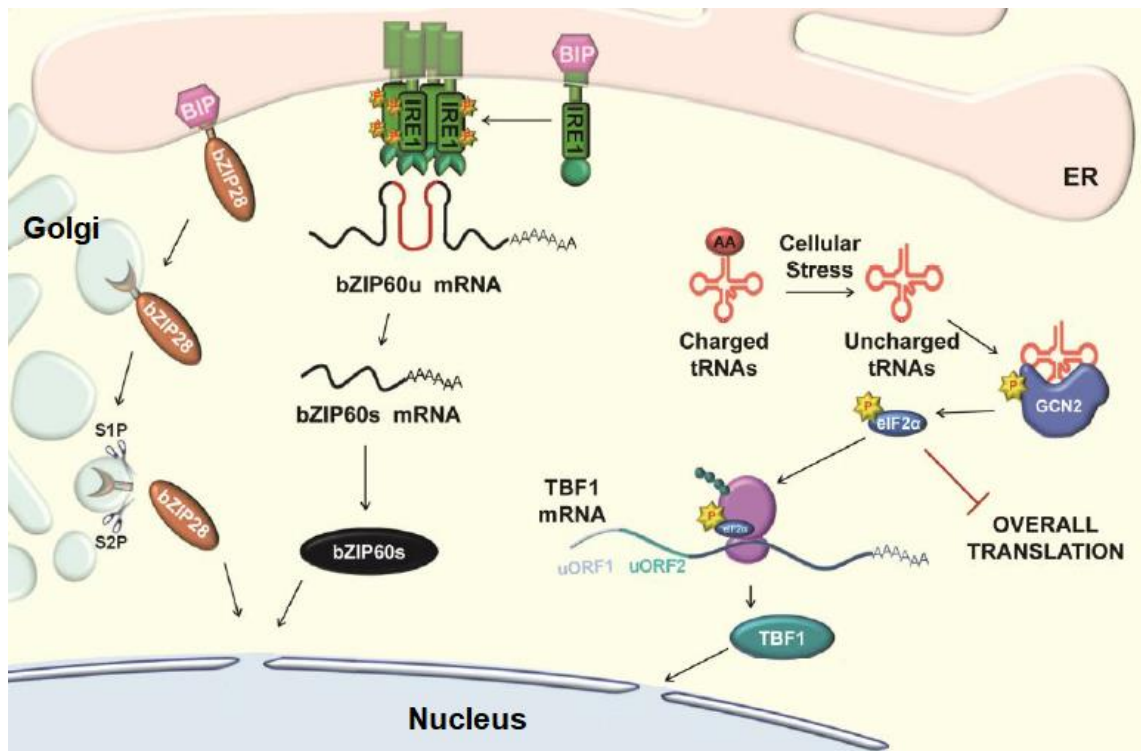
Vysoká teplota negatívne ovplyvňuje konformáciu, priestorovú skladbu proteínov, zapríčiňuje ich nesprávne skladanie, denaturáciu a agregáciu. Takéto proteíny neplnia správne svoju funkciu a pre bunky sú toxické. Proteíny s nesprávnou konformáciou aktivujú v cytosole tzv. cytoplazmatickú proteínovú odpoveď (cytoplasmatic protein response, CPR) a analogický proces v endoplazmatickom retikule (ER), tzv. odpoveď na nesprávnou konformáciu proteínov (unfolded protein response, UPR). Oba tieto procesy stimulujú expresiu hlavne HSP70 a HSP90, ktoré sprostredkujú správne skladanie proteínov a udržiavanie ich konformačnej integrity (Sugio *et al.*, 2009).

Napriek zhode v mechanizme spúšťajúcom obidve odpovede, t.j. inducibilite denaturovanými proteínmi, CPR aj UPR sa mechanizmami aktivácie podriadených

transkripčných regulátorov modifikujúcich génovú expresiu značne líšia. CPR aktivuje génovú expresiu HSP prostredníctvom HSF, zatiaľ čo u eukaryot UPR je sprostredkovaná tromi dráhami (UPR arms) vďaka trom transkripčným faktorom typu bázičkej leucínovej zip (basic leucine zipper, bZIP; Sugio *et al.*, 2009).

Priestorová a funkčná diferenciácia UPR a CPR umožňuje precíznu reguláciu expície podriadených génov, pretože vznik nesprávne zbalených proteínov je bežný jav pre ER, nakoľko v danom kompartmente neustále prebiehajú tvorba, maturácia a posttranslačné modifikovanie proteínov (Li *et al.*, 2017). Viac ako tretina všetkých proteínov prejde sekrečnou dráhou ER (Niu a Xiang, 2018). Uvedené procesy sa odohrávajú fyziologicky v rôznej intenzite v závislosti na stave bunky. Vysoká teplota má rovnako negatívny dopad na proteíny v cytosole aj endoplazmatickom retikule. Produkcia a akumulácia nesprávne poskladaných a neposkladaných proteínov sa označuje ako ER stres (Afrin *et al.*, 2020). Ak nastane situácia, kedy je homeostáza ER trvale narušená, zahájí sa programovaná bunková smrť (Niu a Xiang, 2018).

U rastlín sú dobre preskúmané dve signálne dráhy (obr. 7), ktoré sa aktivujú ER stresom. Na začiatku prvej dráhy UPR vystupuje integrálny proteín membrány ER tzv. inositol-requiring enzyme-1 (IRE1), ktorý svojou senzоровou doménou orientovanou do lúmenu ER rozpoznáva nesprávne zbalené proteíny. Po interakcii s takýmto proteínom sa aktivuje RNázová doména IRE1 na cytosolickej strane ER membrány (Korennykh a Walter, 2012), ktorá odstraňuje segment 32bp z mRNA kódujúcej membránovo kotvený transkripčný faktor bZIP60. Upravená mRNA bZIP60 podstupuje transláciu, s tým že výsledný proteínový produkt neobsahuje transmembránovú doménu, vďaka čomu je translokovaný do jadra, kde aktivuje expresiu génov (Deng *et al.*, 2011).



Obr. 7 Tri signálne dráhy odpovede na nesprávnu konformáciu proteínov (UPR) u rastlín. Prvá dráha začína aktiváciou (oligomerizácia a autofosforylácia – označ. hviezdikami) inositol-requiring enzyme-1 (IRE1). Nezostrihaná mRNA kódujúca transkripčný faktor typu bázičný leucínový zip (bZIP60u, zostrihaná bZIP60s), imunoglobulin binding protein 3 (BiP), SITE-1 a SITE-2 proteázy (S1P a S2P), kináza General Control Non-repressible 2 (GCN2), eukaryotický iniciačný faktor 2 α (eIF2 α), transkripčný faktor (TL1-binding factor, TBF1) (upravené podľa Afrin *et al.*, 2020).

V prípade druhej dráhy UPR sa zle zložené proteíny v lúmene ER viažu s homológom HSP70 tzv. imunoglobulin binding proteínom 3 (BiP3). BiP3 je týmto vytesnený z väzby na transkripčné faktory bZIP17 a bZIP28, ktoré sú asociované s membránou ER prostredníctvom svojich transmembránových domén. Tieto transkripčné faktory po disociácii BiP3 sa transportujú do Golgiho komplexu, kde sú posttranslačne modifikované t.j. proteolyticky štiepené proteázam SITE-1 (S1P) a SITE-2 (S2P), ktoré odštiepia transkripčné aktivačné domény týchto faktorov. Uvoľnené transkripčné aktivačné domény vstupujú do jadra, kde regulujú expresiu génov (Liu *et al.*, 2008). Napriek tomu, že u *Arabidopsis* existuje živočíšny homológ S1P aktivačný mechanizmus využíva inú zatiaľ bližšie neidentifikovanú proteázu, eventuálne proteázy (Iwata *et al.*, 2017).

U cicavcov vrámci tretej signálnej dráhy UPR (obr. 7) dochádza k fosforylácii eukaryotického iniciačného faktoru 2 α (eIF2 α) prostredníctvom štyroch kináz, jednou z nich je General Control Non-repressible 2 (GCN2) (Jiang *et al.*, 2006). Genóm *Arabidopsis* obsahuje jediný GCN2, ktorý je aktivovaný vplyvom viacerých biotických

a abiotických stresov (Afrin *et al.*, 2020). Jedho funkciou je inhibícia translácie (Krishnamoorthy *et al.*, 2001). U rastlín je mechanizmus aktivácie GCN2 neznámy. Doteraz nebol objavený homológ cicavčieho senzoru nesprávne zbalených proteínov (PERK), ktorý je nadradený GCN2. Alternatívny mechanizmus aktivácie GCN2 spočíva v akumulácii nenabitých tRNA a ich interakcii s GCN2 (Afrin *et al.*, 2020).

HS aktivuje bZIP60 prostredníctvom IRE1 (Deng *et al.*, 2011) a taktiež bZIP28 (Gao *et al.*, 2008). Nagashima a kolektív (2011) zistili, že u *Arabidopsis* za normálnych podmienok exogénne aplikovaná SA (0,5mM) indukuje gény UPR.

2.7.3 Zmeny génovej expresie počas teplotného stresu

V priebehu HS môžeme rozlíšiť tri fázy. V prvej fáze je preprogramovaná génová expresia, blokuje sa expresia prevádzkových génov. Počas druhej fázy sa akumulujú chaperony a iné ochranné proteíny. Tretia fáza zahŕňa zmeny spojené s návratom do normálneho stavu a obnovou expresie prevádzkových génov, ktoré smerujú k pokračovaniu normálneho vývoja rastliny (Chan-Schamnet *et al.*, 2009). Transkriptóm je súbor všetkých RNA molekúl transkribovaných za určitých podmienok v bunke. Transkriptóm reprezentuje okamžitý stav bunky je dynamickou záležitosťou a platí, že HS podnecuje jeho komplexnú zmenu (Larkindale a Vierling, 2008).

Rýchla akumulácia HSP pri HS znamená, že dochádza k prudkej zmene génovej expresie. Všeobecne počas stresov dochádza k nadregulácii aj podregulácii mRNA. Pri HS u *Arabidopsis* majoritné množstvo transkriptov je podregulovaných (Larkindale a Vierling, 2008), čo podľa Merret a kolektívu (2013), naznačuje existenciu degradačnej dráhy pre mRNA. Ich hypotéza sa opiera o fakt, že u sadeníc *Arabidopsis* na začiatku HSR je 25 % celkového transkriptómu (viac ako 4500 mRNA) rýchlo degradovaných v smere 5'-3' katalytickou aktivitou exoribonukleázy XRN4. Znamenalo by to, že rastliny sú schopné takýmto spôsobom regulovať HSR na posttranskripčnej úrovni (Merret *et al.*, 2013).

V rámci HSR je len približne 5% transkriptómu *Arabidopsis* aspoň dvojnásobne nadregulovaných. Z toho množstva len zlomok kóduje HS indukované chaperóny, konkrétne 88 z 1780 u *Arabidopsis*. Zvyšok poolu tvoria transkripty kódujúce produkty učastniae sa Ca²⁺ signalizácie, proteínovej fosforylácie, transkripčnej regulácie, translácie, sekundárnych metabolitov, signalizácie a metabolizmu cukrov, lipidov, RNA a fytohormónov (Mittler *et al.*, 2011).

Expresia cytosolárneho HSP100 (ClpB) ryže je regulovaná na transkripčnej aj posttranskripčnej úrovni. Tento ďalší level regulácie zabezpečuje neprekladaná oblasť na 5' konci (5'UTR) mRNA (Mishra *et al.*, 2016). Dôvodom je skutočnosť, že u eukaryot počas HS je proteosyntéza z väčšej časti inhibovaná (Mishra s Grover, 2019), pretože je zastavený krok iniciácie translácie závislej od čiapočky (Dinkova *et al.*, 2005), konkrétne interakcia medzi 7-metylguanozínovou čiapočkou a eukaryotickým iniciačným faktorom-4F (eIF4E) (Mishra a Grover, 2019).

Vzhľadom na to, že HSP100 je primárne indukovaný a syntetizovaný počas HS znamená to, že syntéza tohto proteínu prebieha nezávisle od funkcie čiapočky (Mishra *et al.*, 2016). Mishra *et al.*, 2016 to vysvetľujú tým, že 5'UTR mRNA ClpB obsahuje putatívny vnútorné miesto pre vstup ribozómu (internal ribosomal entry site, IRES), ktoré umožňujú priame rekrutovanie ribozómu spôsobom nezávislým od čiapočky, ako to využívajú mnohé vírusy pre syntézu svojich proteínov. To isté platí aj pre 5'UTR mRNA HSP101 kukurice (Dinkova *et al.*, 2005). V semenách ryže za normálnych podmienok 5'UTR nie je potrebná pre expresiu, ale vo vegetatívnom štádiu zmena v putatívnej sekvencii IRES znamená takmer nulovú expresiu ClpB počas HS (Mishra *et al.*, 2016). Podľa Meyer a kolektív (2015) je označenie IRES častokrát nesprávne, nakoľko daná oblasť mRNA neobsahuje komplexné štruktúre prvky charakteristické pre virálne IRES.

Doteraz bolo identifikovaných viac ako 100 post-transkripčných modifikácií RNA molekúl. Metylácia adenínu na atóme N⁶ je jednou z najčastejších modifikácií RNA poolu (Yue *et al.*, 2019). Meyer a kolektív (2015) na nádorovej línii HeLa buniek ukázali, že mRNA s N⁶-metyladenozínom (m⁶A) vo svojej neprekladanej oblasti 5'UTR môže podstúpiť transláciu nezávisle od 7-metylguanozínovej čiapočky. V bunkách pri HS dochádza k intenzívnejšiemu modifikovaniu 5'UTR mRNA poolu, čo umožňuje ich transláciu počas HS, kedy je zablokovaná iniciácia proteosyntézy závislej od čiapočky. Modifikácia m⁶A spôsobuje priame viazanie eukaryotického iniciačného faktoru-3 (eIF3), ktorý následne rekrutuje 43S preiniciačný komplex umožňujúci začiatok translácie (Meyer *et al.*, 2015).

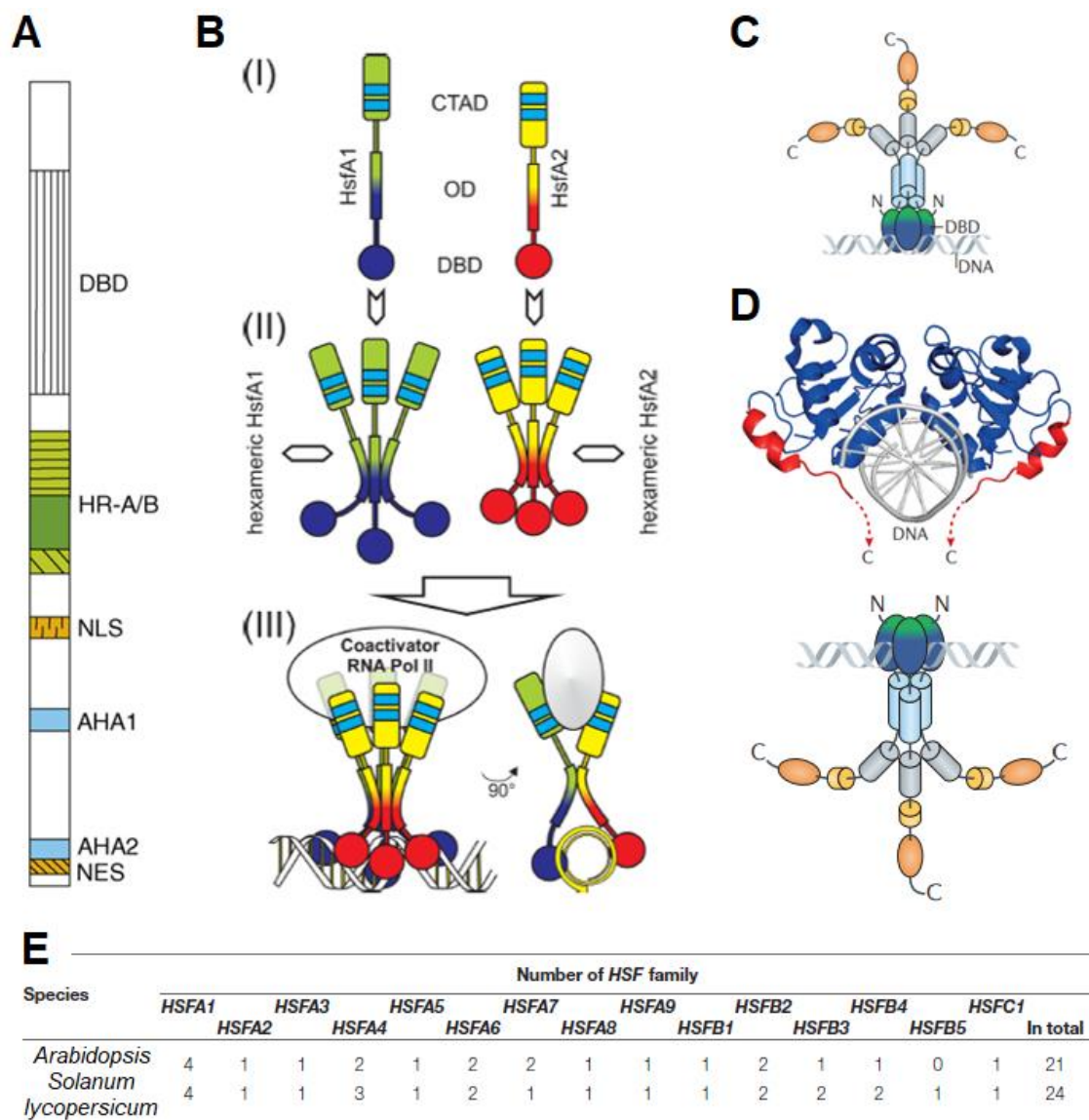
Počas HS u HeLa buniek jedna z pomedzi intenzívne transkribovaných mRNA kóduje HSP70, pričom je post-transkripčne modifikovaná metyláciou (m⁶A) vo svojej 5'UTR čo následne umožňuje intenzívnu proteosyntézu a akumuláciu HSP70, hoci je translácia závislá od čiapočky zablokovaná (Meyer *et al.*, 2015).

2.7.4 Heat shock faktory rastlín

Rastliny v porovnaní s inými organizmami disponujú až desiatkami HSF, ktoré formujú komplexnú regulačnú sieť nevyhnutnú pre zvládanie a prekonávanie výziev spojených so sesilným spôsobom života rastlín a dynamickosťou podmienok životného prostredia (Sugio *et al.*, 2009). U *Arabidopsis* existuje 21 HSF (obr. 8) deliacich sa do 3 tried (A, B a C) a 14 skupín (A1–9, B1–4 a C1), u *Solanum lycopersicum* je ich 26 (Yang *et al.*, 2016) u pšenice pravdepodobne 56 (Xue *et al.*, 2014), zatiaľ čo u ľudí šesť (Gomez-Pastor *et al.*, 2017) a u kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) len jeden (Bonner *et al.*, 2000). Lokalizácia HSF je dynamická záležitosť. HSF sú distribuované medzi jadrom a cytosolom. HSF vo svojej molekule obsahuje viacero funkčných domén (obr. 8), ktoré sú u rastlín konzervované a zabezpečujú hlavne trimerizáciu, transport do jadra, rozpoznanie HSE a interakcie s transkripčným aparátom (Koskull-Doring *et al.*, 2007).

Členovia rodín rastlinných HSF sa v rámci HSR líšia svojou funkciou a dynamikou expresie, čím je HSR rastlín presne regulovaná na transkripčnej úrovni (Ohama *et al.*, 2016). Rastlinné HSF triedy A sa odlišujú od HSF ostatných živých organizmov inzerciou 21 aminokyselín v oligomerizačnej doméne. Navyše unikátnou zvláštnosťou rastlinných HSF triedy B je schopnosť reprimovať transkripciu HSF triedy A (Ikeda *et al.*, 2011).

Okrem značného počtu HSF ďalšiu úroveň diverzity predstavuje schopnosť HSF tvoriť heterooligoméry. U rajčiny vznik týchto štruktúr je sprostredkovaný viacerými interakciami oligomerizačných domén dvoch HSF triedy A (HSFA1 a HSFA2), pričom rôzne časti oligomerizačnej domény (HR-A a HR-B vrátane časti linkera, ktorý ich prepája) sa podieľajú na selektívnych interakciách vedúcich k tvorbe a stabilizácii hexamérov, zložených dvoch HSFA2 a HSFA1 homotrimérov (obr. 8). Tvorba heterohexamérov je špecificky uprednostňovaná pred tvorbou homohexamérov (Chan-Schaminet *et al.*, 2009).

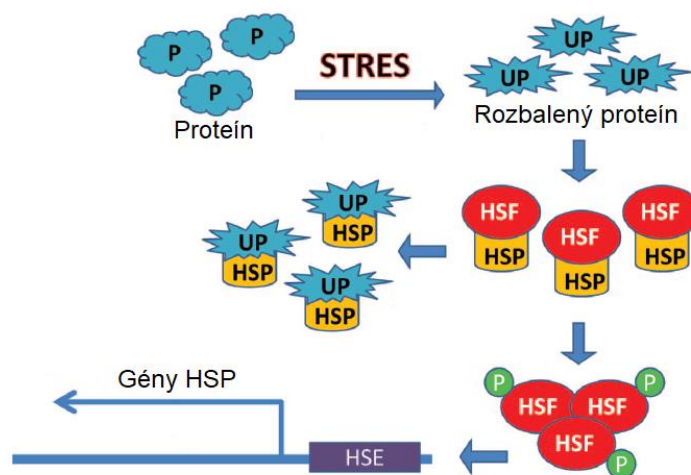


Obr. 8 Rastlinné heat shock faktory a tvorba oligomérov. A) Zjednodušená štruktúra rastlinného Heat Shock faktoru A2 z *Arabidopsis* (AtHSFA2). Smerom od N-konca nachádzame DNA väzobnú doménu (DNA binding domain, DBD) v tvare motívu helix-otočka-helix (helix-turn-helix), vedľa nej je hydrofóbná oligomerizačná doména tvorená určitými siedmimi aminokyselinami, ktoré sa opakujú (heptad repeats domain, HR-A a HR-B), ktorá formuje motív superhelixu (coiled coil) typického pre leucínové zipsy. Konkrétne ide o 3 leucínové zipsy zabezpečujúce trimerizáciu HSF. Na C-konci je umiestnená doména signalizujúca lokalizáciu do jadra (nuclear localization signal domain, NLS). C-koniec niektorých HSF obsahuje C-terminálnu aktivačnú doménu (C-terminal activation domain, CTAD) a doménu s jadrovým exportným signálom (nuclear export signal domain, NES). HSF triedy A obsahujú motívy s charakteristickým usporiadaním aromatických, hydrofóbných a kyslých aminokyselinových reziduí (aromatic/hydrophobic/acidic, AHA motives) rekrutujúce komponenty RNA polymerázy II (upravené podľa Koskull-Döring *et al.*, 2007). B) Tvorba heterooligomérov HSF (prevzaté z Chan-Schamiet *et al.*, 2009). C) Model znázorňujúci spôsob viazania triméru ľudskeho HSF2 na vlákno DNA. D) Kryštalová štruktúra zobrazujúca spôsob viazania diméru ľudskeho HSF2 na HSE molekuly DNA na základe, ktorej bol vytvorený nový model (obrázok dole) viazania triméru ľudskeho HSF2 (prevzaté z Gomez-Pastor *et al.*, 2017). E) Klasifikácia heat shock faktorov modelových rastlín *Arabidopsis thaliana* a rajčiny *Solanum lycopersicum* (prevzaté z Guo *et al.*, 2016).

2.7.4.1 Aktivácia funkcie HSF

Aktiváciu transkripcie cieľových génov prostredníctvom HSF vystihuje základný model, ktorý je spoločný a konzervovaný pre väčšinu eukaryot vrátane rastlín (obr. 9). Konkrétne tento model popisuje spustenie cytoplazmatickej proteínovej odpovede (CPR) (Li *et al.*, 2018). Za normálnych podmienok sú HSF inaktivované, pretože na nachádzajú v cytosole v komplexe s HSP70 a HSP90. Aby plnili svoju funkciu pri HS musia byť aktivované nasledujúcimi krokmi. Pri HS dochádza k narušeniu štruktúrnej organizácie proteínov, tie interagujú s HSP v dôsledku čoho HSP disociujú z väzby s HSF. Vytesnené HSF trimerizujú, sú fosforylované a lokalizované do jadra. Pre HSF 1 u človeka (Hs-HSF1) bolo experimentálne zistené, že počas HS navyše podstupuje sumoyláciu, acetyláciu a hyperfosforyláciu (Ohama *et al.*, 2016). Aby mohla byť expresia HSP nadregulovaná je potreba naviazania HSF na heat shock element (HSE) v promotore HS responzívnych génov. (Hahn *et al.*, 2011).

Kontaktným miestom HSF s DNA je DNA väzbová doména, resp. jej centrálny motív helix-otočka-helix, ktorý interaguje s palindromickou sekvenciou 5'-nGAAn-3' HSE lokalizovanou pred TATA boxom u eukaryot. C-konce HSF tiež obsahujú negatívne nabité AHA motívy, ktoré zabezpečujú interakcie s transkripčným aparátom, rekrutujú ho na cieľový promótor (Scharf *et al.*, 2012).



Obr. 9 Princíp aktivácie HSF v rámci cytoplazmatickej proteínovej odpovede (cytoplasmatic protein response, CPR) - odpovede na akumuláciu proteínov s narušenou priestorovou skladbou (upravené podľa Krivoruchko a Storey, 2010).

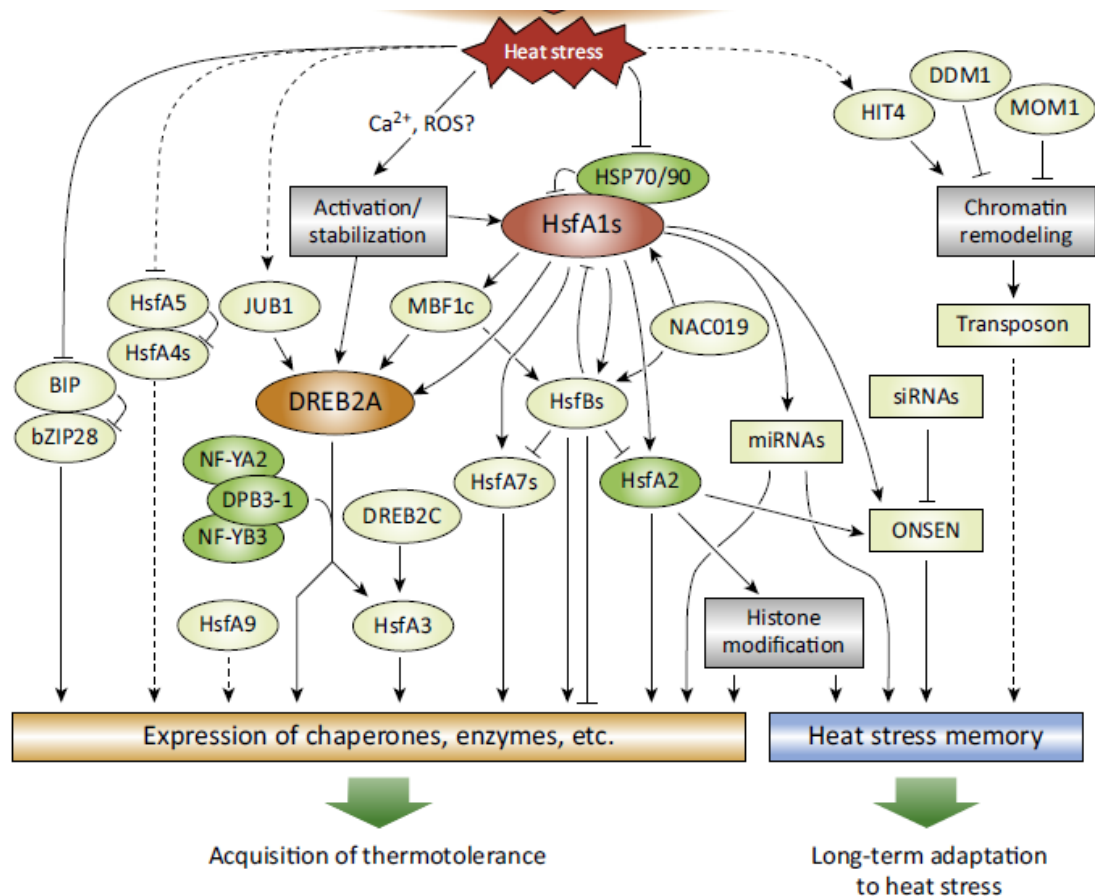
2.7.4.2 Regulačná sieť HSF a podriadených transkripčných regulátorov

Zatiaľ čo u človeka sú dráhy HSF dobre preskúmané, u rastlín sú komplexná sieť množstva transkripčných faktorov vrátane HSF a ich vzájomné vzťahy známe len čiastočne. HSR u rastlín je presne regulovaná na transkripčnej úrovni. HSF sú v signálnej kaskáde nadradené HSP aj ďalším, sekundárnym, transkripčným regulátorom (obr. 10; Ohama *et al.*, 2016). U modelových rastlín *Arabidopsis* a rajčiaka (*Solanum lycopersicum*) sú HSF triedy A hlavnými aktivátormi expresie génov (Guo *et al.*, 2016) s výnimkou jedného negatívneho regulátora, HSFA5 (Baniwal *et al.*, 2006). U *Arabidopsis* genetické štúdie ukázali, že funkciu hlavného regulátora zdieľajú všetky štyri HSF triedy A patriace do skupiny 1 (označované HSFA1a, HSFA1b, HSFA1d a HSFA1e) (Liu *et al.*, 2011), zatiaľ čo hlavným regulátorom HSR u rajčiny (*S. lycopersicum*) je jediný HSFA1a spomedzi všetkých členov triedy A, je konštitutívne exprimovaný a nadregulovaný pri HS (Mishra *et al.*, 2002).

Uvedené hlavné regulátory sú nadradené množstvu ďalších transkripčných faktorov HSF triedy A (HSFA1e, HSFA2, HSFA3, HSFA7a, a HSFA7b), HSF triedy B (HSFB1, HSFB2a, a HSFB2b), a transkripčným regulátorom DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 2A (DREB2A) a MBF1c (obr. 10) (Yoshida *et al.*, 2011). DREB2A a DREB2B sú transkripčnými faktormi z rodiny AP2/ERF špecifickej pre rastliny, indukované HS, pričom DREB2A plní dôležitú funkciu v rámci HSR a osmotickom strese u *Arabidopsis* (Kotak *et al.*, 2007). DREB2A sama o sebe priamo indukuje expresiu HSFA3 (Ohama *et al.*, 2017).

Transkripčné faktory HSFA1b, HSFA2, DREB2A a HSFA3 u *Arabidopsis* a *S. lycopersicum* amplifikujú signalizáciu spustenú HS a prispievajú tak k upevneniu termotolerancie a vytváraniu pamäte (stress memory), pre lepšiu odozvu na opakujúci sa HS (Fragkostefanakis *et al.*, 2018).

Okrem HSF triedy A1, HSFA2 (jediný zástupca v tejto skupine a triede) je ďalšou z regulačných komponentov CPR (Sugio *et al.*, 2009). Charng a kolektív (2007) ukázali, že teplom indukovaný HSFA2 u *Arabidopsis* nadreguluje expresiu HSP a predlžuje trvanie termotolerancie. HSFA2 je výhradne indukovaný HS a zároveň je v transkripčnej kaskáde podradený HSFA1 (Snyman a Cronjé, 2008). HSFA2 napriek tomu, že obsahuje jadrový lokalizačný signál musí interagovať s HSFA1, aby mohol vstúpiť do jadra a nehromadil sa v cytosole (Chan-Schamnet *et al.*, 2009).



Obr. 10 Sieť HSF a podriadených transkripčných regulátorov zobrazujúca vzťahy medzi proteínmi – prvkami signálnych kaskád spustených teplotným stresom. Podstatná časť siete je spustená aktivovanými heat shock faktormi triedy A (HSFA1s), ktoré disociujú z väzby na heat shock proteíny (HSP). Transkripčné faktory: DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING 2 (DREB2), MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR 1c (MBF1c), JUNGBRUNNEN1 (JUB1), NAC019, DREB2C, DNA POLYMERASE II podjednotka B3-1 (DPB3-1), NUCLEAR FACTOR Y, podjednotka A2 (NF-YA2; NF-YB3), DECREASED DNA METHYLATION 1 (DDM1), MORPHEUS MOLECULE 1 (MOM1), bázičný leucinový zip (bZIP28). Retrotransposón ONSEN. Imunoglobulin binding protein (BIP), reaktívne formy kyslíka (ROS), proteín HEAT-INTOLERANT 4 (HIT4), mikroRNA (miRNA), malíninterferujúca RNA (siRNA) (upravené podľa Ohama *et al.*, 2017).

Exprimovaný HSFA2 sa tiež ukladá do cytosolických granúl po interakcii s malými HSP (HSP17-CII), tým vznikajú inaktívne komplexy ako veľké proteínové agregáty (heat stress granules). V prípade situácie opakujúcich sa vln HS alebo počas dlhotrvajúceho HS, HSFA2 sa uvoľňuje z granúl a interaguje s HSFA1, aby spolu potencovali transkripčnú odpoveď (Fragkostefanakis *et al.*, 2018). Oba tieto HSF pôsobia synergicky v aktivácii transkripcie (superaktivácia), pretože dokážu vytvárať heterooligoméry (superaktivátorový komplex so stechiometriou blížiacou sa 1:1, obr. 8) schopné zvyčajne trojnásobne až päťnásobne silnejšej aktivácie transkripcie v porovnaní so súčtom príspevkov jednotlivých partnerov (Chan-Schamnet *et al.*, 2009).

Niekoľko transkripčných faktorov je aktivovaných nezávisle od HSFA1, ide o bazické leucinové zipsy dráhy UPR. HSFA4a je indukovaný oxidačným stresom aj počas HS (von Koskull-Döring *et al.*, 2007) a HSFA8 je pravdepodobne aktivovaný H_2O_2 (Miller a Mittler, 2006).

Pri narastajúcej akumulácii HSP, keď ich hladina presiahne množstvo HS denaturovaných proteínov a proteínov s nesprávnou konformáciou, HSP70 a ďalšie chaperony sa presúvajú do jadra, kde sa viažu na HSF (u HSF1 konkrétne na transaktivačnú doménu), čím negatívne regulujú HSR (Ikeda *et al.*, 2011). Atenuácia HSR tiež závisí na negatívnej regulačnej funkcii heat shock factor binding protein 1 (HSBP1), ktorý sa viaže na oblasť oligomerizačnej domény HSFA1a, čím dochádza k disociácii trimérov na neaktívne monoméry a prerušeniu jedného z hlavných signálov HSR. Nutná je však interakcia HSBP1 s HSP70 (Santoro, 2000).

Pre rastliny unikátne HSFB1 a HSFB2b priamo reprimujú expresiu HS indukovaných HSF. V princípe ide o negatívnu spätnú väzbu HSR u *Arabidopsis* (Ikeda *et al.*, 2011). U *S. lycopersicum* HSFB1 plní opačnú funkciu, správa sa ako transkripčný koaktivátor HSFA1 počas HS, toto pozorovanie Fragkostefanakis a kolektív (2018), rozšírili o poznatky, že HSFB1 rajčiny dokáže vystupovať ako koaktivátor alebo represor v spolupráci s HSFA1a (ako koaktivátor v menšej miere aj s HSFA9 a HSFA6b), jeho mód účinku závisí od konkrétneho promotora. Všeobecne môžeme povedať, že ako koaktivátor pôsobí na promotory HSP a ako represor na promotory niektorých HSF (vrátane HSFA1b, HSFA2 a HSFA7), týmto prispieva k znižovaniu expresie HSP a zníženej akumulácii HSP po skončení HS (Fragkostefanakis *et al.*, 2018).

Funkcia HSFB1 závisí tiež od fázy HSR. Na začiatku HS HSFB1 rajčiny (SIHSFB1) v komplexe s HSFA1a je čiastočne stabilizovaný a vykazuje koaktivačnú funkciu, zatiaľ čo vo fáze regenerácie po skončení HS sa správa ako represor. Po skončení HS, pri prechode do regeneračnej fázy, pravdepodobne HSP70 odstráni HSFA1a z väzby s HSFB1, týmto sa z HSFB1 stáva represor naďalej asociovaný s DNA, čo následne vedie k jeho degradácii 26S proteazómovým komplexom, ktorú iniciuje jeho represorová doména (Röth, *et al.*, 2017).

2.7.5 Delenie HSP podľa molekulovej hmotnosti

Na základe molekulovej hmotnosti sa HSP rozdeľujú najčastejšie do 5 rodín HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 a malé HSPs (sHSP). Číslo v názve vypovedá o približnej hmotnosti proteínov danej skupiny HSP (Kotak *et al.*, 2007). Okrem

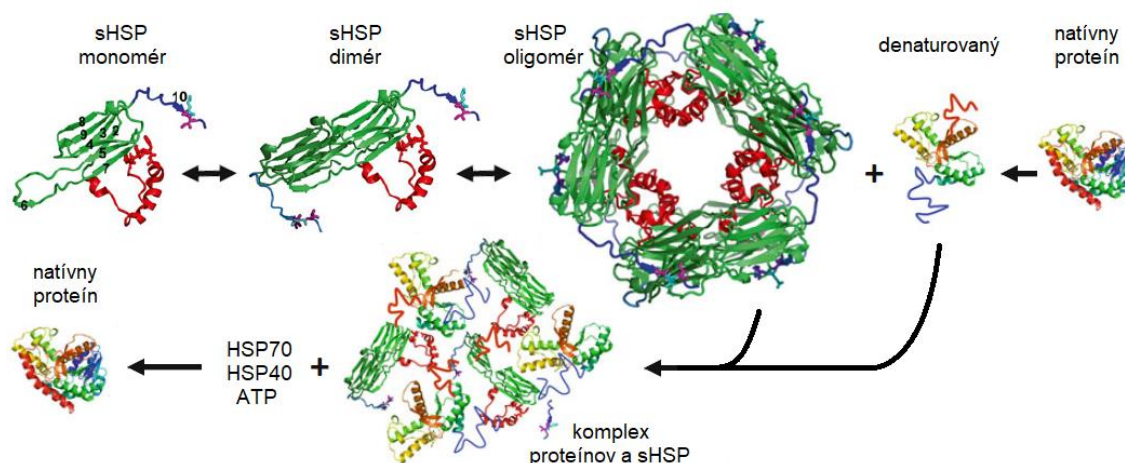
uvedeného delenia sa v literatúre stretávame aj s označením rodiny veľkých HSP70 podobných proteínov, ktorá zahŕňa kochaperony, HSP110 a HSP170. Obidva sa od HSP70 líšia predovšetkým dĺžkou a zložením C-konca proteínu (Dargovic *et al.*, 2006).

2.7.6 Malé HSP

Vyššie rastliny v porovnaní s ostatnými eukaryotmi obsahujú najviac malých HSP (sHSP; Waters *et al.*, 1996). Rodina sHSP zahŕňa proteíny, ktorých monoméry majú nízku molekulovú hmotnosť približne v rozsahu 16 až 42 kDa (Yu *et al.*, 2016). Spoločnou štruktúrnou vlastnosťou všetkých sHSP je tzv. α -krystallinová doména (ACD) blízko C-konca proteínu tvorená približne 90 aminokyselinami (de Jong *et al.*, 1998), podmieňujúcimi tvar beta-vláken, ktoré v priestore formujú beta-sandwich z dvoch antiparalelných beta listov (Kim *et al.*, 1998). ACD doménu z oboch strán obklopujú zväčša variabilne dlhé peptidové reťazce bez pravidelnej sekundárnej štruktúry, ktoré umožňujú usporiadanie sHSP do vyššie organizovaných štruktúr. V natívnom stave sHSP formujú mutimérne komplexy zložené z 8 až 24 podjednotiek, zriedkavo sa vyskytujú tiež ako diméry (obr. 11) (van Montfort *et al.*, 2001).

Počas stresu sa sHSP viažu na proteíny s narušenou priestorovou skladbou, čím zabraňujú ich agregovaniu a udržiujú ich v rozpustnom stave, nezávisle od nukleotid trifosfátov (sHSP nemajú ATPázovú aktivitu), z ktorého je možné obnoviť ich správnu konformáciu. Tohto procesu sa zúčastňujú HSP70, ktoré asistujú správne poskladaniu (renaturácii) za súčasnej hydrolýzy ATP (Lee a Vierling, 2000). Naviac sa do správneho skladania môžu zapojiť HSP100 a HSP60 ak sú v danom bunkovom kompartmente prítomné. *In vitro* a *in vivo* bolo dokázané, že členovia rodín HSP s vyššou molekulovou hmotnosťou účinnejšie obnovujú správnu konformáciu proteínov práve v prítomnosti sHSP (Haslbeck *et al.*, 2005). Malé HSP sú nevyhnutné pre termotoleranciu rastliny (Clarke *et al.*, 2004). HSP17 reverzibilne asociujú s membránami a stabilizujú ich počas HS tak, že znižujú ich fluiditu. Autori experimentu predpokladajú, že táto funkcia je dôležitá najmä v skorej fáze HS (Torok *et al.*, 2001).

Výskumy naznačujú, že HSP20 proteíny sa vyvinuli v dávej histórii ešte pred divergenciou živých organizmov do troch taxónov Eukarya, Bacteria a Archaea (Yu *et al.*, 2016).

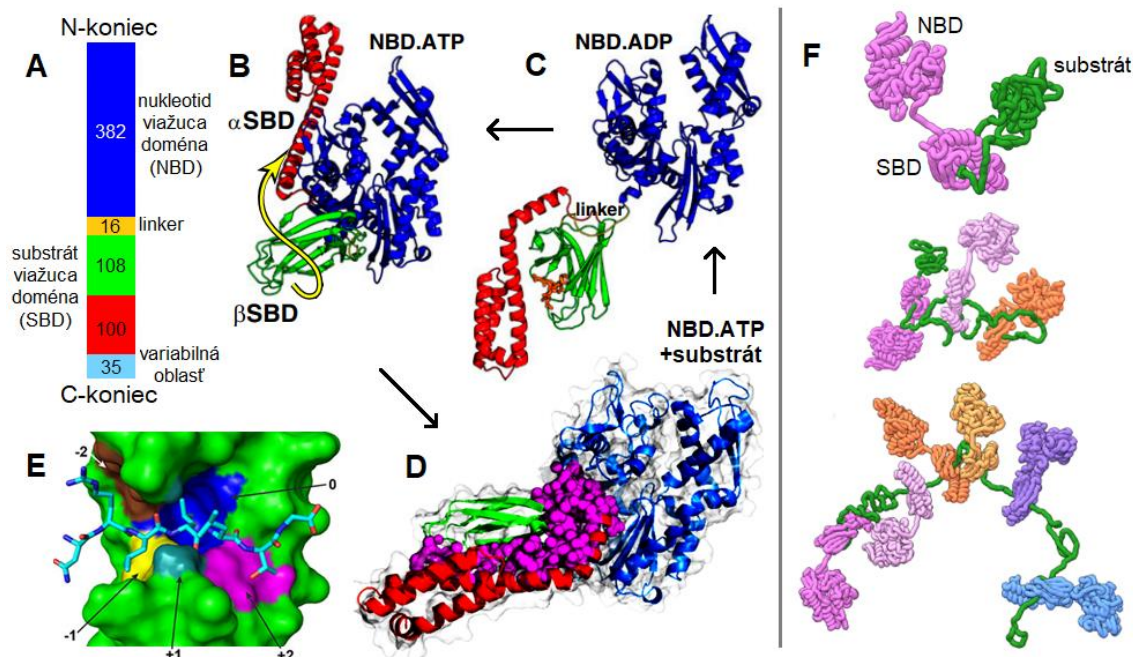


Obr. 11 Štruktúry a dynamika malých HSP (16,9 kDa sHSP pšenice). Monomér sHSP s očíslovanými beta-vláknami crystallinovej domény (ACD), ktoré vytvárajú beta-sandwich z dvoch antiparalélnych beta listov α -crystallin doména (ACD-zelená). Ramienko na N-konci (červené), C-koncový peptidový reťazec (modrý). Oligomérna štruktúra sHSP pozostáva zo šiestich dimérov. Oligomér a diméry môžu tvoriť komplex s denaturovanými proteínmi, ktorý je ďalej spracovaný systémom chaperonov, napr. dôjde k renaturácii proteínu (upravené a prevzaté z Santhanagopalan *et al.*, 2015).

2.7.7 HSP70

Do určitej miery všetky organizmy obsahujú HSP o molekulovej hmotnosti 68-78 kDa, ktoré spadajú do rodiny HSP70 (Usman, *et al.*, 2017). HSP70 je najštudovanejším, funkčne a štruktúrne vysoko konzervovaným členom spomedzi všetkých HSP, to platí pre rastliny aj cicavce (Mayer a Gierash, 2019). HSP70 je kľúčovým komponentom v odpovediach na rozličné stresy (Mayer a Gierash, 2019). Homológy HSP70 pozostávajú z ATPázovej domény o veľkosti 43 kDa na N-konci a substrát viažucej domény veľkej 27 kDa na C-konci proteínu, obidve domény spája krátka časť polypeptidu tzv. linker. SBD sa delí na 2 subdomény, a to β -sendvič subdoménu (β SBD) a α -helikálnu subdoménu (α SBD) (obr. 12), ktorú zakončuje flexibilný reťazec približne 30 aminokyselín (Mayer, 2013).

V genóme rajčiny bolo identifikovaných 30 homológov HSP70, pre *Arabidopsis* je to 13. HSP70 *Arabidopsis* sa dajú rozdeliť podľa motívu na C-konci do štyroch podskupín - chloroplastová, mitochondriálna, cytosolárna a podskupina HSP70 endoplazmatického retikula (Usman, *et al.*, 2017). *Arabidopsis* obsahuje 5 cytosolárnych HSP70, tri z nich sa konštitutívne exprimujú, pričom všetky cytosolárne HSP70 sú indukované HS, z toho 4 v rámci CPR (Sugio *et al.*, 2009).



Obr. 12 Štruktúra HSP70 (DnaK) baktérie *Escherichia coli*. A) Zjednodušené zobrazenie primárnej štruktúry spoločnej pre všetky HSP70. Čísla predstavujú počet aminokyselín, z ktorých pozostáva konkrétna doména alebo oblasť reťazca DnaK (upravené a prevzaté z Fernández-Fernández a Valpuesta, 2019). Čierne šípky znázorňujú poradie konformačných zmien v rámci cyklu HSP70. B) Terciárna štruktúra HSP70 v ATP stave bez substrátu zobrazuje konformáciu, kedy NBD (modrá) a SBD sú k sebe tesne naviazané. SBD sa delí na subdoménu z α -helixov (α SBD, červená) a subdoménu β -sendviča (β SBD, zelená). Žltá šípka znázorňuje oddelenie α SBD od β SBD, ku ktorej dochádza po zmene medzi ATP stavom a ADP stavom. ATP v štruktúre nie je zakreslené. C) Terciárna štruktúra HSP70 v ADP stave s naviazaným modelovým substrátom (oranžová) v SBD. SBD je prepojená krátkou časťou polypeptidového reťazca (linker) s NBD, obidve domény sú v tomto stave od seba najviac vzdialené. ADP v štruktúre nie je zakreslené (prevzaté a upravené podľa Zhuravleva a Gierash, 2015). D) Terciárna štruktúra HSP70 v ATP stave s naviazaným substrátom. Naviazanie substrátu spôsobí čiastočné vzdialenie sa SBD od NBD. Fialové guľičky znázorňujú aminokyselinové reziduá rozhrania NBD s linkerom a rozhranie α SBD s β SBD (prevzaté z Lai *et al.*, 2017). E) Pohľad na štruktúru komplexu väzbového miesta β SBD a modelového substrátu (peptid so sekvenciou NRLLLTG) α SBD nie je zobrazená. Hlavné aminokyselinové reziduá β SBD viažuce substrát sú farebne vyznačené a očíslované (prevzaté z Mayer a Gierasch, 2019). F) Simulácia štruktúry komplexov HSP70 (DnaK) s modelovým substrátom (rhodanáza). Naviazaním troch a šiestich molekúl HSP70 (molekuly HSP70 sú farebne odlišné) na jednu molekulu substrátu (zelená) dochádza k rozbaleniu substrátu (prevzaté z Assenza *et al.*, 2019).

Zástupcovia HSP70 spolu s kochaperónmi a kooperujúcimi chaperónmi tvoria komplexný systém, kontroly kvality nesprávne zbalených proteínov, ktorý predovšetkým zabráňuje agregovaniu proteínov, solubilizuje a skladá agregované proteínov, pri čom spolupracuje s sHSP, podieľa sa na degradácii proteínov. Zabezpečuje posttranslačne a kotranslačne tvorbu správnej konformácie (natívneho stavu) nascentých proteínov, účastní sa ich translokácie (Goloubinoff *et al.*, 2018), je čiastočne zapojený do procesov signálnej transdukcie. HSP70, HSP90 a kochaperony asociujú s regulačnými proteínmi,

tzv. klientmi (clients), signálnych dráh, čím sa HSP70 zúčastňuje regulácie proliferácie, diferenciácie a bunkovej smrti (Mayer a Bukau, 2005). Táto asociácia udržuje regulačný proteín inaktívny a zaniká na určitý podnet napr. fosforyláciou regulačného proteínu (Pratt a Toft, 2003).

2.7.7.1 Hypotézy mechanizmu pôsobenia chaperonov HSP70

Proteínový substrát, ktorý treba poskladať striedavo asociuje a disociuje z komplexu s HSP70. Proces skladania sa opakuje v cykloch, až kým proteín nedosiahne natívnu konformáciu (Mayer, 2013). HSP70 pôsobia lokálne na krátky segment polypeptidu substrátu, o dĺžke približne 7 alebo 8 aminokyselín (Jiang a Kalodimos, 2018) pričom sa jedna molekula substrátu môže viazať hneď s niekoľkými HSP70 (Kellner *et al.*, 2014). Existujú dve fundamentálne hypotézy, vysvetľujúce mechanizmus skladania proteínov HSP70 chaperonmi, ktoré vychádzajú z mechanizmu navrhnutého Rothman (1989), menovite konformačná selekcia (conformational selection), alternatívne označovaná holdázová aktivita (holdase), a indukované prispôsobenie (induced fit), alternatívne označovaná unfoldázová aktivita (unfoldase) (Sekhar *et al.*, 2018).

Hypotéza konformačnej selekcie popisuje chaperón ako holdázu. Chaperon viaže nezložené proteíny a limituje mieru prechodu do poskladaného stavu. Vznikom komplexu HSP70-substrát sa spomaľuje samovoľné skladanie proteínu a zabraňuje sa tak predčasnemu zloženiu, ktoré eventuálne môže zapríčiniť nesprávne skladanie alebo agregáciu proteínov (Slepenkov a Witt, 2002).

V kontraste s uvedenou hypotézou, ktorá chaperonu pripisuje hlavne pasívnu funkciu, druhá hypotéza, hypotéza indukovaného prispôsobenia, vykresľuje chaperon ako unfoldázu, ktorej katalytický účinok je spriahnutý s využitím energie ATP. Týmto spôsobom sa chaperon HSP70 aktívne účastní zmeny konformácie substrátu. Unfoldáza v princípe neselektívne sprostredkúva rozloženie misfolded a agregovaných proteínov a ich premenu na intermediáty schopné produktívneho skladania (Slepenkov a Witt, 2002). Naviazanie viacerých HSP70 na jednu molekulu substrátu vedie k rozbaleniu pôvodne kompaktnej štruktúry substrátu, z dôvodu sterickej repulzie medzi molekulami HSP70 (Kellner *et al.*, 2014).

Proces samotného skladania substrátu po disociácii z HSP70 je samovoľný, toto spája obidve hypotézy. Tento jav samovoľného skladania biopolymérov je rýchly a označuje sa kinetic partitioning (Sekhar *et al.*, 2018).

Sekhar a kolektív (2018) pre ľudský HSP70 aj DnaK svojim experimentom prezentujú, že konformačná selekcia je prevládajúci mechanizmus, pretože molekuly proteínového substrátu existujú v mnohých konformačných stavoch a HSP70 viaže ten konformér zo súboru, ktorý odzrkadľuje väzbový stav HSP70. Experiment taktiež objasňuje, prečo sa HSP70 neviaže na proteíny v natívnom stave (Jiang a Kalodimos, 2018).

2.7.7.2 Termodynamická rovnováha, chaperóny a ustálený stav

Všetky modely mechanizmov skladania napriek vzájomným rozdielom aj rozdielom medzi jednotlivými triedami ATP-dependentných chaperonov (HSP70, HSP60 a HSP100) z mechanistického uhla pohľadu zdieľajú analogické základné črty a vysvetľujú rovnaký fenomén, t.j. že chaperony asistujú vzniku natívnych stavov (Goloubinoff *et al.*, 2018).

Hypotéza kinetic partitioning hovorí o samovoľnom skladaní nascentných proteínov a uplatňuje sa aj pre proteínové substráty disociované z HSP, ktoré v priestore automaticky bez asistencie zaujmú kondenzovanú štruktúru (Thirumalai *et al.*, 2020), pri tom vzniká celý súbor kondenzovaných štruktúr vrátane natívneho stavu, ktorého vznik je však málo pravdepodobný. Na druhej strane vzniká veľa metastabilných stavov s nesprávne poskladanou konformáciou (Goloubinoff *et al.*, 2018).

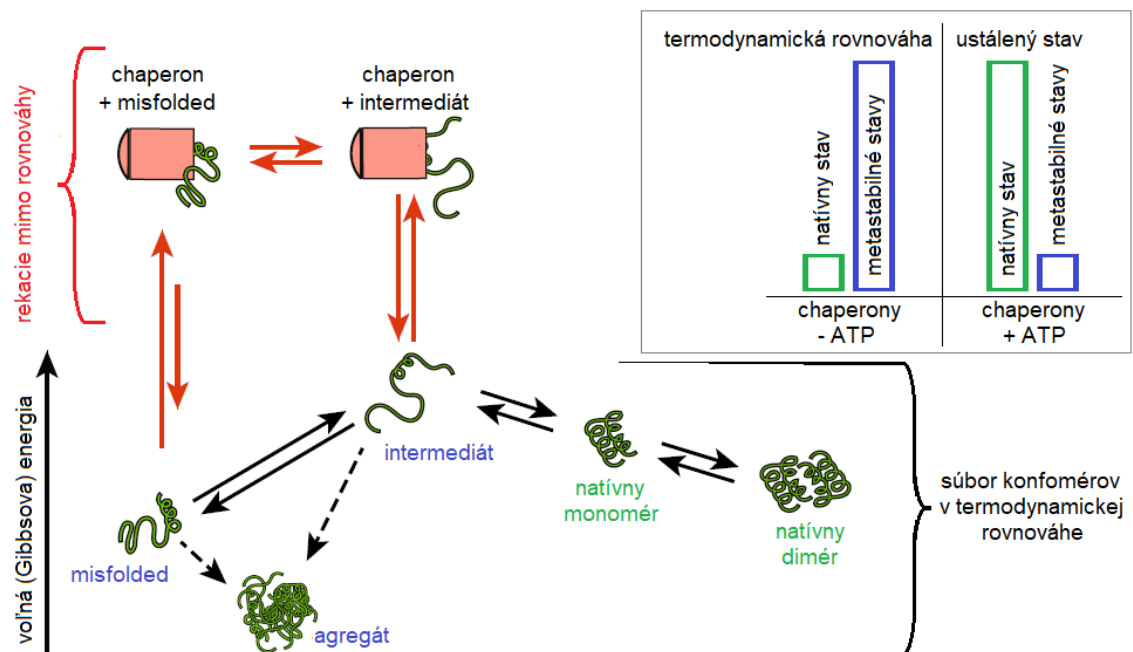
Molekuly v metastabilných stavoch sú z časového hľadiska v pasci (kinetic trap), pretože dosiahli stabilné usporiadanie význačne nízkou Gibbsovou voľnou energiou a molekula v ňom strávi dlhý čas, pretože na zmenu konformácie treba prekonať veľkú energetickú bariéru (Thirumalai *et al.*, 2020).

Medzi všetkým rôznymi konformačnými stavmi sa v systéme ustáli termodynamická rovnováha (obr. 13), ktorá je posunutá na stranu metastabilných stavov a molekúl v natívnom stave je len minimum. Štruktúra natívneho proteínu sa v porovnaní s nezloženým proteínom vyznačuje nízkou Gibbsovou voľnou energiou. Štruktúry proteínov v metastabilných stavoch však majú voľnú energiu ešte nižšiu než natívny stav, preto je ich vznik uprednostňovaný (Goloubinoff *et al.*, 2018).

Hodnota Gibbsovej voľnej energie proteínovej štruktúry (obr. 13) je daná vybalansovaním poklesu voľnej energie (tvorba slabých, nekovalentných, interakcií, vodíkových mostíkov a pod.) a nárastom voľnej energie (spôsobenej poklesom konformačnej entropie po zložení proteínu) (Motojima, 2015).

Túto rovnováhu ovplyvňujú, resp. narúša systém chaperonov (HSP70, HSP60, HSP100), ktoré na úkor energie ATP zabezpečujú prevahu natívnej konformácie, ktorá však za daných podmienok nie je najstabilnejšia (obr. 13). Chaperon viaže proteín v metastabilnom stave (napr. denaturovaný) a mení ho na intermediát. Intermediát po disociácii z chaperonu sám zaujme natívny alebo metastabilný stav. V prípade, že vznikne metastabilný stav ihneď reaguje s chaperonom a znova sa mení na intermediát (obr. 13) (Goloubinoff *et al.*, 2018).

Podmienky podporujúce denaturáciu proteínov, napr. zvýšená teplota pre termolabilné proteíny, posúvajú rovnováhu ešte viac na stranu vzniku metastabilných stavov. Úlohou chaperonov je tento efekt potlačiť a udržiavať väčšinu proteínov v natívnom stave aj za stresových podmienok (Goloubinoff *et al.*, 2018).



Obr. 13 Schéma zobrazujúca funkčné vzťahy chaperonov k súborom konformačných stavov proteínov súčasne naznačuje princíp, ktorým ATP dependentné chaperony udržujú ustálený stav (reakciami mimo rovnováhy, znázornené červenými šípkami). Reakciami mimo rovnováhy ATP dependentné chaperony narúšajú termodynamickú rovnováhu (štruktúra natívneho stavu má vyššiu voľnú energiu, preto je termodynamická rovnováha posunutá k metastabilným stavom t.j. štruktúram s nízkou voľnou energiou). Intermediát možno prirovnať k rozbalenému alebo čiastočne poskladanému proteínu, resp. konformácii proteínu, s vysokou voľnou energiou, ktorá sa samovoľne mení na natívny stav alebo niektorý z iných metastabilných stavov (princíp hypotézy kinetic partitioning). Graf v rámcu orientačne zobrazuje pomer natívnych a metastabilných stavov po dosiahnutí termodynamickvej rovnováhy (chaperony bez ATP, prevaha metastabilných stavov) a v ustálenom stave (chaperony s dostatkom ATP), v ktorom majoritná frakcia proteínov je v natívnom stave (upravené podľa Goloubinoff *et al.*, 2018).

2.7.7.3 Cyklus HSP70

Interakcia so substrátom je riadená statusom nukleotidu ATP v nukleotid viažucej doméne (NBD), podľa ktorého rozlišujeme 2 periodicky sa striedajúce stavy HSP70, najčastejšie študované u DnaK (HSP70 *E. coli*). HSP70 môže so substrátom interagovať sám alebo jeho dodanie do SBD sprostredkuje kochaperón, konkrétne proteín s J-doménou (Kampinga a Craig, 2010).

Hydrolyzou ATP na ADP a fosfát dochádza ku konformačnej zmene HSP70, resp. alosterickému prechodu, t.j. zmene konformácie spojenej so zmenou afinity väzobných miest (Lai *et al.*, 2017). V prípade naviazaného ATP vykazuje SBD nízku afinitu k substrátu, ktorý sa teda môže rýchlo viazať a rýchlo disociovať z tejto domény. Stav HSP70 s naviazaným alebo absenciou ADP v NBD je charakterizovaný vysokou afinitou SBD k substrátu (Mayer, 2013).

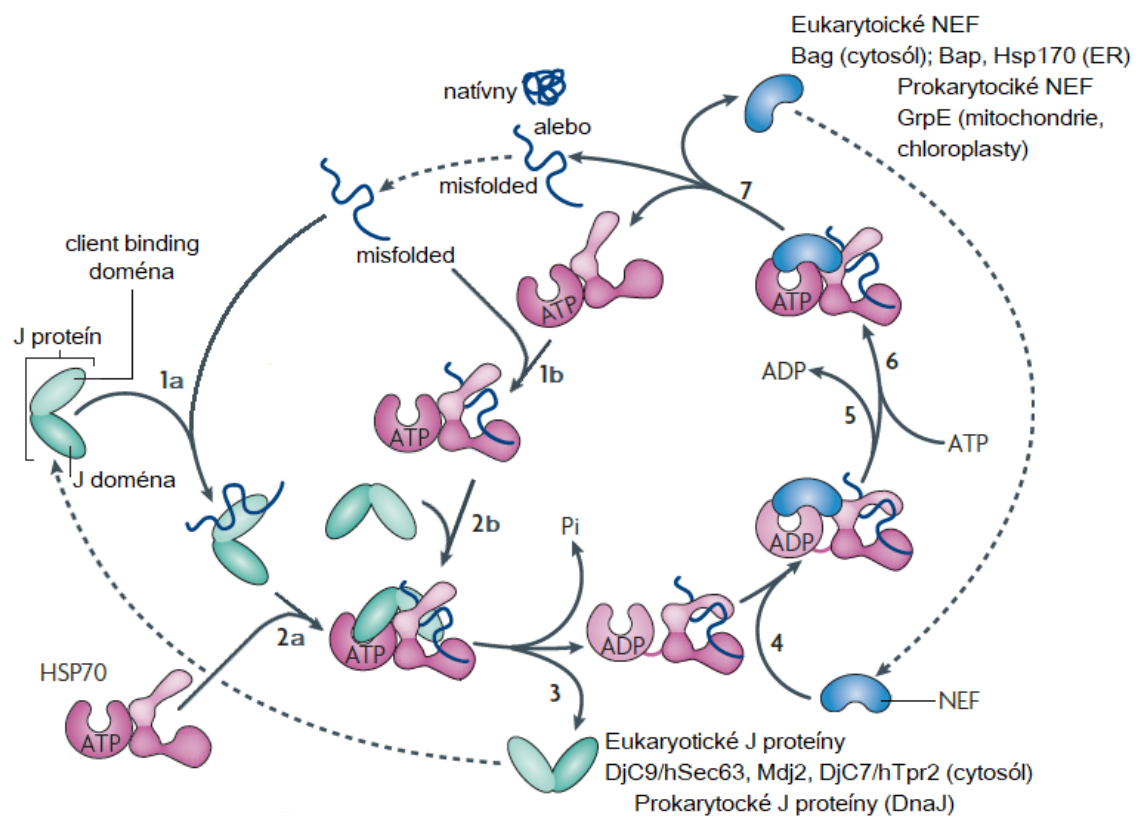
V ATP stave (ATP state) bez substrátu existujú v rovnováhe rôzne konformačné stavy DnaK. Väčšina molekúl súboru DnaK zaujíma kompaktnú konformáciu, kedy NBD, β SBD a α SBD sú v tesnej blízkosti (Mapa *et al.*, 2010), súčasne však minoritná frakcia molekúl DnaK existuje v tomto kompaktnom stave s tým, že α SBD je pohyblivou jednotkou a nie je asociovaná s NBD. V ATP stave naviazanie substrátu spôsobí čiastočné oddialenie NBD a SBD s tým, že linker zostáva spojený s NBD (obr. 12 D) a α SBD sa stáva ešte viac pohyblivou, ako keď NBD je bez substrátu a súčasne tesne naviazaná s SBD (Lai *et al.*, 2017).

Konformačné stavy DnaK v ADP stave (ADP state) so substrátom sú značne heterogénne a dynamické vzhľadom na interakcie NBD, β SBD a α SBD (Mapa *et al.*, 2010). NBD a SBD sú od seba najďalej vzdialené (obr. 12 C; linker nie je asociovaný s NBD ako v ATP stave so substrátom), pričom u väčšiny molekúl súboru DnaK je α SBD dynamická, teda oddelená od substrát väzbového miesta, pričom vo zvyšnej menšine prípadov asociuje s β SBD (Lai *et al.*, 2017) a pomáha pridržovať substrát (Mayer, 2013).

HSP70 kooperuje s kochaperónmi (obr. 14), z ktorých najdôležitejšie sú proteíny s J-doménou a faktory výmeny nukleotidov (Alderson *et al.*, 2016). Vlastná ATPázová aktivita NBD HSP70 je nízka a proteíny s J-doménou (HSP40 nazývané aj DnaJ) ju pozitívne stimulujú (Misselwitz *et al.*, 1998), k stimulácii svojim podielom prispieva aj substrát (Mapa *et al.*, 2010). Proteíny s J-doménou disponujúce navyše tzv. väzobnou doménou pre klientov (client binding domain) okrem stimulácie hydrolyzy ATP sprostredkujú dodanie misfolded substrátov – klientov do SBD HSP70 (Kampinga

a Craig, 2010), vrátane nascentných polypeptidových reťazcov vychádzajúcich z ribozómu, translokovaných cez membránový pór, oligoméry, ktoré treba rozobrať alebo zložiť (Mayer a Gierasch, 2019). Viacero molekúl DnaJ sa môže viazať sa jednu molekulu substrátu, čo môže viesť k naviazaniu eventuálne viacerých molekúl HSP70 na substrát (Kellner *et al.*, 2014).

Eukaryotické faktory výmeny nukleotidov t.j. proteíny rodiny Bag, cytosolárny HSP110, ďalej HSP170 endoplazmatického retikula a GrpE v organelách prokaryotického pôvodu zabezpečujú rýchle uvoľnenie ADP, aby sa následne mohol naviazať ATP. S touto zámienou je spriahnuté uvoľnenie substrátu (Mayer, 2010), ktorého rýchlosť je limitovaná disociáciou ADP (Mayer a Bukau, 2005).

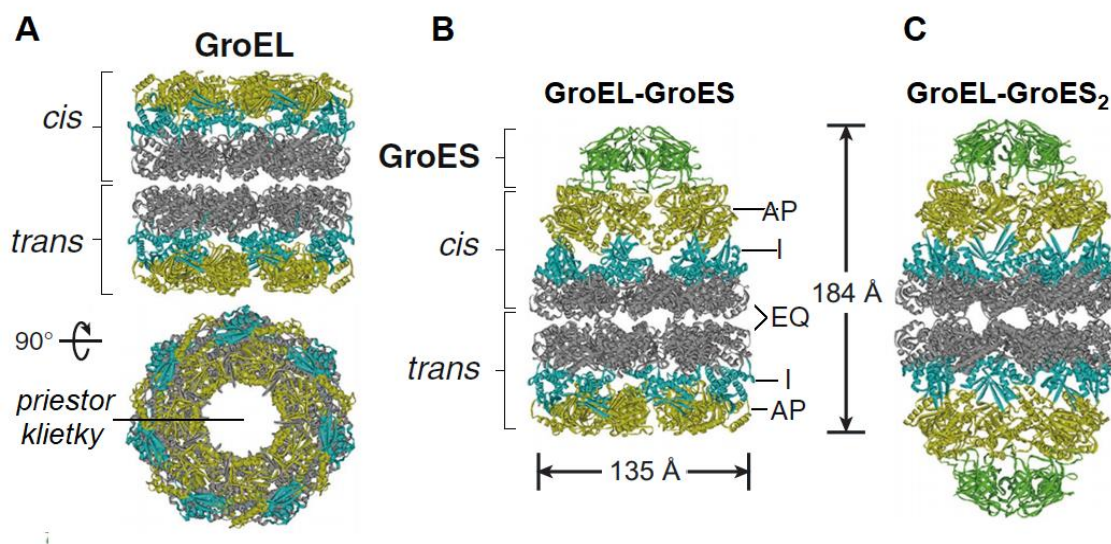


Obr. 14 Schéma cyklu HSP70 so znázornením spolupôsobenia kochaperonov. (1a) J-proteín svojou substrát viažucou doménou asociuje s nesprávne zbaleným (misfolded) proteínom, ktorý poslúži ako substrát pre HSP70, (1b) eventuálne HSP70 priamo viaže substrát. (2a) Proteín s J-doménou a misfolded proteínom vytvára komplex s HSP70, ktorý je v ATP stave, alebo (2b) sa proteín s J-doménou viaže na predtým vzniknutý komplex HSP70-substrát. (3) Následne J-doména J-proteínu iniciuje hydrolyzu ATP a disociuje z komplexu. HSP70 týmto prechádza do ADP stavu s vysokou afinitou k substrátu. (4) Faktor výmeny nukleotidov (NEF) vytvára komplex s HSP70 a jeho substrátom. (5) NEF zabezpečuje uvoľnenie ADP, (6) vzápätí sa na jeho miesto viaže ATP a HSP70 prechádza do ATP stavu s nízkou afinitou k substrátu. (7) Komplex NEF-HSP70-substrát sa rozpadá na jednotlivé komponenty, pričom HSP70 vstupuje do nového cyklu s novým alebo tým istým substrátom v prípade, že substrát ešte nebol správne poskladaný (upravené podľa Kampinga a Craig, 2010).

2.7.8 HSP60

Chaperoniny, chaperony triedy HSP60, sú veľké oligomérmé proteíny pozostávajúce z dvoch kruhových štruktúr, každá z nich z rovnakého počtu podjednotiek o veľkosti približne 60 kDa, ktoré sa nekovalentne spájajú. Ich kvartérna štruktúra tvorí valec o veľkosti 772 kDa (GroEL z baktérie *E. coli*), ktorý v oblasti stredovej osi obsahuje priestor, tzv. klietku (cage), kde sa viažu proteínové substráty (obr. 15) (Roh *et al.*, 2017). HSP60 na rozdiel od HSP70 uzatvárajú celý substrát, alebo jeho časť (Mayer, 2010), a týmto spôsobom asistujú skladaniu denaturovaných polypeptidových reťazcov o veľkosti predovšetkým 25 až 60 kDa (Feldman a Frydman, 2000), za súčasnej spotreby veľkého množstva ATP (Thirumalai *et al.*, 2020).

Podľa štruktúry a pôvodu rozdeľujeme HSP60 do dvoch rodín, ktoré sa odlišujú hlavne tým, že chaperoniny rodiny I tvoria komplex HSP60 s kochaperonom HSP10, ktorý ako vrchnák uzatvára klietku HSP60 (obr. 15). Táto trieda sa vyskytuje u prokaryot a v organelách symbiotického pôvodu (plastidoch a mitochondriách) (Evstigneeva *et al.*, 2001). Na druhej strane chaperoniny rodiny II nepotrebuje HSP10, pretože podjednotky kruhových štruktúr obsahujú navyše vrchnákové domény (lid domains), ktoré spolu fungujú podobne ako jeden HSP10. Zástupcovia tejto rodiny sú charakteristickí pre cytosol eukaryot a archaea (Spiess *et al.*, 2004).



Obr. 15 Oligomérmé štruktúry chaperoninu HSP60 z *E. coli* získané difrakčnou analýzou. A) Obidva prstence valcovitého tvaru GroEL asociujú svojimi ekvatoriálnymi doménami. Každý z prstencov GroEL sa skladá zo 7 podjednotiek. C) Asymetrický model komplexu GroEL s kochaperonom GroES (HSP10, zelená), ktorý uzatvára GroEL ako vrchnák. D) Symetrický model GroEL s dvoma GroES. Každá podjednotka GroEL sa skladá z troch domén, apikálnej (AP, žltá), intermediárnej (I, modrá) a ekvatoriálnej (EQ, sivá) (upravené podľa Iizuka a Funatsu, 2016).

Asociácie HSP60 a substrátov sú sprostredkované slabými nekovalentnými interakciami. Proteín, ktorý na povrchu nemá hydrofóbne oblasti, sa neviaže do kliečky HSP60 (Motojima *et al.*, 2012). Množstvo hydrofóbnych kontaktov ovplyvňuje rýchlosť skladania, priveľa kontaktov spôsobuje pomalé skladanie, predlžuje sa retencia, teda čas proteínového substrátu, ktorý strávi vo vnútri HSP60 (Motojima a Yoshida, 2010). Skladanie proteínových substrátov je najlepšie preštudované u GroEL/GroES systému (HSP60 chaperoniny *E. coli*) a prebieha v ATP-dependentných cykloch, počas ktorých dochádza k striedaniu alosterických prechodov (Hayer-Hartl *et al.*, 2016). Rozlišujeme dva typy týchto cyklov, a to symetrický a asymetrický reakčný cyklus (obr. 15), čo pravdepodobne závisí od koncentrácie substrátov s nesprávnou konformáciou (Iizuka a Funatsu, 2016).

Pre vysvetlenie mechanizmov skladania existujú tri modely (Motojima, 2015). Podľa modelu pasívnej kliečky (passive cage) sa proteíny skladajú samovoľne, HSP60 ich môže v sebe zadržiavať aby neagregovali. Základom modelu obmedzenia (Confinement model) je, že HSP60 urýchľuje skladanie, pretože ohraničený priestor kliečky dovoľuje určité, hlavne produktívne interakcie. Model iteratívneho rozbaľovania (Iterative Annealing) hovorí, že počas cyklov HSP60 opakovane viaže, následne rozbaľuje misfolded proteíny a nakoniec ich uvoľňuje von z kliečky, čím urýchľuje ich skladanie do natívnej konformácie (Thirumalai *et al.*, 2020).

Napriek tomu, že pre jednotlivé proteíny jeden model sedí viac než druhý model Iterative Annealing obecně najlepšie vystihuje väčšinu experimentálne získaných poznatkov o skladaní (Thirumalai *et al.* 2020). HSP60 neasistuje skladaniu spôsobom, aby cielene podporil vznik preferovaných konformácií u substrátu. Chaperonin počas ATP-dependentných cyklov opakovane mení svoju konformáciu, priestor kliečky tým mení svoj objem a striedavo v ňom vystupujú do popredia polárne a hydrofóbne aminokyselinové reziduá. Interakcie medzi hydrofóbnymi rozhraniami kliečky a substrátu sa počas cyklov formujú a menia náhodne, čo vo výsledku rozbaľuje substrát. Napriek pozorovaniám, že HSP60 urýchľujú skladanie určitých štruktúrnych motívov (Motojima, 2015), Thirumalai a kolektív (2020) zdôrazňujú, že informácie pre skladanie, resp. samovoľné poskladanie sú dané výhradne sekvenciou proteínu a chaperonin pracuje cyklicky ako mechanický stroj, ktorý pomáha rozbaľovať denaturované proteíny (metastabilné stavy), premenou na intermediáty, ktoré tým pádom majú možnosť sa znova samovoľne poskladať do natívneho stavu (Thirumalai *et al.*, 2020).

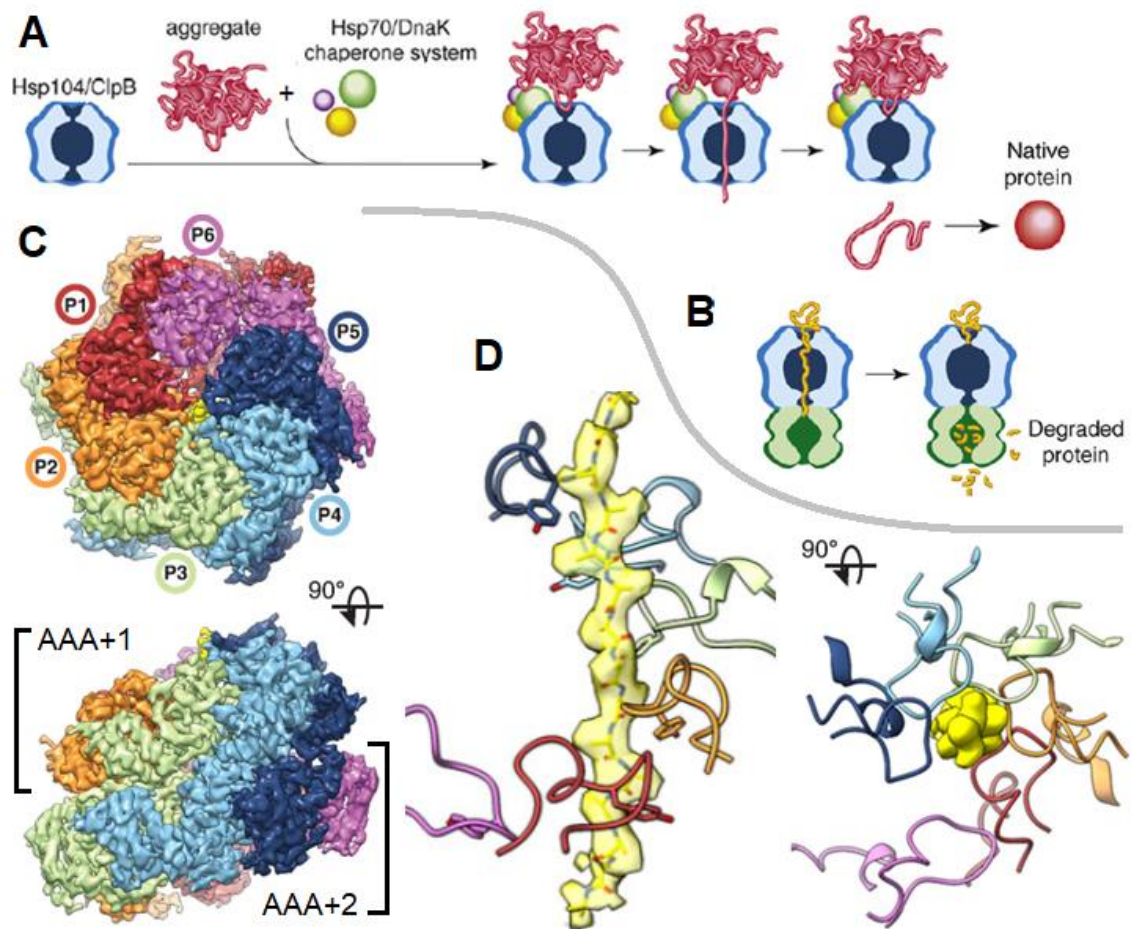
2.7.9 HSP100

Proteíny rodiny HSP100 sú evolučne konzervované u organizmov húb, baktérií a rastlín (Singh *et al.*, 2010) a umožňujú im lepšie zvládať zmeny environmentu, ktorým sú vystavené. Existencia iných obranných mechanizmov, ako sa vysporiadať s HS je pravdepodobne dôvodom, neprítomnosti HSP100 u väčšiny živočíchov (Mishra a Grover, 2019),

HSP100 sa vyskytujú naprieč rôznymi druhmi rastlín pričom v bunkách rastlín existujú tri izoformy HSP100, označované skratkou ClpB (Caseinolytic Protease B), a to mitochondriálna, plastidová a cytoplazmatická (Mishra a Grover *et al.*, 2015). Zistilo sa, že pre termotoleranciu je kľúčová práve cytoplazmatická izoforma ClpB. (Lee *et al.*, 2007), organizmy s kockoutovaným génom nedokážu prežiť HS (Queitsch *et al.*, 2000) Cytosolárny ClpB sa odlišuje od tých v mitochondriách a plastidoch, zatiaľ čo mitochondriálna a plastidová izoforma ClpB sú si navzájom podobné a sú blízko príbuzné bakteriálnym a cyanobakteriálnym ClpB (Mishra a Grover, 2015).

Vo vegetatívnom stave mnohých študovaných rastlín (rajčina, *Arabidopsis*, pšenica, kukurica, ryža a sója) je proteín ClpB indukovaný stresom, primárne HS (Mishra a Grover, 2015), naproti tomu izoformy v organelách sú exprimované konštitutívne (Mishra a Grover, 2015).

ClpB a kvasinkový HSP104 sú hexamérnymi komplexmi, stredom ktorých prechádza pór slúžiaci na translokáciu proteínov. Každý protomér obsahuje dve ATPázové domény spájané s rozličnými bunkovými aktivitami (ATPases associated with diverse cellular activities domains), skrátene AAA+, často označované ako nukleotid viažuca doména 1 (NBD1) a NBD2 (Gates *et al.*, 2017). Jednotlivé protoméry NBD1 navyše obsahujú amino-terminálne domény (NTD), ktoré sú prepojené s NBD1 flexibilným linkerom. NTD spolu vytvárajú kruhovú štruktúru a sú dôležité v blokovaní vstupu do póru a pre počiatkové interakcie so substrátmi. Substrát vstupuje do póru práve na strane HSP100, kde sa nachádzajú NTD (Rosenzweig *et al.*, 2015). Stredová doména (middle domain) medzi NBD1 a NBD2 interaguje s komplexom HSP70-substrát a je dôležitá pre alosterické regulovanie hydrolýzy a disagregačného procesu (obr. 16) (Rizo *et al.*, 2019).



Obr. 16 Štruktúra a funkcia HSP100. A) Zjednodušená schéma zobrazujúca kooperáciu HSP100 (HSP104 označenie pre kvasinkový, ClpB označenie pre rastlinný a bakteriálny proteín triedy HSP100) s HSP70, ktorý umožňuje nadviazanie proteínového agregátu na ClpB. ClpB následne pôrom v strede svojej molekuly translokujú polypeptidový reťazec za súčasnej hydrolyzy ATP, čím pretvára agregát do stavu schopného renaturácie. B) Komplex ClpB (modrá) a proteázy ClpP (zelená). Niektorí členovia Clp rodiny sú schopní asociovať s proteázami ClpP, do vnútra ktorých translokujú agregované polypeptidové reťazce (žltá) určené k hydrolyze (upravené podľa Doyle a Wickner, 2009). C) Kryo-elektrónovou mikroskopiou získaná kvartérna štruktúra uzatvoreného komplexu HSP104 a substrátu (žltá uprostred štruktúry) zo strany, kde vstupuje substrát do centrálneho póru. Jednotlivé protoméry kruhových AAA+ domény sú farebne odlišené. HSP104 sa skladá z dvoch ATPázových domén spájaných s rozličnými bunkovými aktivitami (ATPases associated with diverse cellular activities domains), skrátene AAA+ domén. Na hornej strane AAA+1 sa nachádzajú N-terminálne domény jednotlivých protomérov tvoriace kruhovú štruktúru, ktoré však nie sú v danej štruktúre zobrazené. Farebné odlišenie protomérov je zachované aj pre nasledujúce dva obrázky. D) Špirálovité usporiadanie tyrozínových slučiek nukleotid viažucích domén AAA+2 kruhu okolo substrátu (žltá). Päť zo šiestich tyrozínových slučiek je v kontakte so substrátom, šiesta (protomér 6, fialová) je odpojená od substrátu. Pohľad zhora ukazuje tesný kontakt tyrozínových slučiek so substrátom bez znázornenia vedľajších reťazcov tyrozínov (upravené podľa Rizo *et al.*, 2019).

HSP100 sú esenciálne pre termotoleranciu, pretože ich úloha v spracovávaní proteínových agregátov umožňuje prežiť HS (Queitsch *et al.*, 2000). Toxické agregáty v bunkách môžu byť, okrem ClpB, degradované niekoľkými z ôsmich členov Clp rodiny,

ktoré dokážu asociovať s proteolytickými ATPázovými komplexami. Nakoľko ClpB nedisponuje tzv. IGF/L motívom vo svojej štruktúre, ktorý umožňuje asociáciu s proteázou ClpP, plní teda výhradne funkciu v rámci renaturácie agregovaných proteínov (Mishra a Grover, 2015). Uvedená funkcia rastlinných ClpB bola experimentálne potvrdená len nepriamo (Mishra a Groover, 2015) tak, že Agarwal a kolektív (2003) využili kvasinku s knockoutovaným génom kódujúcim jej vlastný HSP100 (ScHSP104) s zároveň exprimujúcu cytosolárny ClpB z ryže, pričom v bunkách wild type kvasinky a transformovanej kvasinky bolo pozorované vymiznutie granúl proteínových agregátov (Agarwal *et al.*, 2003).

Skladanie a renaturáciu proteínov zabezpečujú HSP60 a HSP70, po presiahnutí ich kapacity na rad prichádzajú HSP100. Pre solubilizáciu proteínových agregátov, ktorá predchádza renaturácii, ClpB chaperony kooperujú s HSP70 (HSP70, DnaJ a GrpE) (Mogk *et al.*, 1999). Úlohou HSP70 spolu s jeho kochaperonmi je rekrutovať agregovaný substrát k ClpB. Interakcia HSP70 a substrátu so stredovou doménou ClpB zároveň podmieňuje aktiváciu ATPázovej aktivity ClpB a s tým spojené ťahanie polypeptidového reťazca centrálnym pórom ClpB (Lee *et al.*, 2013), ktoré rozmotáva kondenzovanú štruktúru proteínových agregátov. Po odovzdaní substrátu HSP70 disociuje (Mishra a Groover, 2015).

Kontakt a ťahanie substrátu sprostredkujú špirálovo usporiadané konzervované tyrozínové slučky (loops), ktoré počas ATP cyklov konajú koordinované pohyby spôsobom, že päť zo šiestich slučiek v jednej AAA+ doméne vykonáva ťahajúci pohyb nadol (t. j. v smere od AAA+1 k AAA+2) zatiaľ čo jedna prechytáva substrát pred ďalším potiahnutím (obr. 16 D). Na opačnom konci póru postupne vychádza polypeptidový reťazec v rozbalenom stave, z ktorého môže byť obnovený natívny stav (Deville *et al.*, 2017).

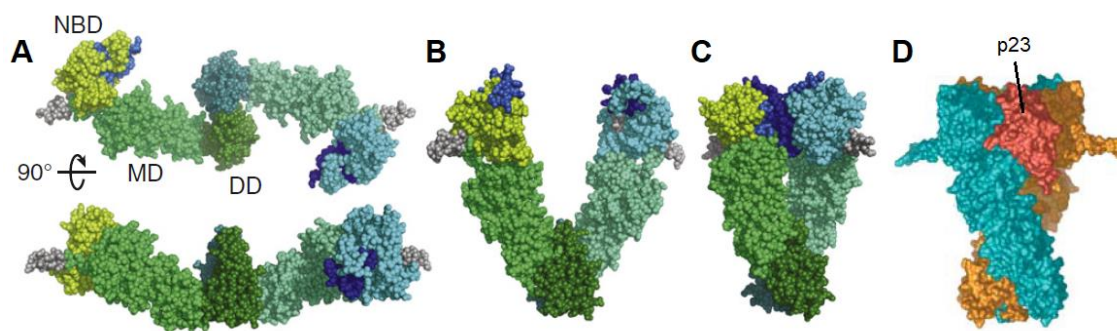
Experimentálne údaje poukazujú na to, že AAA2 je hlavným motorom ClpB (Deville *et al.*, 2017). Energia koordinovanej hydrolýzy ATP naprieč nukleotid viažucimi doménami sa využíva na tvorbu sily, ktorá v každom translokačnom kroku posunie polypeptidový reťazec o 2 aminokyseliny. Za sekundu dokáže prejsť pórom až 500 aminokyselín polypeptidového reťazca (Rizo *et al.*, 2019). Okrem translokovania jediného reťazca pórom bola pozorovaná súčasná translokácia dvoch odlišných častí reťazca jednej molekuly proteínu (Avellaneda *et al.*, 2020).

2.7.10 HSP90

U *Arabidopsis* existuje 7 členov rodiny HSP90, každý z nich sa skladá z vysoko konzervovanej N-koncovej domény viažucej ATP o veľkosti 25 kDa a C-koncovej domény o veľkosti 55 kDa. Obe domény sú spojené peptidovým reťazcom obsahujúcim aminokyseliny nesúce náboj vo vedľajšom reťazci, tzv. „charged linker“ s premenlivou dĺžkou a variabilným zložením. Avšak tento reťazec nie je dôležitý pre funkciu HSP90 (Pearl a Prodromou, 2000). Tvorba proteínových komplexov s inými chaperonmi ako sú HSP70 a kochaperonovými molekulami (Hop, p23) podmieňuje fungovanie HSP90 (obr. 17) (Kirschke et al, 2014).

V porovnaní s ostatnými HSPs vykazujú HSP90 značnú substrátovú špecifitu voči proteínom sprostredkujúcim bunkové signály napr. signálnym kinázam a receptorom steroidných hormónov (Hoter *et al.*, 2018). HSP90 asistuje predovšetkým skladaniu proteínov, ich degradácii, translokácii do cieľového kompartmentu bunky, kontrole bunkového cyklu a signálnej transdukcii (Hoter *et al.*, 2018).

Pri normálnych podmienkach HSP90 sprostredkúva degradáciu HSF1 a udržiava tak jeho nízku hladinu. Degradácii predchádza spolupráca HSP70 a kochaperonu Hop. HSF1 sa primárne viaže s HSP70 a Hop sprostredkúva jeho transfer na HSP90. Pri HS je pre import HSF1 do jadra potrebný cytosolický HSP90 (prípadne ďalšie faktory) a jadrový HSP90 pre jeho degradáciu, ktorú iniciuje represorová doména HSF1, po návrate bunky do normálneho stavu (Röth *et al.*, 2017).



Obr. 17 Štruktúry HSP90 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. A) Dimér HSP90 s označením domén HSP90 u jedného protoméru, nukleotid viažuca doména (NBD, žltá) na N-konci, prostredná doména (MD, bledozelená), dimerizačná doména (tmavozelená), NBD a MD spája reťazec aminokyselín s premenlivou dĺžkou (sivá). B) Konformácia HSP90 s naviazaným ADP. C) Tmavomodré aminokyselinové reziduá sprostredkujú spojenie oboch NBD s naviazaným ATP (prevzaté z Mayer, 2010). D) Kryštalografická štruktúra diméru HSP90 v komplexe s dvomi kochaperonmi p23, pričom druhá molekula kochaperonu p23 je z opačnej strany komplexu (upravené podľa Ali *et al.*, 2006).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Chemikálie

2-(4-carboxyfenyl)-4,5-dihydro-4,4,5,5-tetrametyl-1H-imidazolyl-1-oxy-3-oxid (PTIO; Sigma-Aldrich, USA); 4,5-diaminofluoresceín diacetát (DAF-2 DA; Sigma-Aldrich, USA); 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfát p-toluidinová soľ (BCIP; Duchefa Biochemie, Holandsko); acetón (Lach-ner, Česká republika); akrylamid (Bio-Rad, USA); brómfenolová modrá (Acros Organics, Belgicko); Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB G250; Sigma-Aldrich, Nemecko); dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Česká republika); dimetylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, USA); disodná soľ kyseliny etylendiaminotetraoctovej dihydrát (Na₂-EDTA; Sigma-Aldrich, USA); dithiothreitol (Duchefa, Holandsko); dodecylsírán sodný (SDS; Sigma-Aldrich, Nemecko); Etanol (Lach-Ner, Česká republika); glycerol (Sigma-Aldrich, Nemecko); glycín (Lachema, Česká republika); hovädzí sérový albumín (BSA; Sigma-Aldrich, USA); hydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner, Česká republika); chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika); chlorid vápenatý bezvodý (Penta, Česká republika); kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, USA); kyselina fosforečná (Lach-ner, Česká republika); kyselina fytoová sodná soľ hydrát (Sigma-Aldrich, USA); kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika); kyselina octová ľadová (Lach-ner, Česká republika); kyselina salicylová (SA; Lachema, Česká republika); L-glutamín (Merck, Česká republika); metanol (Lach-ner, Česká republika); N,N'-metylénbisakrylamid (MP Biomedicals, USA); N,N'-tetrametyléndiamín (TEMED; Sigma-Aldrich, Nemecko); n-butanol (Sigma-Aldrich, Nemecko); nitroblue tetrazolium chlorid (NBT; Roth, Nemecko); nitroprussid sodný dihydrát (SNP; Sigma-Aldrich, USA); nízkotučné sušené mlieko (AppliChem, Nemecko); Pefabloc® SC (Sigma-Aldrich, USA); peroxid vodíka (Lach-ner, Česká republika); persírán amónny (APS; Sigma-Aldrich, Nemecko); Ponceau S (Merck, Nemecko); protilátka monoklonálna anti-HSP produkovaná v myši (Sigma-Aldrich, Nemecko); protilátka anti-myšia IgG produkovaná v koze, konjugovaná alkalickou fosfatázou (Sigma-Aldrich, Nemecko); rekombinantný ľudský HSP70 so značkou his-tag (Sigma-Aldrich, USA), tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris; MP Biomedicals, Francúzsko); Tween-20 (Sigma-Aldrich, Nemecko).

3.2 Prístrojové vybavenie

Analytické váhy Denver Summit (Denver Instrument, USA); automatické pipety (Eppendorf, Nemecko); digitálne predvážky (KERN, Nemecko); elektrický zdroj pre elektroforézu a Western blot (Bio-Rad, USA); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); fotoaparát (Sony A330, Čína); chladená centrifúga stolná 5415R (Eppendorf, Nemecko); laminárny box Bioban-48 (Vetrotecnica, Taliansko); magnetická miešačka (IKA, Nemecko); mikroskop (Olympus, Japonsko); mikrotitračné doštičky Test plate 96F (TPP, Švajčiarsko); nitrocelulózoová membrána s pórmí 0,45 µm (Bio-Rad, USA); pH meter WTW 526 (inoLab, Nemecko); spektrofotometer pre mikrodôštičky Epoch 2 (BioTek, USA); trepačka s termostatom ES-20 (Biosan, Lotyšsko); trepačka vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko); vibračný mikrotom, Vibratom (Leica, Nemecko); vybavenie pro tank blotting Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad, USA).

3.3 Rastlinný materiál

Na experimenty sa používali dve modelové rastliny divoký typ arábkovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana*) ekotyp Columbia (Col-0) a divoký typ rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) kultivar Amateur, staré 4 až 7 týždňov.

3.3.1 Pestovanie rastlín

Semená rastlín boli vysiate do zvlhčeného výsevneho substrátu Florcom v hĺbke približne desaťnásobku veľkosti semena pod povrch substrátu v kvetináči. Rastliny boli pestované a pravidelne polievané vo fytotrone pri teplote 25°C a fotoperióde 16/8 h.

3.4 Metódy

3.4.1 Roztoky

Všetky vymenované roztoky v tejto kapitole boli uchovávané v chladničke pokiaľ nie je uvedené inak. Ostatné roztoky použité v experimentoch sa pripravili vždy čerstvé.

3.4.2 Zásobné roztoky pre SDS-PAGE

Extrakčný Tris-HCl pufer pre prípravu vzorky pre SDS-PAGE a Western blot proteínov HSP70 (0,1 mol/l Tris, pH = 7,0).

Tris-HCl pufer do deliaceho gélu (1,5 mol/l Tris, pH = 8,8).

Tris-HCl pufer do zaostrovacieho gélu (0,5 mol/l Tris, pH = 6,8).

Roztok SDS o koncentrácii 10 % (w/v) bol uchovávaný v tme pri laboratórnej teplote.

Roztok AA/BIS (30 % (w/v) akrylamidu a 0,8 % (w/v) N,N'-metylénbisakrylamidu).

3.4.2.1 Príprava elektródového pufru

Zásobný roztok 10x koncentrovaného elektródového tlmivého roztoku o objeme 2 l bol pripravený podľa tab. 1. Navážky 6,05 g Tris, 288,20 g glycínu a 20 g SDS boli rozpustené v 1,5 l deion. vody, skontrolovala sa hodnota pH = 8,3 a doliala sa deion. voda do konečného objemu 2 l.

3.4.2.2 Príprava vzorkovacieho pufru

Zásobný roztok 2x koncentrovaného Laemmliho vzorkovacieho pufru bol pripravený podľa tab. 2. Na prípravu boli využité roztoky: 2,5 ml Tris-HCl pufer do zaostrovacieho gélu, 4 ml 10% (w/v) SDS a 2 ml glycerolu. Po napipetovaní potrebných objemov nakoniec bolo pridaných 310 mg dithiothreitolu a 2 mg brómfenolovej modrej. Hotový roztok bol uchovávaný v tme pri laboratórnej teplote.

Tab. 1 Zloženie 1 litra elektródového pufru pH = 8,3 pre SDS-PAGE.

Zložka	Množstvo [g]	Výsledná koncentrácia	Množstvo [g] pre 10x koncentrovaný roztok
Tris	3,025	0,025 mol/l	3,025
Glycín	14,410	0,192 mol/l	144,100
SDS	1,000	0,100 % (w/v)	10,000

Tab. 2 Zloženie 10 ml 2x koncentrovaného Laemmliho vzorkovacieho pufru, pH = 6,8.

Zložka	Množstvo pre 2x koncentrovaný roztok	Výsledná koncentrácia
Tris	0,151 g	0,125 mol/l
Dithiothreitol	0,310 g	0,200 mol/l
SDS	0,400 g	4,00 % (w/v)
Brómfenolová modrá	0,002 g	0,02 % (w/v)
Glycerol	2 ml	20,00 % (w/v)

3.4.3 Zásobné roztoky pre Western blot

Blotovací pufer (0,025 mol/l Tris, 0,192 mol/l glycín a 20 % (v/v) metanol). Roztok sa pre potreby Western blotu používal opakovane, maximálne štyrikrát.

Farbiaci roztok s Ponceau S (0,2 % (w/v) farbiva Ponceau S a 10 % (v/v) kyseliny octovej). Roztok sa používal opakovane a bol uchovávaný v tme pri laboratórnej teplote.

3.4.3.1 Príprava TBS pufru pre imunodetekciu proteínov

Zásobný TBS pufer pre imunodetekciu proteínov na membráne bol pripravený ako 5x koncentrovaný podľa tab. 3. Navážky 4,84 g Tris a 58,44 g NaCl boli rozpustené v 1,5 l deionizovanej vody, pH bolo upravené HCl na hodnotu 7,5 a roztok bol doplnený deion. vodou na konečný objem 2 l.

3.4.3.2 Príprava farbiaceho roztoku NBT-BCIP

Na prípravu 5 ml zásobného farbiaceho roztoku NBT-BCIP boli rozpustené navážky 94 mg NBT a 47 mg BCIP v roztoku 3,35 ml dimetylsulfoxidu a 1,65 ml deion. vody. Roztok bol uchovávaný v chladničke v nepriehľadnom obale.

Tab. 3 Zloženie 1 litra zásobného TBS pufru pre imunodetekciu proteínov, pH = 7,5.

Zložka	Množstvo [g]	Výsledná koncentrácia [mmol/l]	Množstvo [g] pre 5x koncentrovaný roztok
Tris	2,4428	20	12,114
NaCl	29,2200	500	146,100

3.4.4 Ostatné zásobné roztoky

- Zásobný roztok Bradfordovho činidla (50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 25 ml metanolu, 50 ml 85% kyseliny fosforečnej, doplnené deion. vodou na objem 100 ml).
- Zásobný vodný roztok PTIO o koncentrácii 90 mmol/l, alikvoty zmrazené pri -20°C.
- Tris-HCl pufer pre histochemické experimenty o koncentrácii 10 mmol/l Tris, pH = 7,4.
- Zásobný roztok DAF-2 DA (10 mmol/l Tris-HCl pufer, pH = 7,4 s obsahom DAF-2 DA o koncentrácii 5 mmol/l), alikvoty zmrazené pri -30°C.
- Extrakčný K-fosfátový pufer pre prípravu vzorky na stanovenie aktivity APX (0,1 mol/l K-fosfátový pufer, pH = 7,0 obsahujúci 2 mmol/l Na₂-EDTA).
- Reakčný K-fosfátový pufer pre stanovenie aktivity APX (0,1 mol/l K-fosfátový pufer, pH = 7,0 obsahujúci 0,2 mmol/l Na₂-EDTA).
- Tlmivý roztok TBS pre riedenie zásobného farbiaceho roztoku NBT-BCIP (20 mmol/l Tris a 500 mmol/l NaCl, pH = 9,0).
- Zásobný roztok n-butanolu nasýteného vodou.

3.4.5 Stresovanie listov rastlín

Na experimenty sa využívali iba listy vypestovaných rastlín. V prípade *S. lycopersicum* boli použité posledné tri listy druhej a tretej odnože. V prípade *Arabidopsis* boli použité listy rozety. Listy boli odstrihnuté nožnicami a zľahka položené na dve poskladané vrstvy buničitej vaty v Petriho miskách. Listy boli rozložené vedľa seba tak, aby sa nedotýkali a neprekrývali, pričom v každej Petriho miske boli listy len jedného druhu rastliny. Buničitá vata bola zvlhčená 20 ml deion. vody alebo čerstvo pripravenými roztokmi kyseliny salicylovej (SA, o koncentrácii 0,5 mmol·l⁻¹), donorom oxidu dusnatého (SNP, o koncentrácii 1,0 mmol·l⁻¹) alebo lapačom oxidu dusnatého (PTIO, o koncentrácii 0,1 mmol·l⁻¹).

Pripravené a uzatvorené Petriho misky s listami boli rozdelené do dvoch skupín. Prvá skupina bola stresovaná v termostate teplotou 40°C (teplotný stres, HS) po dobu dvoch a štyroch hodín. Misky druhej skupiny, boli ponechané pri 25°C po dobu dvoch a štyroch hodín. Výnimku predstavovali Petriho misky s deion. vodou, ktoré boli súčasťou len prvej skupiny, týmto sa sledoval samotný dopad HS na listy, bez prídavku iných látok. Ako kontrola boli použité listy, ktoré sa po odstrihnutí z rastliny ihneď zamrazili.

Po uplynutí inkubačnej doby listy z Petriho misiek určené pre analýzu proteínov HSP70 boli uložené do čistej nádoby a zmrazené v mrazničke pri -30°C , kde zostali uložené pre ďalšie spracovanie. Listy určené na meranie enzýmových aktivít boli opatrne zabalené do alobalu, ihneď zmrazené v tekutom dusíku a následne uložené do mrazničky pri -30°C , kde boli skladované pre ďalšie spracovanie. Na histochemické experimenty boli použité čerstvé listy.

3.4.6 Príprava rastlinných vzoriek

Všetky rastlinné extrakty boli pripravené homogenizáciou s tlčíkom a morským pieskom v trecej miske vychladenej v ľadovom kúpeli. Ak nie je uvedené inak extrakty boli vždy centrifugované 10 min. pri 16000 g a 4°C .

3.4.6.1 Príprava rastlinných vzoriek pre SDS-PAGE

Extrakt z listov rastlín určených pre SDS-PAGE proteínov HSP70 bol pripravený extrakciou v pomere 1 : 2 s extrakčným Tris-HCl pufrom. Pripravený extrakt bol scentrifugovaný (10 min. pri 16000 g a 4°C). Supernatant bol prepipetovaný do čistej mikroskúmavky a zmrazený pri -80°C pre neskoršie použitie, alebo sa zmiešal so vzorkovacím pufrom v pomere 1:1 a vložil na 10 min. do termostatu vyhriateho na 80°C . Pripravená vzorka bola ochladená v ľadovom kúpeli a centrifugovaná 5 min pri 16000 g a 4°C . Supernatant bol použitý pre analýzu HSP70 metódou SDS-PAGE a Western blotu.

3.4.6.2 Príprava rastlinných vzoriek pre stanovenie aktivity APX

Extrakt z listov rastlín určených pre stanovenie aktivity askorbátperoxidázy (APX) bol pripravený extrakciou v pomere 1 : 2 s extrakčným K-fosfátovým pufrom, v ktorom bola čerstvo rozpustená kyselina askorbová v množstve 3,50 mg/ml pufru). Pripravený extrakt bol centrifugovaný (10 min. pri 16000 g a 4°C). Supernatant bol prepipetovaný do novej mikroskúmavky a hneď použitý na stanovenie aktivity APX.

3.4.7 SDS-PAGE

Elektromigračná metóda SDS-PAGE v diskontinuálnom prevedení bola použitá na delenie proteínov rastlinných extraktov za účelom detekcie a stanovenia HSP70. Príprave gélov (tab. 4) predchádzalo odmastenie skiel etanolom a ich vloženie do stojana. Pre separáciu boli použité 10% aj 7% deliace gély, obidva o hrúbke 1,5 mm. Pre oba deliace gély bol následne pripravený 4% zaostrovací gél. Roztok 10 % (w/v) persíranu amónneho (APS) sa vždy pripravoval čerstvý.

Tab. 4 Zloženie 10% a 7% deliacich gélov a 4% zaostrovacieho gélu. Objemy sú uvedené v ml na prípravu gélov o hrúbke 1,5 mm v počte 1 ks 10%, 1 ks 7% a 2 ks 4% gélov. Vysvetlenie skratiek: AA/BIS (zásobný roztok 30 % akrylamidu a 0,8 % metylénbisakrylamidu), SDS (10% (w/v) zásobný roztok SDS), TEMED (komerčný N,N'tetrametyléndiamín), APS (10% (w/v) persíran amónny).

Typ gélu	AA/BIS	Tris-HCl pre deliaci	Tris-HCl pre zaostr.	H ₂ O	SDS	TEMED	APS
10% deliaci	3,40	2,50	-	3,80	0,10	0,01	0,07
7% deliaci	2,30	2,50	-	5,10	0,10	0,01	0,07
4% zaostr.	1,30	-	2,50	5,90	0,20	0,02	0,12

Do jamiek pripravených gélov sa napipetovali jednotlivé vzorky o objeme 30 μ l a štandard, rekombinantný ľudský HSP70 so značkou his-tag, pre identifikáciu a kvantifikáciu HSP70 vo vzorkách. Elektroforetická komôrka sa vekom uzatvorila, vložila do chladničky a pripojila ku zdroju jednosmerného elektrického prúdu.

Spočiatku boli proteíny separované 30 min. pri napätí 100 V, následne sa hodnota napätia zvýšila na 200 V.

3.4.8 Western blot

3.4.8.1 Tank blotting

Na prenos proteínov z polyakrylamidového gélu na nitrocelulózovú membránu bol využitý Western blot v prevedení Tank blotting. hodnota prúdu vypočítaná podľa veľkosti plochy membrány (v prípade použitia viacerých membrán sa plocha sčítala), t. j. 0,8 mA/cm². Po troch hodinách blotovania sa otestovala úspešnosť prenosu proteínov na membránu tým, že membrána bola ponorená na pár minút do roztoku farbiva Ponceau S. Po úspešnom prenose sa na membráne objavili bandy separovaných proteínov.

Farbivo Ponceau S sa viaže na proteíny reverzibilne a pred imunodetekciou proteínov na membráne ho treba odstrániť, čo bolo vykonané premývaním membrány za stáleho trepania (50 RPM) trikrát po sebe 25 ml TBS pufru, pH = 7,5.

3.4.8.2 Imunodetekcia proteínov na nitrocelulózovej membráne

Vizualizácia bandov HSP70 bola dosiahnutá inkubovaním membrány s viacerými roztokmi, ako je to ďalej opísané. Na imunodetekciu bol použitý zriedený TBS pufer pripravený riedením 5x koncentrovaného zásobného TBS pufru v pomere 1 : 4. Ak nie je uvedené inak inkubácia prebiehala pri laboratórnej teplote za stáleho trepania 50 RPM a premytie membrány bolo vykonané vždy trikrát po dobu 5 min. TBS pufrom (s

prídavkom detergentu Tween20 v pomere 0,5 ml Tween20 : 1000 ml TBS pufru) o objeme 25 ml za stáleho trepania 50 RPM.

Voľné väzbové miesta membrány boli blokované dvojhodinovou inkubáciou s 25 ml TBS pufru obsahujúceho čerstvo pridané nízkoťučné sušené mlieko o výslednej koncentrácii 5% (w/v). Membrána bola následne premytá.

K membráne bolo napipetovaných 5 ml roztoku primárnej protilátky (monoklonálna anti-HSP produkovaná v myši) riedenej TBS pufrom v pomere 1 : 2500. Membrána s roztokom primárnej protilátky bola inkubovaná cez noc v chladničke za stáleho trepania 50RPM. Nešpecificky naviazaná primárna protilátka bola odstránená premytím membrány. Membrána bola 2 hodiny inkubovaná s 10 ml roztoku sekundárnej protilátky (anti-myšia IgG produkovaná v koze, konjugovaná alkalickou fosfatázou) riedenej TBS pufrom v pomere 1 : 5000. Nešpecificky naviazaná sekundárna protilátka bola odstránená premytím membrány.

Na vizualizáciu bandov sa k premytej membráne pridalo 5 ml farbiaceho roztoku NBT-BCIP, pripraveného riedením zásobného roztoku NBT-BCIP roztokom TBS (s upraveným pH = 9) v pomere 1:49. Membrána sa nechala inkubovať 5 min. následne sa farbiaci roztok vylial a membrána sa premyla, v tomto kroku na premytie bola použitá deion. voda.

Suchá membrána bola odfotografovaná a bandy boli denzitometricky vyhodnotené softwareom ImageJ (verzia 1.51n).

3.4.9 Stanovenie enzýmovej aktivity APX

Aktivita akorbátperoxidázy bola stanovená spektrofotometricky. V princípe sa sledoval úbytok H_2O_2 , ktorý bol redukovaný na vodu za súčasnej oxidácie kyseliny askorbovej. Uvedenú chemickú reakciu katalyzujú enzýmy APX. V časových intervaloch 10 s po dobu 1 min. sa zaznamenával pokles absorbancie pri vlnovej dĺžke 290 nm zodpovedajúcej absorpčnému maximu H_2O_2 .

Do jamky mikrotitračnej doštičky bolo postupne napipetované: 125 μ l reakčného K-fosfátového pufru, 72 μ l 1,75 mmol/l kyselina askorbová, 15 μ l extrakt (v prípade potreby riedený extrakčným K-fosfátovým pufrom bez prídavku kyseliny askorbovej). Reakcia bola spustená prídavkom 38 μ l 0,7 mmol/l H_2O_2 . V prípade blanku bol namiesto extraktu pipetovaný reakčný K-fosfátový pufer.

3.4.10 Stanovenie proteínov Bradfordovou metódou

Obsah proteínov v rastlinných extraktoch bol stanovený spektrofotometricky. Do jamky mikrotitračnej doštičky bolo postupne napipetované: 45 μ l deionizovanej vody, 5 μ l vhodne nariadeného extraktu a nakoniec 200 μ l Bradfordovho činidla pripraveného päťnásobným riedením zásobného Bradfordovho činidla. Zmes sa nechala inkubovať 5 min. pri laboratórnej teplote a následne bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 595 nm.

Obsah proteínov bol kvantifikovaný výpočtom z rovnice lineárnej regresie získanej zmeraním absorbancií kalibračnej rady roztokov hovädzieho sérového albumínu (BSA) v rozsahu koncentrácií 0,1 až 0,7 mg/ml.

3.4.11 Histochemická detekcia oxidu dusnatého

Pre detekciu NO v listoch rastlín bola použitá membránovo permeabilná sonda DAF-2 DA (4,5-diaminofluoresceín diacetát), ktorú bunkové esterázy hydrolyzou premieňajú na formu neprechádzajúcu membránami (DAF-2), ktorá sa v bunke okamžite reaguje s NO čím, sa premieňa na fluoreskujúci produkt triazolofluoresceín (DAF-2T), charakterizovaný absorpčným maximom 495 nm a emisným maximom 515 nm (Zhang *et al.*, 2002).

Štvorcové výrezy (1 x 1 cm) čerstvých stresovaných a kontrolných listov rastlín boli kolmo ponorené do tuhnucej 4% agarózy s teplotou 40 °C. Následne bolo urýchlené tuhnutie vložení nádob s agarózou a listami do misky so studenou vodou. Skalpelom boli vyrezané kocky agarózy obsahujúce listy. Kocka bola upravená do tvaru pyramídy, prilepená na stolček vibračného mikrotomu (vibratomu), ktorým boli zhotovené rezy listov o hrúbke 100 μ m. Z každého listu bolo zhotovených niekoľko rezov (aspoň 6 ks), ktoré sa neskôr rozdelili do dvoch skupín a boli inkubované v rôznych roztokoch vždy o objeme 2 ml.

Na začiatku všetky rezy boli prenesené na 5 min. do Tris-HCl pufru. Časť rezov, jedna skupina, sa potom preniesla na 20 min. do novej dávky roztoku Tris-HCl pufru. Následne tieto rezy boli inkubované 30 min. v roztoku Tris-HCl s obsahom 5 nmol/l DAF-2 DA, nakoniec sa preniesli na 5 min. do Tris-HCl pufru a boli z nich zhotovené mikroskopické preparáty. Druhá časť rezov poslúžila na prípravu negatívnych kontrol takým spôsobom, že 20 min. boli rezy inkubované v roztoku Tris-HCl obsahujúcom lapač oxidu dusnatého, PTIO, o koncentrácii 200 μ mol/l (roztok bol pripravený riedením zásobného roztoku PTIO roztokom Tris-HCl v pomere 1 : 405). Rezy boli následne

inkubované v roztoku Tris-HCl obsahujúcom 200 $\mu\text{mol/l}$ PTIO a 5 nmol/l DAF-2 DA (príprava zmiešaním zásobných roztokov PTIO, DAF-2 DA a Tris-HCl v pomere 1,00 : 2,45 : 1000). Rezy sa nakoniec preniesli na 5 min. do Tris-HCl pufru a vyhotovili sa z nich preparáty.

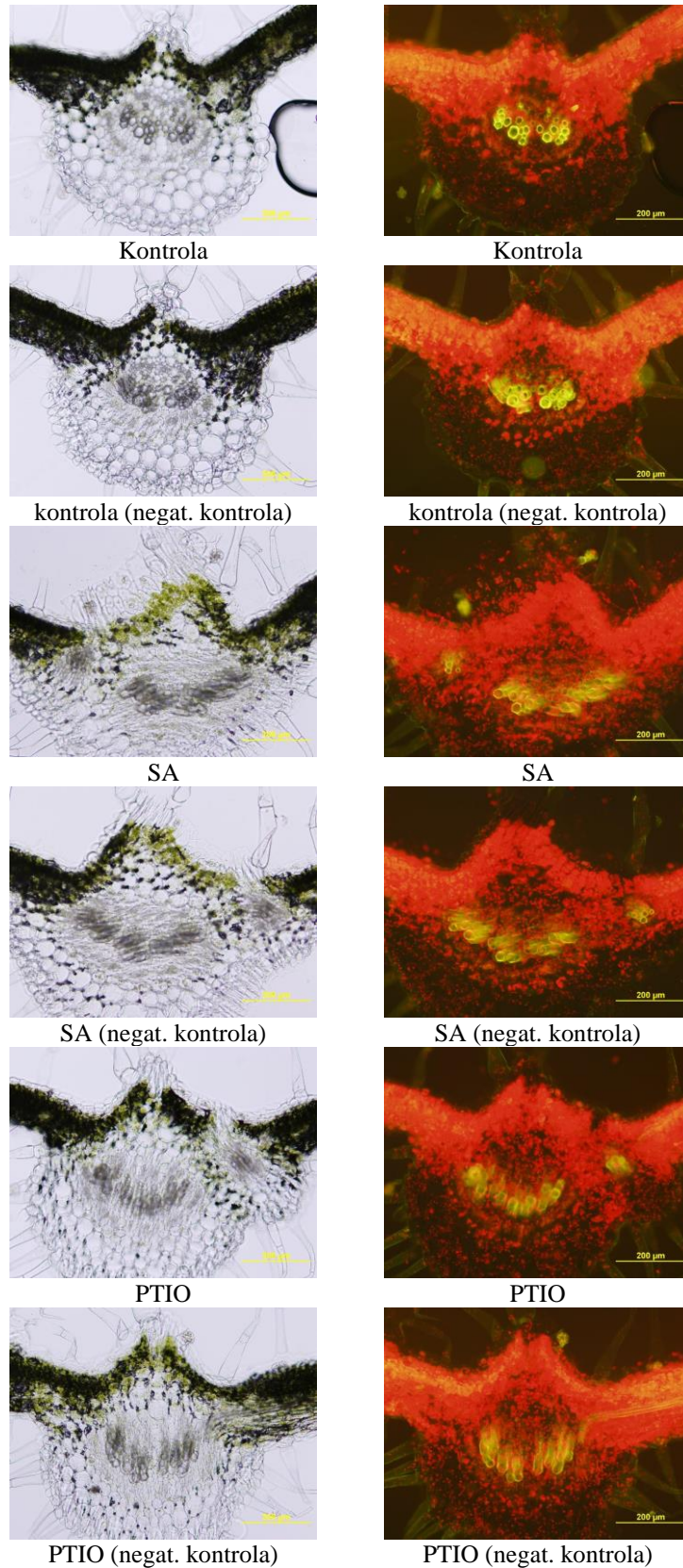
Mikroskopické preparáty boli zhotovené prenesením jedného rezu na podložné sklíčko, prikvapnutím 50% glycerolom a prekrytím krycím sklíčkom. Preparáty boli mikroskopované vo viditeľnej oblasti spektra. Fluorescencia DAF-2T bola pozorovaná s využitím hranolu pre fluorescenciu U-MWB (excitačný filter 450-480 nm, emisný band-pass filter 500 nm). Všetky vzorky boli odfotené digitálnou kamerou DP60, ktorý je súčasťou mikroskopu, a vyhodnotené softwareom ImageJ.

4 VÝSLEDKY

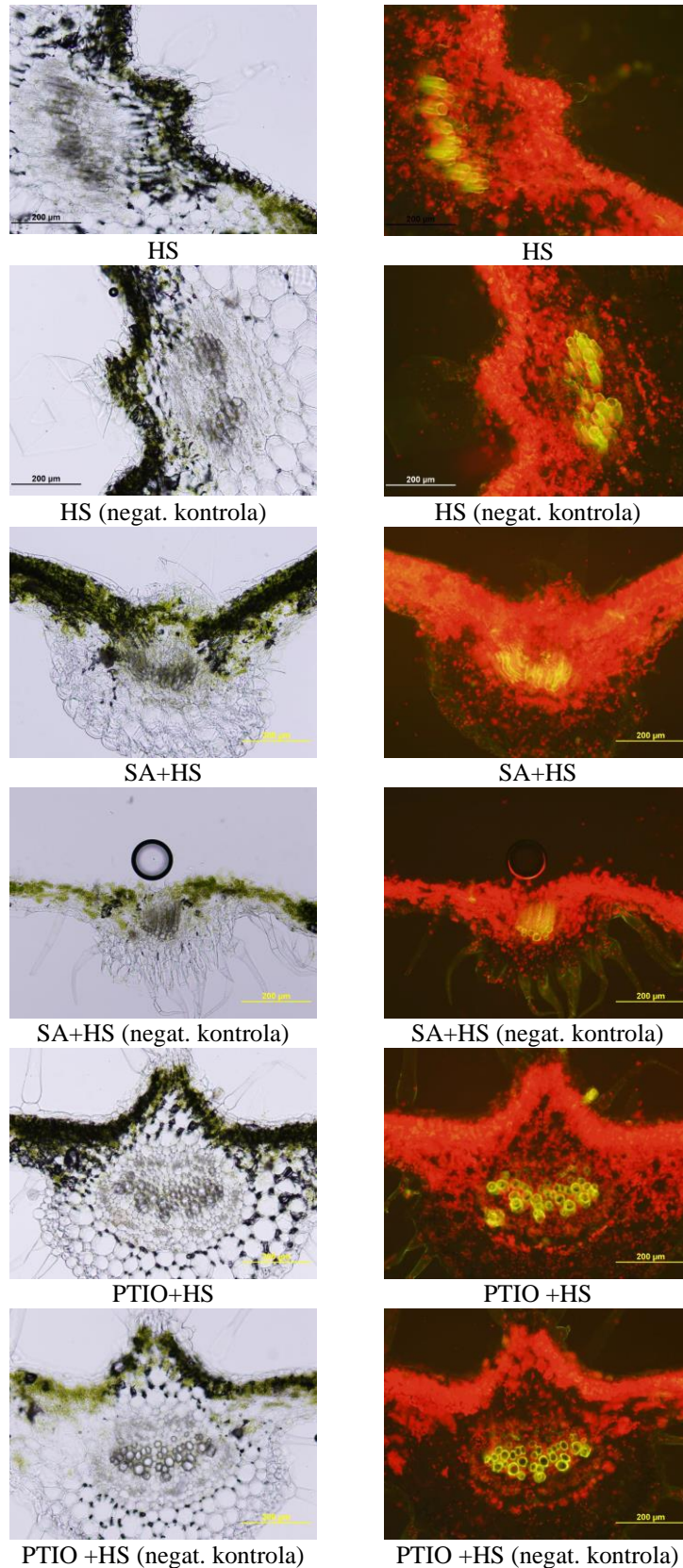
4.1 Histochemická detekcia reaktívnych foriem dusíka

Počas HS dochádza k produkcii NO (Xuan *et al.*, 2010), pričom exogénne aplikovaná SA tiež dokáže vyvolať tvorbu NO (Gould *et al.*, 2003). Donory NO svojimi účinkami sú schopné znižovať oxidačné poškodenie indukované HS (Yang *et al.*, 2011; Siddiqui *et al.*, 2017). Vo vykonaných experimentoch bol sledovaný vplyv HS a vplyv aplikovaných látok (SA a PTIO) na produkciu NO v listoch rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L. kultivar Amateur) a *Arabidopsis* v rámci odpovede na HS. Produkcia NO bola sledovaná prostredníctvom sondy DAF-2 DA, ktorá je pre svoje vlastnosti často používaná v histochemických experimentoch s cieľom detegovať NO v živých bunkách a pletivách. Pre demonštrovanie, že v biologickom materiáli je sondou detegovaný NO sa navyše používa lapač NO (PTIO) na zhotovenie negatívnych kontrol (Vishwakarma *et al.*, 2019). Sonda DAF-2 DA sa vyznačuje schopnosťou prechádzať membránami, následne po hydrolytickom odštiepení acetylových skupín účinkom bunkových esteráz reaguje s NO, resp. s N₂O₃ a poskytuje zelený fluorescenčný signál (Kojima *et al.*, 1998).

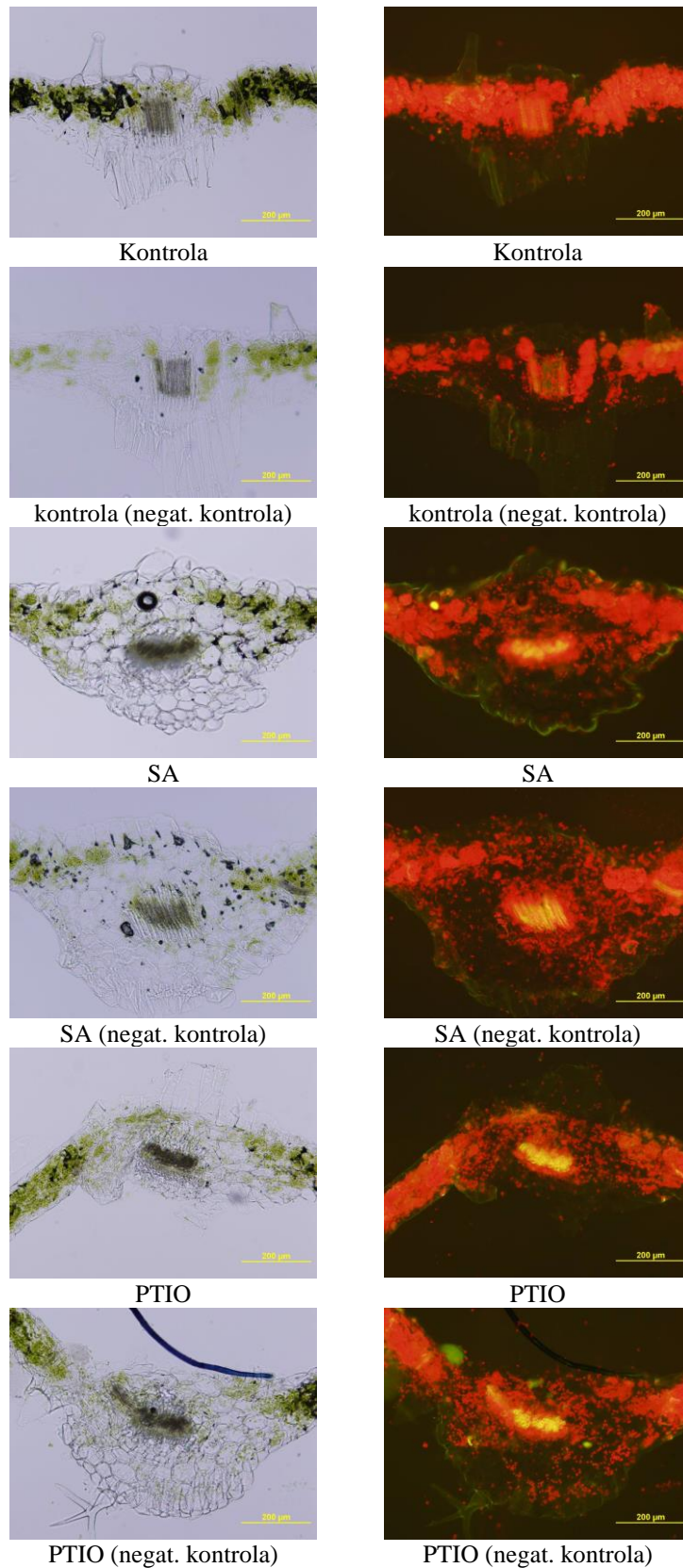
V rezoch listov bol signál sondy najlepšie pozorovateľný v cievnych zväzkoch žilnatiny vedenej stredom listu, ďalej v trichómoch, a bunkách epidermy u rajčiaka (obr. 18 a obr. 19) aj *Arabidopsis* (obr. 20 a obr. 21).



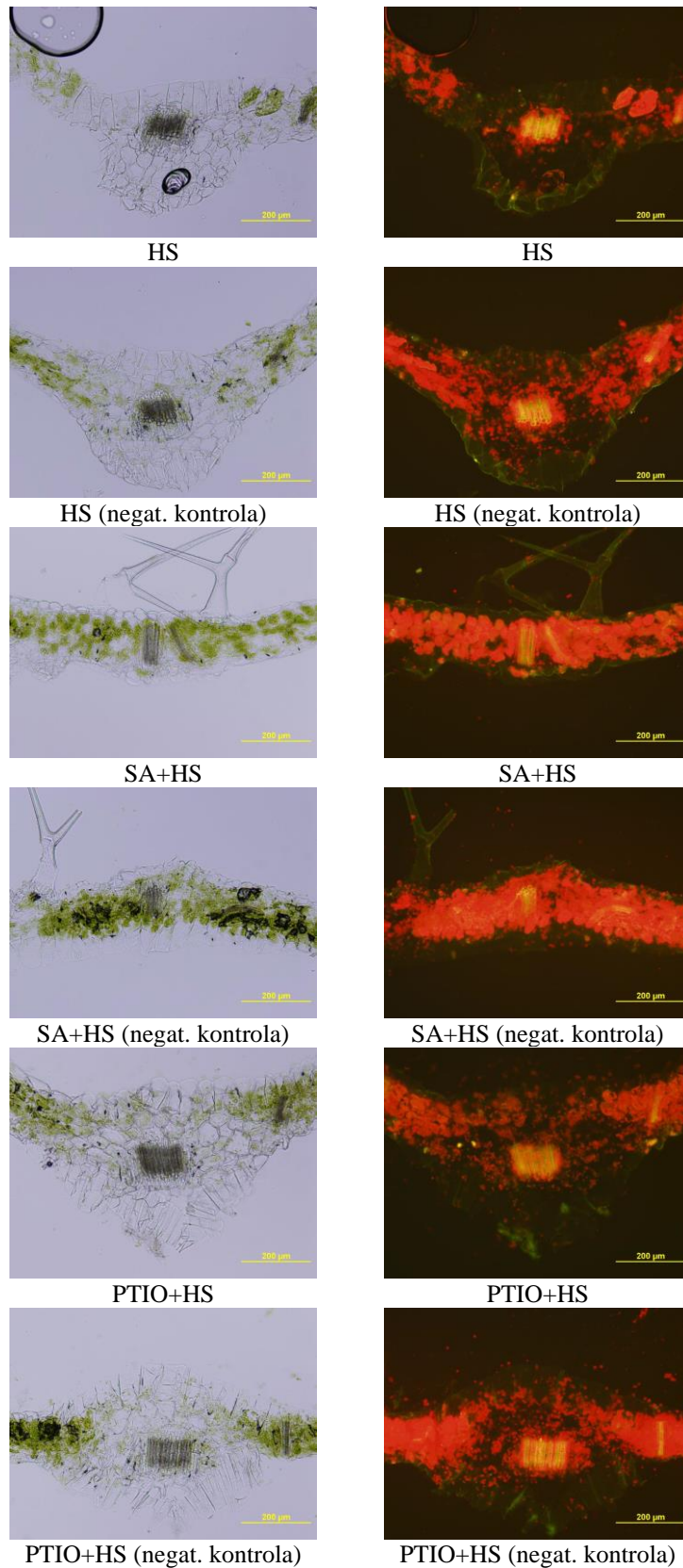
Obr. 18 Histochemická detekcia NO v priečných rezoch listov rajčiaka. Mikroskopia preparátov vo viditeľnom (vľavo) a fluorescenčnom (vpravo) spektre, celkové zväčšenie 100x. Listy boli ošetrené kyselinou salicylovou (SA, 0,5 mmol/l) alebo lapačom NO (PTIO, 0,1 mmol/l) a ponechané pri 25°C po dobu 2 hod. Negatívne kontroly predstavujú priečne rezy totožných listov inkubované s PTIO (0,1 mmol/l).



Obr. 19 Histochemická detekcia NO v priečných rezoch listov rajčiaka. Mikroskopia preparátov vo viditeľnom (vľavo) a fluorescenčnom (vpravo) spektre, celkové zväčšenie 100x. Listy boli ošetrené kyselinou salicylovou (SA, 0,5 mmol/l) alebo lapačom NO (PTIO, 0,1 mmol/l) a/alebo stresované teplotou 40°C (HS) po dobu 2 hod. Negatívne kontroly predstavujú priečne rezy totožných listov inkubované s PTIO (0,1 mmol/l).



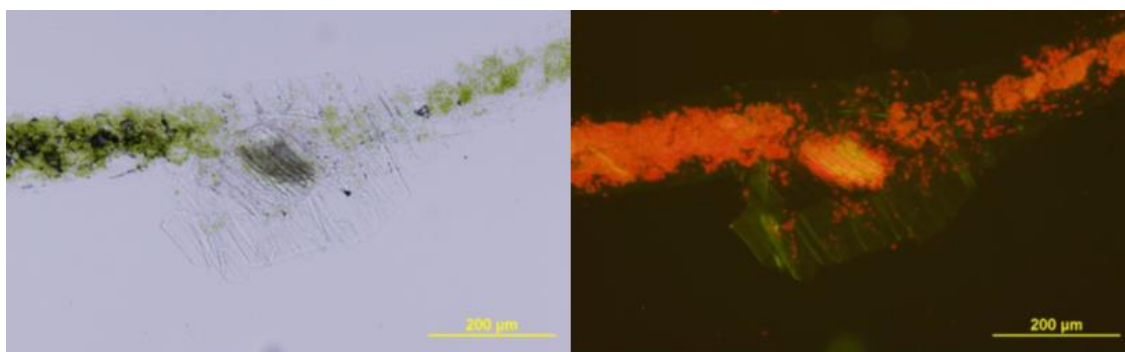
Obr. 20 Histochemická detekcia NO v priečných rezoch listov *Arabidopsis*. Mikroskopia preparátov vo viditeľnom (vľavo) a fluorescenčnom (vpravo) spektre, celkové zväčšenie 100x. Listy boli ošetrené kyselinou salicylovou (SA, 0,5 mmol/l) alebo lapačom NO (PTIO, 0,1 mmol/l) a ponechané pri 25°C po dobu 2 hod. Negatívne kontroly predstavujú priečné rezy totožných listov inkubované s PTIO (0,1 mmol/l).



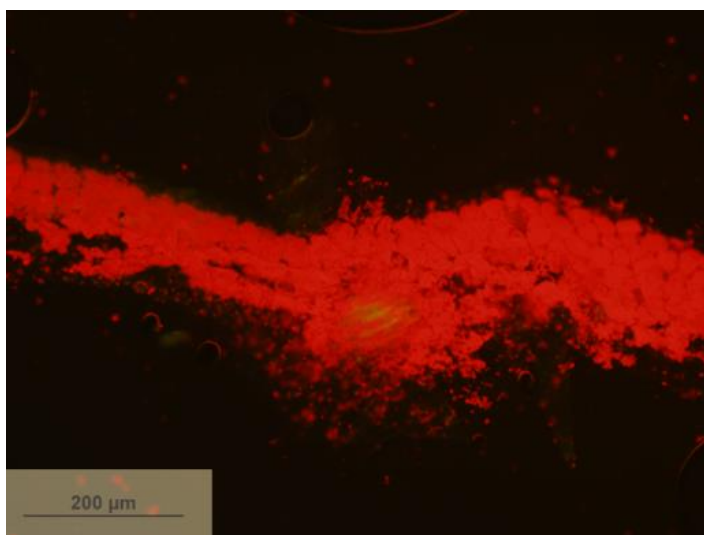
Obr. 21 Histochemická detekcia NO v priečných rezoch listov *Arabidopsis*. Mikroskopia preparátov vo viditeľnom (vľavo) a fluorescenčnom (vpravo) spektre, celkové zväčšenie 100x. Listy boli ošetrované kyselinou salicylovou (SA, 0,5 mmol/l) alebo lapačom NO (PTIO, 0,1 mmol/l) a/alebo stresované teplotou 40°C (HS) po dobu 2 hod. Negatívne kontroly predstavujú priečne rezy totožných listov inkubované s lapačom NO (PTIO, 0,1 mmol/l).

Podľa fotografií uvedených štruktúr u *Arabidopsis* aj rajčiaka je možné usúdiť, že najviac NO sa akumulovalo v bunkách, na rozhraní s vonkajším prostredím (obr. 18 kontrola; obr. 21 HS), u niektorých trichómov rajčiaka a *Arabidopsis* je vidieť výraznejšiu fluorescenciu na povrchu ako vo vnútri (obr. 18 PTIO; obr. 21 SA+HS).

Toto pozorovanie, predovšetkým na fotografii preparátu zachytávajúci rez, ktorý nebol odrezaný priečne v porovnaní s ostatnými rezmi (obr. 22), môže byť čiastočne objasnené skutočnosťou, že vplyvom rezania porušenie celistvosti bunky spôsobí vytečenie obsahu cytoplazmy do vonkajšieho prostredia, zatiaľ čo rigidná bunková stena zostane uchytená k okolitým bunkám, preto je možné predpokladať, že fluorescencia pochádza predovšetkým z okolia bunkových stien, poprípade membrán, ktoré môžu zostať viazané s bunkovou stenou napr. prostredníctvom Hechtových vlákien. V prípade cievnych zväzkov, ktoré v podstate predstavujú duté trubice, je zabezpečený lepší kontakt s roztokom sondy. Okrem toho na obr. 23 je vidieť, že cievne zväzky prirodzene obsahujú látky emitujú zelenú fluorescenciu pri použitej excitačnej vlnovej dĺžke. Tieto látky určitým príspevkom zkrášľujú fluorescenciu sondy.

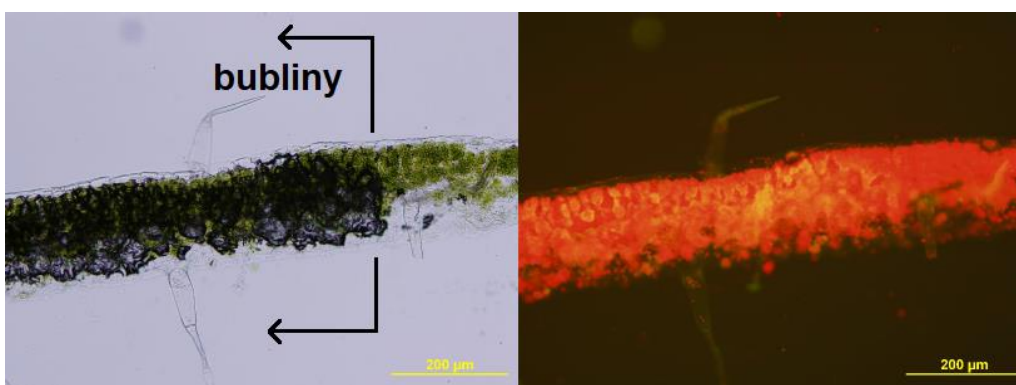


Obr. 22 Histochemická detekcia NO v reze listu *Arabidopsis*. Mikroskopia preparátou vo viditeľnom (vľavo) a fluorescenčnom (vpravo) spektre. Rez nebol odrezaný dostatočne kolmo na povrch listu.



Obr. 23 Fotografia priečného rezu listu rajčiaka vo fluorescenčnom spektre, celkové zväčšenie 100x. Kontrolný list bez inkubácie s roztokmi DAF-2 DA a PTIO zachytáva dominantnú červenú fluorescenciu chlorofylu a v malej miere zelenú fluorescenciu cievnych zväzkov (uprostred). Pozn. fotografia vo viditeľnom spektre nebola vyhotovená.

V bunkách obsahujúcich veľa chloroplastov, resp. chlorofylu, bola detekcia signálu sondy znemožnená z dôvodu, že zmiešaním červeného svetla (fluorescencia chlorofylu pri použitej excitačnej vlnovej dĺžke) a zeleného svetla (fluorescencia sondy) vzniká žlté svetlo. Žltú, žlto-oranžovú až červenú fluorescenciu je možné pozorovať vo vnútornej časti listu, resp. vo všetkých oblastiach tvorených bunkami hubovitého a palisádového parenchýmu (obr. 18, 19, 20, 21). Vyhodnotenie určitým spôsobom ovplyvnili vzduchové bubliny. Ich prítomnosť medzi parenchymatickými bunkami sa prejavila skresľovaním farby signálu z červenej na oranžovo-žltú (obr. 24).

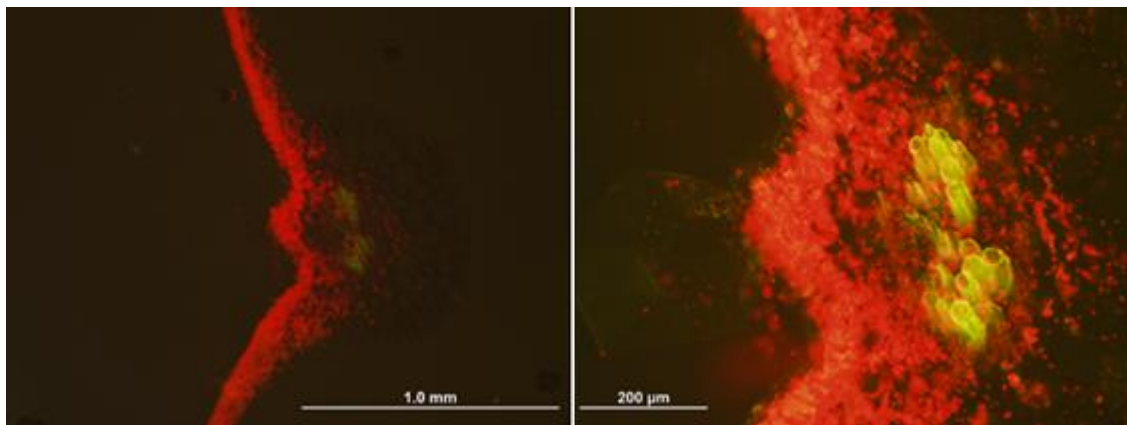


Obr. 24 Histochemická detekcia NO v reze listu rajčiaka. Mikroskopia preparátou vo viditeľnom (vľavo) a fluorescenčnom (vpravo) spektre. Priečný rez čepele listu bosahuje medzi bunkami vzduchové bubliny, ktoré môžu skresľovať fluorescenciu. Vzduchové bubliny na fotografii vo viditeľnom spektre majú sivo-čiernu farbu a prekrývajú zelené parenchymatické bunky. Na fotografii vo fluorescenčnom spektre vplyvom vzduchových bublín sa mení červená farba na oranžovo-žltú.

Vzhľadom na interferenciu farby chlorofylu boli do vyhodnotenia vzaté iba signály z epidermy, signál z trichómov pre ich variabilný počet a umiestnenie bol ignorovaný vrátane signálu zo stredovej žilnatiny, pretože častokrát cievne zväzky neboli odrezané kolmo alebo boli prekryté bunkami obsahujúcimi chlorofyl (obr. 18 – PTIO negat. kontrola). V software ImageJ pomocou funkcie Color Threshold boli z fotografie odstránené oblasti listu sfarbené v odtieňoch červenej a oranžovo-žltej. Následne po odstránení pozadia z okolia rezu funkciou Subtract Background bol denzitometricky vyhodnotený zostatkový signál, predstavujúci hlavne zelenú fluorescenciu sondy.

Histochemická detekcia NO v danom usporiadaní experimentu a uvedenom spôsobe vyhodnotenia dát neposkytla výsledky vhodné na zhodnotenie vplyvu HS a testovaných látok (PTIO a SA) na akumuláciu NO a porovnanie rozdielov v akumulácii NO medzi jednotlivými vzorkami. Navzdory detegovaniu zeleného signálu sondy v listoch oboch rastlín experiment nemožno vyhodnotiť, pretože signál v negatívnych kontrolách (inkubácia rezov s PTIO) bol častokrát vyšší ako vo vzorkách inkubovaných bez PTIO.

Zachytená fluorescencia použitej sondy ale aj chlorofylu s narastajúcim zväčšovaním pozorovaného rezu naberala na intenzite (obr. x25), experimenty však neboli vykonané pri väčšom zväčšení pre nedostatok rastlinného materiálu a z časových dôvodov.



Obr. 25 Histochemická detekcia NO v priečných rezoch listov rajčiaka. Mikroskopia preparátov vo fluorescenčnom spektre, pri celkovom zväčšení 40x (vľavo) a 100x (vpravo).

4.2 Štúdium vplyvu modulácie hladín NO a SA na akumuláciu HSP70 pri teplotnom strese

V rámci odpovede na teplotný stress dochádza k akumulácii HSP, ich akumulácia je esenciálna pre prekonanie HS (Clarke *et al.*, 2004). HSP plnia nezastupiteľnú funkciu pri zdolávaní mnohých biotických a abiotických stresov. Ukázalo sa, že signálne molekuly NO a SA ovplyvňujú expresiu HSP (Wu *et al.*, 2015; Cronjé a Bornman, 1999).

V predloženej kapitole bol skúmaný vplyv modulácie hladín oxidu dusnatého donorom NO (nitroprusid sodný), lapačom NO (PTIO) a kyselinou salicylovou na akumuláciu HSP70 v odpovedi rajčiaka a *Arabidopsis* na HS.

Experimentálne stanovenie HSP70 bolo založené na metódach SDS-PAGE a Western blot. Pričom boli používané dva typy deliacich gélov 10% a 7% polyakrylamidový gél. Separácia v 7% gély umožňuje lepšie rozlíšenie proteínov s príbuznou molekulovou hmotnosťou na základe čoho sa dá očakávať detekcia viacerých izoform HSP70, ak sú v extraktoch prítomné (Piterková *et al.*, 2013).

4.3 Optimalizácia kvantifikácie HSP70 v extraktoch listov rastlín

Separácia proteínov obsiahnutých v extraktoch listov rajčiaka a *Arabidopsis* s využitím SDS-PAGE predchádzala prenosu proteínov na membránu a detekcii HSP70 pomocou primárnej protilátky a sekundárnej protilátky. Nakoniec vizualizované bandy HSP70 boli denzitometricky vyhodnotené a kvantifikované podľa známej koncentrácie štandardu HSP70 človeka. Získané hodnoty boli vyjadrené relatívne vzhľadom na hodnotu kontroly a graficky znázornené.

Stanovenie HSP70 v listoch *Arabidopsis* a rajčiaka sa ukázalo byť problematické z hľadiska spracovania vzorky a vlastností použitej primárnej protilátky. Výsledkami imunodetekcie proteínov boli membrány bez detegovaných bandov, ktoré by zodpovedali molekulovej hmotnosti štandardu HSP70, častokrát nebol detegovaný ani štandard HSP70.

4.3.1 Vplyv zloženia extraktu na stanovenie HSP70

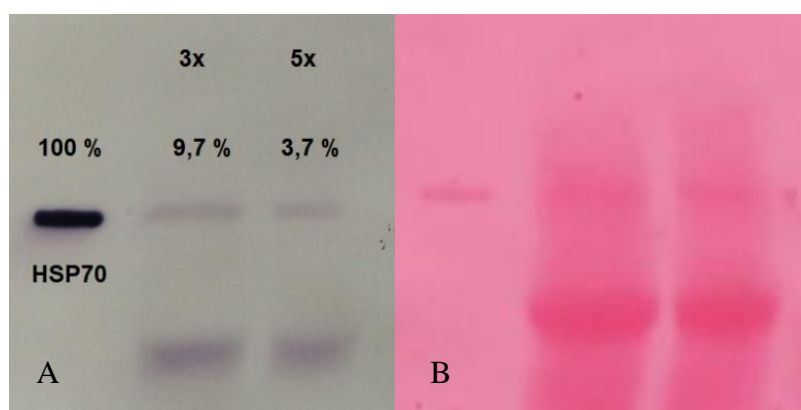
Po vykonaní experimentu podľa pôvodného protokolu (kapitoly 3.4.6.1.; 3.4.7 a 3.4.8) a neúspešnej imunodetekcii HSP70 vzoriek *Arabidopsis* a rajčiaka boli zvyšky extraktov použitých v tomto experimente zamrazené a uschované pri -30°C . Neskôr bola z týchto extraktov lyofilizáciou odstránená voda. Lyofilizát bol následne rozpustený v extrakčnom pufre, aby vznikol 4x koncentrovaný extrakt. Skoncentrovaný extrakt bol následne spracovaný rovnakým spôsobom ako pôvodný extrakt. Napriek tomu táto modifikácia nepriniesla zlepšenie detekcie – žiadne bandy HSP70 naďalej neboli pozorované.

Získané výsledky naznačujú, že množstvo proteínov v extraktoch nemusí byť dôvodom neúspešnej imunodetekcie. Nemožno vylúčiť ani problém s kvalitou protilátky, nakoľko opakovane sa nepodarilo detegovať ani len bandy štandardu HSP70.

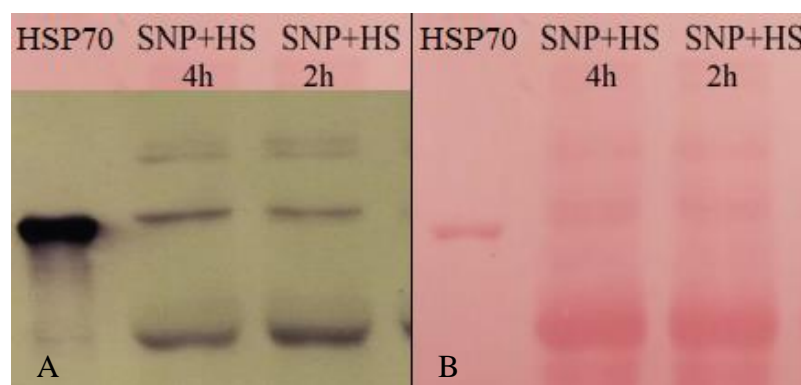
V nasledujúcich experimentoch (vrátane obr. 26) bola použitá novozakúpená primárna protilátka (totožná s predchádzajúcou protilátkou - rovnaká šarža). Extrakty listov

Arabidopsis boli lyofilizované a následne rozpustené v deion. vode tak, aby sa 3x a 5x skoncentrovali. Na fotografii membrán (obr. 26) vidieť, že štandard HSP70 je úspešne detegovaný a intenzívne sfarbený, množstvo HSP70 v extraktoch vzoriek je však nízke.

Primárna protilátka proti HSP70 navyše reagovala s inými proteínmi (cross reaktivita), ktoré sa však nenachádzali v blízkosti HSP70. Tento jav bol pozorovaný vo všetkých vzorkách listov *Arabidopsis*, na obr. 27 sú vybrané dva názorné príklady. Na druhej strane vo vzorkách rajčiny žiadna cross-reaktivita nebol zaznamenaná, protilátka detegovala iba HSP70.



Obr. 26 Detekcia HSP70 z listov *Arabidopsis* stresovaných 4 hod. teplotou 40°C. A) Membrána po imunodetekcii HSP70. B) Totožná membrána po skončení Western blotu zafarbená Ponceau S. Pre detekciu HSP70 bola použitá nová primárna protilátka. Čísla 3x a 5x znamenajú koľkokrát bol skoncentrovaný extrakt listov s využitím lyofilizácie. Pôvodný neskoncentrovaný extrakt nebol podrobený analýze. Čísla v percentách reprezentujú denzitometrické vyhodnotenie bandov HSP70 stresovaných vzoriek vzhľadom na štandard HSP70.



Obr. 27 Detekcia HSP70 a ďalších proteínov z listov *Arabidopsis*. A) Membrána po imunodetekcii HSP70. B) Totožná membrána po skončení Western blotu zafarbená Ponceau S.

4.4 Vplyv zloženia extrakčného pufru a vzorkovacieho pufru na stanovenie HSP70

Z dôvodu, že v predchádzajúcich experimentoch skoncentrovanie obsahu proteínov nepomohlo zlepšiť detekciu bandov HSP70, pristúpilo sa k úprave zloženia vzorkovacieho pufru, extrakčného pufru a pomeru extrakcie. Okrem toho predĺženie inkubácie extraktu so vzorkovacím pufrom (pomer 1 : 1 pri 80°C) na dvojnásobok času prinieslo porovnateľné výsledky.

Pre dosiahnutie účinnejšej extrakcie HSP70 bol pripravený nový extrakčný pufer, ktorý okrem pôvodného Tris-HCl o koncentrácii 0,1 mol/l (pH 7) obsahoval prídavok SDS v množstve 3 % (w/v). Extrakcia v tretej miske bola vykonaná v upravenom pomere 1 : 1 (pomer čerstvej váhy listov a objemu extrakčného pufru).

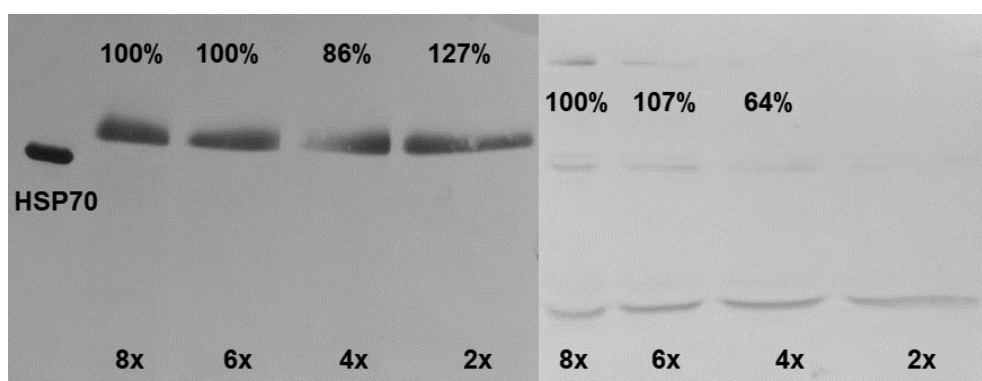
Pri modifikácii zloženia vzorkovacieho pufru sa vychádzalo z doteraz používaného 2x Laemmliho vzorkovacieho pufru (tab. 6). Hlavným dôvodom zmien v zložení bolo zaistiť zlepšenie denaturácie proteínov ich premenou na komplexy proteín-SDS. Súčasne bolo zvýšené aj množstvo redukčného činidla, dithiothreitolu a Tris (tab. 6).

Tab. 5 Zloženie vzorkovacích pufov na prípravu vzoriek pre SDS-PAGE, pH 6,8.

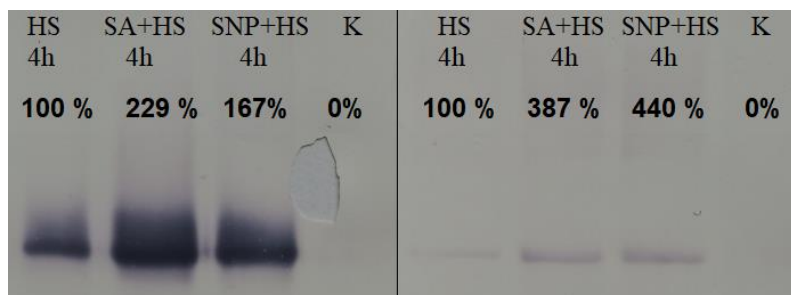
	2x konc. (pôvodný)	4x konc.	6x konc.	8x konc.
Tris-HCl [mol l ⁻¹]	0,125	0,250	0,375	0,500
Dithiothreitol [mol l ⁻¹]	0,200	0,400	0,600	0,800
SDS [%] (w/v)	4	8	12	16
Glycerol [%] (w/v)	20	20	20	20
Brómfenolová modrá [mg]	2	2	2	2

Z rozdielov v stanovení HSP70, po modifikovaní zloženia extrakčného pufru, vzorkovacieho pufru a pomeru extrakcie, ktoré sú vidieť na obr. 28 sa dá usúdiť, že na prípravu vzorky pre SDS-PAGE z extraktov *Arabidopsis* a takisto rajčiaka sú rovnako vhodné 8x a 6x koncentrované vzorkovacie pufrы. S klesajúcou koncentráciou vzorkovacieho pufru sa znižovalo množstvo detegovaných HSP70 na membráne s výnimkou 2x konc. vzorkovacieho pufru, kedy bolo detegované zvýšené množstvo HSP70 u rajčiaka. Dokonca u vzorky kontroly *Arabidopsis* na bandoch rozdelených v 7% géle je vidieť, že v oblasti molekulovej hmotnosti štandardu HSP70 sú detegované dva samostatné bandy.

Zmenami v spôsobe prípravy vzorky pre SDS-PAGE sa značne zvýšilo množstvo detegovaných HSP70, ako je to možné vidieť na vybraných stresovaných vzorkách (obr. 29). Z vizuálneho porovnania bandov HSP70 rajčiaka a *Arabidopsis* je evidentné, že listy rajčiaka obsahujú väčšie množstvo HSP70, aj vzhľadom na to, že v extraktoch listov rajčiaka sa priemerne nachádza asi 3,7x viac proteínov ako v extraktoch listov *Arabidopsis*. Vo vzorkách obsahujúcich priveľa HSP70 nedošlo k dostatočnému zaostreniu bandov, z tohto dôvodu je potrebné v ďalších experimentoch znížiť množstvo vzorky pipetovanej do jamky polyakrylamidového gélu. U kontrol sa nepodarilo detegovať bandy HSP70, jedným z dôvodov mohol byť pomer extrakcie (1 : 1), ďalším že nešlo o rovnaký extrakt aký bol použitý v predchádzajúcom experimente (obr. 28). Vplyv pomeru extrakcie na detekciu bol skúmaný v nasledujúcom experimente.



Obr. 28 Detekcia HSP70 v listoch kontroly rajčiaka (vľavo, 10% gél) a *Arabidopsis* (vpravo, 7% gél). Čísla na spodnej strane obrázka znamenajú koľkokrát koncentrovateľ vzorkovací pufer bol zmiešaný s extraktom (1 : 1) v rámci prípravy vzorky pre SDS-PAGE. Rôzne koncentrované vzorkovacie pufrы sa miešali vždy s totožným extraktom. Čísla v percentách predstavujú denzitometrické vyhodnotenie bandov HSP70 vzoriek - relatívne hodnoty vztiahnuté k hodnote prvej vzorky zľava (8x) – samostatne pre vzorky rajčiaka aj *Arabidopsis*. U *Arabidopsis* boli obidva bandy HSP70 denzitometricky vyhodnotené ako jeden celok.



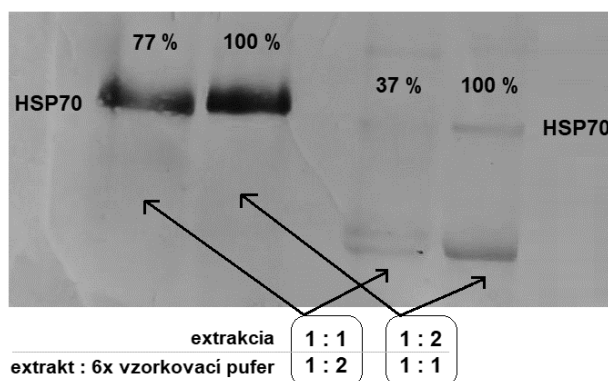
Obr. 29 Detekcia HSP70 v stresovaných listoch rajčiaka (vľavo) a *Arabidopsis* (vpravo) po modifikovaní postupu prípravy vzorky pre SDS-PAGE (použitý 7% gél). Všetky vzorky boli pripravené zmiešaním extraktov (extrakcia v pomere 1 : 1) a 6x koncentrovaného vzorkovacieho pufru v pomere 1 : 2. Čísla v percentách predstavujú denzitometrické vyhodnotenie bandov HSP70 – relatívne hodnoty sú vzťahované k množstvu HSP70 akumulovaného v listoch po 4 hod. HS (HS 4h). Relatívne hodnoty sú vypočítané zvlášť pre HSP70 *Arabidopsis* a HSP70 rajčiaka.

Stanovenie (obr. 29) bolo vykonané bez použitia štandardu HSP70 pre jeho nedostatočné množstvo. Na základe skutočností, že všetky bandy sa nachádzajú na jednej membráne, a že primárna protilátka doteraz vždy detegovala v extraktoch rajčiaka iba HSP70 boli vizualizované bandy rajčiaka stotožnené s HSP70. U vzoriek *Arabidopsis* bandy HSP70 boli identifikované na základe porovnania pozície bandov s detegovanými HSP70 rajčiaka.

4.4.1 Vplyv pomeru extrakcie na stanovenie HSP70

Ďalšou modifikáciou v stanovení HSP70 bol sledovaný vplyv extrakčného pufru obohateného prídavkom SDS na mieru detekcie, pri vykonaní extrakcie v pomere 1 : 1 a 1 : 2. Na prípravu vzorky podrobenej separácii SDS-PAGE bol použitý 6x konc. vzorkovací pufer, ktorý sa miešal s extraktmi listov v pomere 1 : 1 alebo 1 : 2 (obr. 30).

Z denzitometrického vyhodnotenia detegovaných bandov možno usúdiť, že lepší výsledok poskytuje extrakcia v pomere 1 : 2 a následné zmiešanie extraktu so vzorkovacím pufrom v pomere 1 : 1, čo platí pre listy rajčiaka aj *Arabidopsis*.



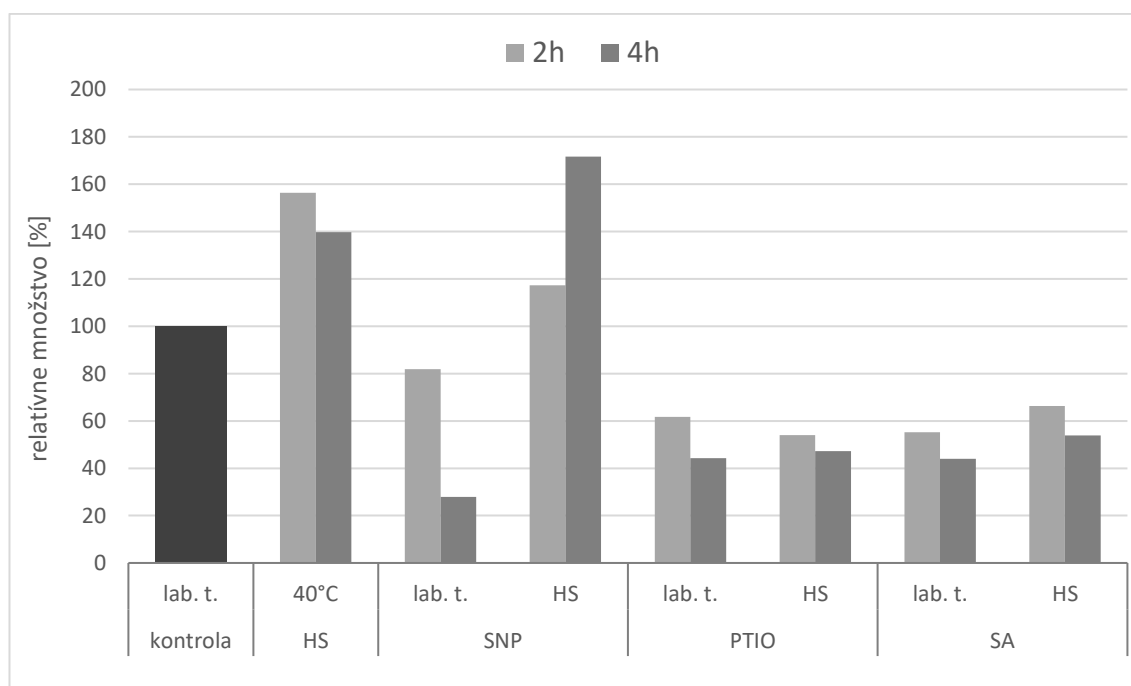
Obr. 30 Detekcia HSP70 v listoch kontroly rajčiaka (2 bandy vľavo) a *Arabidopsis* (2 bandy vpravo) po upravení postupu spočívajúcom v príprave vzorky pre SDS-PAGE (použitý 10% gél). Čísla v percentách predstavujú denzitometrické vyhodnotenie bandov HSP70 – relatívne hodnoty sú vypočítané zvlášť pre HSP70 *Arabidopsis* a HSP70 rajčiaka.

4.5 Analýza hladiny HSP70 v listoch rastlín pri vystavení teplotnému stresu, kyseline salicylovej, donoru NO a lapaču NO

Napriek problémom s detekciou HSP70 sú v tejto kapitole uvedené orientačné výsledky stanovenia HSP70, ktoré boli získané dodržaním pôvodného protokolu (kapitoly 3.4.6.1.; 3.4.7 a 3.4.8). Z časových dôvodov neboli vykonané ďalšie experimenty podľa optimalizovaného protokolu.

Počas HS v listoch *Arabidopsis* (obr. 31) dochádza k akumulácii HSP70. V listoch inkubovaných 2 hod. a 4 hod. pri 40°C sa množstvo HSP70 zvýšilo na 156 % kontroly. Ošetrovanie listov SNP sa prejavilo akumuláciou väčšieho množstva HSP70 po 4 hod. inkubácii pri HS v porovnaní s pôsobením samotného HS – rozdiel činí 32 %. V listoch inkubovaných s SNP pri 25°C množstvo HSP70 s časom klesalo, výraze pod úroveň kontroly, až na 28 % kontroly po 4. hod.

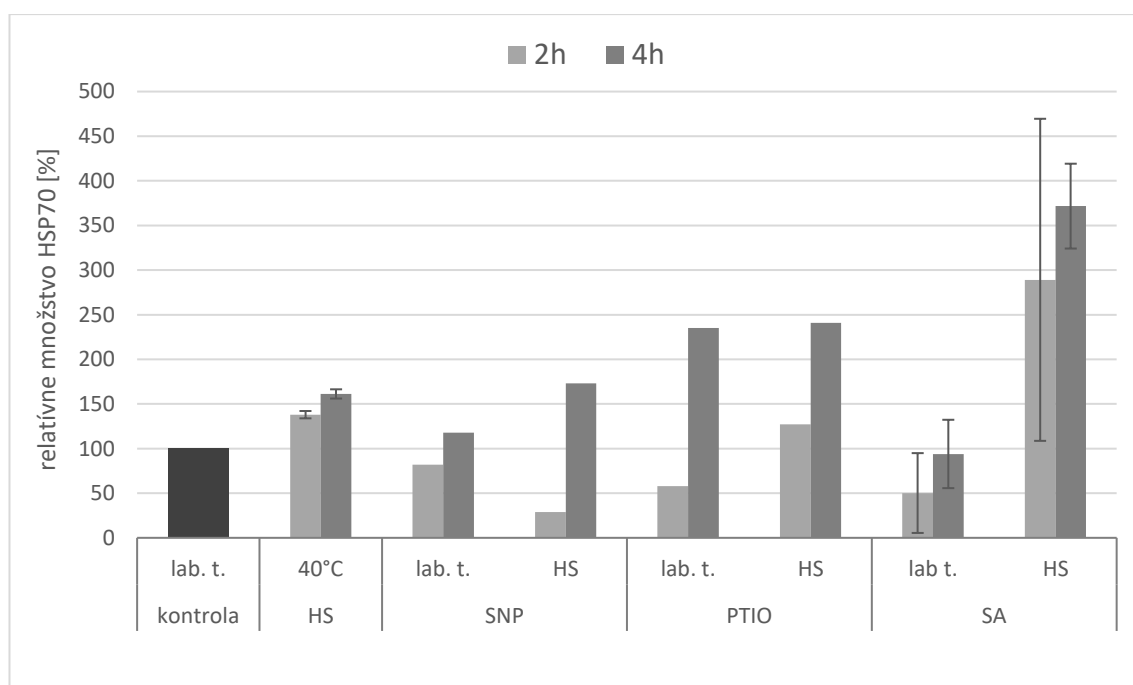
U ostatných listov, t. j. ošetrovaných PTIO a SA vidieť rovnaký trend – pokles množstva HSP70 v čase, nezávisle od teploty. Získané hodnoty sú si podobné a pohybujú sa v okolí polovičnej hodnoty kontroly (v rozmedzí 44 až 66 % kontroly). Tieto hodnoty pochádzajú z vyhodnotenia jedinej membrány.



Obr. 31 Porovnanie hladín HSP70 v listoch *Arabidopsis*. Stanovené hodnoty sú vyjadrené relatívne vzhľadom na hodnotu kontroly. Listy boli ošetrované kyselinou salicylovou (SA, 0,5 mmol/l), donorom NO (SNP, 1mmol/l) alebo lapačom NO (PTIO, 0,1 mmol/l) a stresované teplotou 40°C (HS) alebo ponechané pri 25°C (lab. t.), po dobu 2 a 4 hod. Výsledky reprezentujú jeden nezávislý biologický pokus, každá hodnota bola stanovená v extrakte pripraveného zo všetkých listov rozety troch rastlín *Arabidopsis* starých 7 týždňov.

Výsledky získané pre listy rajčiaka (obr. 32), konkrétne výsledky reprezentujúce priemer dvoch nezávislých pokusov (na obr. 32 majú znázornené chybové usečky) zodpovedajú očakávaniam. V odpovedi na HS sa akumulujú HSP70, zároveň sa množstvo HSP70 zvyšuje s časom postupne na 161 % kontroly v 4. hod. stresovania. Rovnaký trend bol pozorovaný pri aplikovaní SA, ktorá výrazne potencovala akumuláciu HSP70 pri HS.

Inkubácia listov 4 hod. s aplikovaným SNP pri HS iba mierne zvýšila množstvo HSP70 v porovnaní s vplyvom samotného HS na listy (rozdiel priemerných hodnôt činí 12 %), zatiaľ čo za rovnakých podmienok, vplyvom PTIO hladina HSP70 značne vzrástla (približne o 80 %).



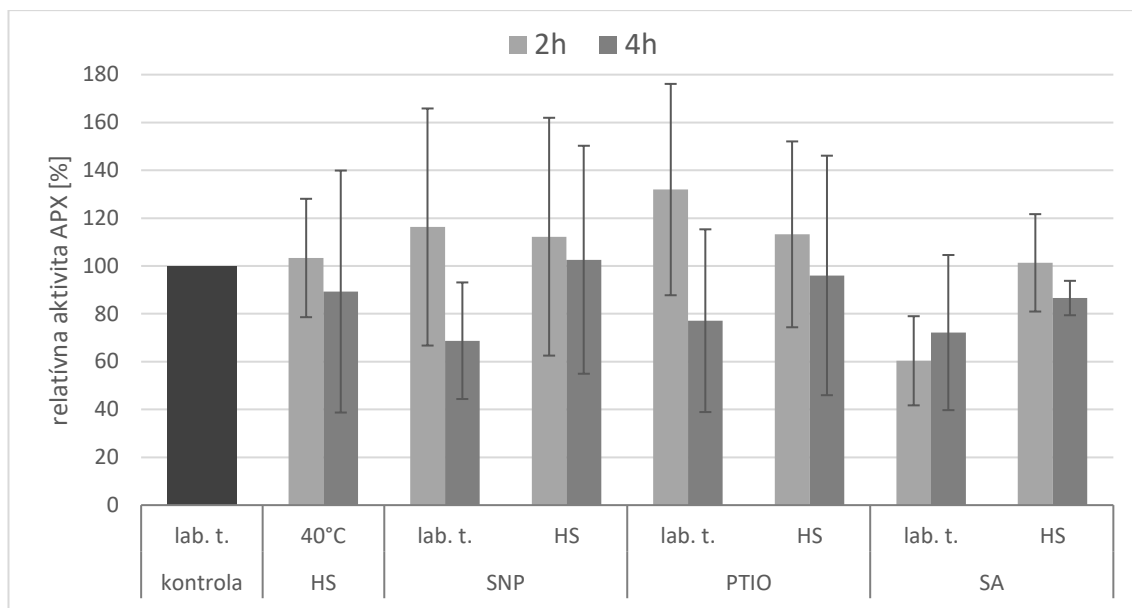
Obr. 32 Porovnanie hladín HSP70 v listoch rajčiaka. Stanovené hodnoty sú vyjadrené relatívne vzhľadom na hodnotu kontroly. Listy boli ošetrené kyselinou salicylovou (SA, 0,5 mmol/l), donorom NO (SNP, 1mmol/l) alebo lapačom NO (PTIO, 0,1 mmol/l) a stresované teplotou 40°C (HS), alebo ponechané pri 25°C (lab. t.), po dobu 2 a 4 hod. Hodnoty označené chybovými úsečkami reprezentujú priemer dvoch nezávislých pokusov (vrátane kontroly), ostatné hodnoty reprezentujú jeden nezávislý biologický pokus. Pre každý pokus bol použitý nový extrakt pripravený z dvoch listov rajčiaka starých 6 týždňov. Chybové úsečky predstavujú hodnoty \pm jedna smerodajná odchýlka.

4.6 Sledovanie zmien aktivity APX v listoch rajčiaka, pri vystavení teplotnému stresu, kyseline salicylovej, donoru NO a lapaču NO

Počas HS dochádza k oxidačnému vzplanutiu – produkcii množstva ROS spomedzi ktorých v rámci HSR plní signálnu funkciu napr. H_2O_2 . Ten je v signálnej dráhe HSR nadradený NO (Wang *et al.*, 2014). Nadmerná produkcia ROS je však cytotoxická a môže byť pre bunku letálna. Okrem akumulácie HSP je dôležité v obranane proti HS znížiť hladinu ROS. Na detoxikácii H_2O_2 sa vo významnej miere podieľa askorbátperoxidáza (APX), ktorej aktivita sa počas HS spravidla zvyšuje (Suzuki *et al.*, 2008). Produkovaný NO spätne inhibuje produkciu ROS a donory NO tento účinok potencujú (Wu *et al.*, 2015). NO dokáže posttranslačne modifikovať cysteíny v proteínoch (S-nitrosylácia), a zvyšovať tak aktivitu APX, čo bolo potvrdené pre APX u *Arabidopsis* (Yang *et al.*, 2015). S-nitrosylovaný Cys32 je konzervovaný u mnohých rastlinných askorbátperoxidáz a prípadná S-nitrosylácia APX rajčaka by sa mohla prejavovať zvýšením aktivity APX v odpovedi na HS.

Z porovnania hodnôt špecifických aktivít APX (obr. 33) v ošetrovaných listoch rajčiaka vyplýva, že aktivita APX sa mierne zvýšila po 2 hod. inkubácie vo všetkých vzorkách ošetrovaných SNP a PTIO, len v prípade inkubácie s SA pri lab. teplote bol zaznamenaný pokles aktivity, až na 60 % hodnoty kontroly. Po vystavení samotných listov HS aktivita APX zostala takmer rovnaká ako u kontroly, a u listov stresovaných zároveň ošetrovaných SA. Súhrnne vzaté na aktivitu APX v stresovaných listoch mali pozitívny vplyv donor NO (SNP) aj lapača NO (PTIO).

Výraznejšie zmeny aktivít APX boli pozorovateľné po 4 hod. inkubácie. Vo všetkých ošetrovaných listoch, okrem jednej výnimky, vidno rovnaký trend - znižovanie aktivity APX v čase. Výnimku predstavujú listy ošetrované SA inkubované pri 25°C, v ktorých aktivita APX vzrástla o 12 %.



Obr. 33 Porovnanie aktivít askorbátperoxidázy (APX) v listoch rajčiaka. Relatívne hodnoty štyroch biologických replikátov, chybové úsečky reprezentujú hodnoty smerodajných odchýlok. Listy boli ošetrené kyselinou salicylovou (0,5 mM-SA), donorom NO (1 mM-SNP) alebo lapačom NO (0,1 mM-PTIO) a stresované teplotou 40°C (HS – teplotný stres) alebo ponechané pri laboratórnej teplote, po dobu 2 a 4 hod.

HS trvajúci 4 hod. spôsobil u samotných listov pokles priemernej aktivity APX o 11 % vzhľadom na kontrolu. V porovnaní s hodnotami získanými po 2 hod. je vidieť, že inkubácia listov s SNP, PTIO a SA pri 25°C vyvolala výraznejší pokles aktivity APX ako efekt samotného stresu – hodnoty sa pohybovali v rozmedzí 60-77 % kontroly. Naopak, aplikácia SNP a PTIO spôsobila miernejší pokles aktivity APX počas stresu, približne na úroveň kontroly. Tieto látky zmiernili negatívny dopad HS na aktivitu APX, vo väčšej miere však SNP (priemerné hodnoty aktivít sa však veľmi nelíšia, vplyvom SNP aktivita APX dosahovala 102 % kontroly a vplyvom PTIO 96 % kontroly).

Počas stresu v listoch ošetrených SA takisto došlo k poklesu aktivity APX. Dosiadnutá hodnota je porovnateľná s výsledkom pôsobenia samotného stresu na listy. Z výsledkov vyplýva, že SA neovplyvnila aktivitu APX v sledovaných interalochoch HS trvajúceho 4 hod.

5 DISKUSIA

5.1 Optimalizácia stanovenia HSP70 v listoch rajčiaka a *Arabidopsis*

Počas optimalizácie sa odhalili nedostatky protokolu spočívajúce predovšetkým v príprave extraktu listov a príprave vzorky pre SDS-PAGE, a to z hľadiska zloženia použitých pufrov. Modifikovanie týchto krokov protokolu sa odzrkadlilo v zlepšení detekcie HSP70, obzvlášť vo vzorkách rajčiaka.

Na začiatku optimalizácie bol pozorovaný vplyv skoncentrovania extraktov na imunodetekciu HSP70. S využitím lyofilizácie boli skoncentrované látky prítomné v extrakte vrátane proteínov. Táto modifikácia však nevedla k zlepšeniu detekcie HSP70 na membráne. Jedným z najdôležitejších kŕokov v analýze je tvorba komplexov proteín-SDS. SDS sa viaže so všetkými proteínmi za vzniku týchto komplexov, ktoré môžu byť separované SDS-PAGE. Zvýšenie množstva proteínov skoncentrovaním extraktu však znamená, že dané množstvo SDS sa viaže so žiadanými proteínmi (HSP70) v menšej miere, čo vysvetľuje detegovanie menšieho množstva HSP70 s narastajúcou koncentráciou proteínov v extraktoch (obr. 26). Skoncentrovanie proteínov v extrakte negatívne ovplyvnilo detekciu HSP70 pri použití rovnakého vzorkovacieho pufru. SDS vo vzorkovacom pufre o koncentrácii 4 % je nedostačujúci pre stanovenie HSP70 v extraktoch listov, ani po zdvojnásobení času inkubácie extraktu so vzorkovacím pufrom.

Ďalším kŕokom optimalizácie bolo modifikovanie zloženia vzorkovacieho pufru a extrakčného pufru. Obohatenie extrakčného pufru o SDS vo výslednej koncentrácii 3 % a trojnásobné zvýšenie množstva SDS a dithiothreitolu vo vzorkovacom pufre (tab. 6) výrazne zlepšilo detekciu HSP70 predovšetkým u rajčiaka (obr. 29). Súčasne sa potvrdila pôvodná príprava extraktov listov - extrakcia v pomere 1 : 2 ako vhodná. Rovnako je vyhovujúca aj inkubácia vzorkovacieho pufru s extraktom v pomere 1 : 1 (obr. 30). Pozorovania, že modifikovanie týchto krokov zdokonalilo detekciu HSP70 je možné vysvetliť na základe vlastností použitých látok. Zvýšenie množstva použitého detergentu SDS podporuje okrem účinnejšej denaturácie proteínov, ich premieňaním na komplexy proteín-SDS, tiež lýzu buniek a lepšie uvoľnenie obsahu cytosolu do extrakčného pufru. Dithiothreitol redukciou disulfidových mostíkov tiež prispieva k denaturácii proteínov. Extrakcia v pomere 1 : 2 zabezpečuje lepšie uvoľnenie bunkových zložiek do extrakčného pufru.

Napriek zoptimalizovaniu protokolu z časových dôvodov neboli vykonané ďalšie naplánované experimenty, t. j. sledovanie vplyvu extrakcie (1 : 2) a zmiešanie extraktu s 6x koncentrovaným vzorkovacím pufrom v pomere 1 : 2 v rámci prípravy vzorky pre SDS-PAGE na stanovenie HSP70 v listoch rajčiaka a *Arabidopsis*. Ďalšími plánovanými experimentmi boli stanovenia HSP70 v listoch rajčiaka a *Arabidopsis* podľa optimalizovaného protokolu v minimálne troch biologických replikátoch a prípadne podľa potreby skoncentrovať proteíny v extraktoch *Arabidopsis* (lyofilizáciou alebo vyzrážaním prídavkom acetónu) a následne pripraviť vzorky pre SDS-PAGE s využitím 6x koncentrovaných vzorkovacích pufrov.

5.2 Vplyv kyseliny salicylovej, donoru NO a lapaču NO na hladiny HSP70 v listoch rastlín vystavených teplotnému stresu

Navzdory získaniu dát z experimentov vykonaných podľa pôvodného protokolu, pre problémy s reprodukovateľnosťou, neschopnosť spoľahlivo zopakovať stanovenia v dostatočnom počte, sú získané dáta nedostatočné pre vyvodenie adekvátnych záverov týkajúcich sa účinkov donoru NO, lapaču NO a SA na akumuláciu HSP70 v odpovedi na teplotný stres.

Nedostatkami v počte stanovení a zdôraznením potreby vykonania nových experimentov sú viaceré pozorovania. Hladina HSP70 v listoch rajčiaka (obr. 32) ošetrovaných SNP počas HS prudko klesla (po 2 h od začiatku HS), a potom prudko stúpla po ďalších 2 h (4 h od začiatku HS), čo je nepravdepodobné vzhľadom na mechanizmus HSR a experimentálne údaje publikované v literatúre (Ohama *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2015), zmeny v akumulácii by sa mali podobáť trendu zaznamenaného u *Arabidopsis* (obr. 31). Vzhľadom na účinok SNP u rajčiaka podobný výsledok vidieť v prípade inkubácie s PTIO pri 25°C. Okrem toho hladina HSP70 v listoch ošetrovaných SNP a stresovaných 4 h je zvýšená ale očakávaný bol väčší nárast vzhľadom na hodnotu kontroly. PTIO pri HS zvyšoval množstvo HSP70 s časom, dosiahnutá hodnota po 4 hod. je výrazne vyššia ako v listoch ošetrovaných SNP za rovnakých podmienok čo nezodpovedá údajom publikovanej literatúry (Wu *et al.*, 2015). Wu a kolektív (2015) sa domnievajú, že PTIO môže ovplyvňovať hladinu HSP reguláciou na úrovni biosyntézy proteínov, preto dokáže potencovať expresiu HSP navzdory tomu, že nezvyšuje mieru väzby HSF na DNA.

Za ďalšie nedostatky jedného stanovenia možno považovať, že akumulácia HSP70 u *Arabidopsis* po 4 hod. HS je nižšia ako po 2 h HS, okrem toho inkubácia s SNP pri lab. teplote viedla k poklesu množstva HSP70.

U listov *Arabidopsis* ošetrovaných PTIO a SA vidieť pokles množstva HSP70 v čase, nezávisle od teploty. Všetky tieto získané hodnoty sú si navzájom podobné a pochádzajú z vyhodnotenia jedinej membrány. Napriek tomu, že všetky výsledky pre *Arabidopsis* (obr. 31) boli získané v rámci toho istého experiment, nemožno vylúčiť chybu v postupe, napr. nezabezpečenie účinného prenosu proteínov na membránu. Uvedené pozorovania nezodpovedajú očakávaniam minimálne u teplom stresovaných listov (Snyman a Cronjé, 2008; Wu *et al.*, 2015). Hodnoty sa navyše nepodobajú výsledkom získaným u rajčiny (obr. 32). Pre získanie spoľahlivých výsledkov je potrebné vykonať nové experimenty.

Opakovane bolo zaznamenané, že vo všetkých extraktov listov *Arabidopsis* sa nachádzajú proteíny, s ktorými sa viažu protilátky, pretože boli detegované viaceré bandy v dráhe separovaných proteínov z nanesených extraktov *Arabidopsis* (obr. 27). Proteín, eventuálne proteíny, ktoré sa nachádzajú pod úrovňou štandardu urazili dlhšiu dráhu, čo svedčí o väčšej elektroforetickej pohyblivosti, na základe ktorej sa dá usúdiť, že molekulová hmotnosť týchto proteínov môže byť menšia ako molekulová hmotnosť veľkej podjednotky RuBisCO. Veľké podjednotky RuBisCO (55 kDa) sú vidieť ako najintenzívnejšie bandy v dolnej časti obr. 27-B. Bandy nad úrovňou štandardu HSP70 prislúchajú proteínom s menšou elektroforetickou pohyblivosťou, a teda väčšou molekulovou hmotnosťou. Nedá sa ale vylúčiť, že bandy nachádzajúce sa pod úrovňou HSP70 sú produkty proteolytického štiepenia HSP70, ani že možné produkty proteolýzy proteínov s vyššou molekulovou hmotnosťou sa nenachádzajú v mieste bandov HSP70. Ďalšie možné vysvetlenie detekcie proteínov nad úrovňou štandardu nie je založené na nešpecifite protilátky, ale na tvorbe dimérov HSP70, prípadne aduktov s inými proteínmi.

Z dostupných výsledkov možno zhrnúť, že v listoch *Arabidopsis* sa nachádza niekoľkonásobne menej HSP70 v porovnaní s listami rajčiaka, a to aj po zohľadnení množstva proteínov. Extrakty *Arabidopsis* obsahovali spravidla 3,7x menej proteínov ako extrakty listov rajčiaka. V obmedzenej miere boli potvrdené účinky donoru NO a SA na akumuláciu HSP uvádzané v publikáciách, na základe čoho sa dá očakávať, že zvýšená akumulácia HSP70 svojimi cytoprotektívnymi účinkami zvyši termotoleranciu rastlín.

Počas optimalizácie stanovenia HSP70 v extratke *Arabidopsis* (obr. 28) na membráne s proteínmi separovanými v 7% géle je vidieť, že v oblasti molekulovej hmotnosti štandardu HSP70 sú detegované dva samostatné bandy, čo naznačuje prítomnosť

minimálne dvoch proteínov patriacich do triedy HSP70, ktoré sa mierne odlišujú svojou molekulovou hmotnosťou. V ďalšom nezávislom biologickom pokuse dva bandy v oblasti molekulovej hmotnosti HSP70 neboli pozorované (obr. 29). Na základe experimentov Piterkovej a kolektívu (2013) bola očakávaná detekcia dvoch bandov (dve izoformy HSP70). U rajčiaka pri HS sa zvyšuje expresia 72 kDa HSP70 (HS indukovaná izoforma) a 75 kDa HSP70 (konštitutívne exprimovaná izoforma, HSC-70) (Piterková *et al.*, 2013). SA výrazne potencovala akumuláciu HSP70 v listoch rajčiaka v odpovedi na HS, čo môže byť vysvetlené tým, že SA indukovala expresiu konštitutívnej aj HS indukovanej izoformy HSP70. K tomuto záveru dospela Formánková (2018) vo svojej diplomovej práci, pri stresovaní rajčiaka (*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom ošetrovaného SA a stresovaného teplom 4 hod.). Na našich membránach ale neboli detegované dve izoformy HSP70 pravdepodobne pre nedokonalé zaostrenie bandov (obr. 28) alebo prítomnosť veľkého množstva HSP70 (obr. 29).

Podľa rozmiestnenia detegovaných bandov HSP70 možno usúdiť, že molekulové hmotnosti HSP70 rajčiaka a *Arabidopsis* sa mierne líšia medzi sebou navzájom, pričom molekulovej hmotnosti štandardu sa viac približuje HSP70 *Arabidopsis*. Ako štandard bol použitý ľudský HSP70 so značkou his-tag, ktorá zvýšila molekulovú hmotnosť tohto proteínu na 70,98 kDa (P0DMV9, uniprot.org, 1.5.2020). Táto hodnota sa blíži molekulovej hmotnosti HSP70 z *Arabidopsis*, ktorý má 71,38 kDa (Tuang *et al.*, 2019). U rajčiaka pri HS sa zvyšuje expresia 72 kDa HSP70 a 75 kDa HSP70 (Piterková *et al.*, 2013), čo vysvetľuje, že v polyakrylamidovom géle boli bandy HSP70 umiestnené kúsok nad úrovňou štandardu (obr. 28).

5.2.1 Účinok NO a SA na akumuláciu HSP70

Donory NO (SNP) spôsobujú, že HSF sa viažu na HSE v sekvencii DNA vo väčšej miere, čo sa prejavilo zvýšenou expresiou a akumulovaním HSP, ako demonštrovali Wang a kolektív (2014) na príklade sHSP. Podobne pozitívny účinok na väzbovú aktivitu HSF vykazuje SA, ako demonštrovali Snyman a Cronjé (2008) na HSP70. Uvedený mechanizmus účinku NO a SA vysvetľuje, prečo boli stanovené vyššie hodnoty HSP70 v listoch ošetrovaných SA a donorom NO (SNP; obr. 31 a obr.32. Signálne Dráhy NO a SA teda môžu byť prepojené, resp. pozorovaný účinok viazania HSF s DNA môže byť primárne vlastnosťou SA, ale keďže NO je nadradený SA (z hľadiska produkcie a akumulácie v čase v odpovedi na HS), dochádza k tomuto efektu aj zvýšením hladiny NO.

Experimentálne bolo dokázané, že exogénna SA zvyšuje túto väzbu v závislosti od koncentrácie čo bolo pozorované u sadeníc rajčiaka a *Arabidopsis* (Snyman a Cronjé, 2008), bunkovej kultúry rajčiaka (Cronjé a Bornman, 1999) a bunkách cicavcov (Fawcett *et al.*, 1997). Vyššie hladiny SA (už 0,5 mM) pôsobia cytotoxicky na bunkovú kultúru rajčiaka, vysoké hladiny 1 mM indukujú expresiu HSP70 aj za nestresových podmienok (Snyman a Cronjé, 2008).

Nízke hladiny SA, ktoré ešte nepôsobia výrazne cytotoxicky (0,1 mM) neindukujú akumuláciu HSP za nestresových podmienok ale počas HS umožňujú výraznejšiu akumuláciu HSP70 (Snyman a Cronjé 2008, Cronjé a Bornman, 1999), SA navyše zvyšuje expresiu HSFA1 za nestresových podmienok aj počas HS u rajčiny (Snyman a Cronjé, 2008). Vzhľadom na to, že HSFA1 sú hlavné regulátory odpovede na HS u rajčiaka a *Arabidopsis* dá sa predpokladať, že nadregulácia HSFA1 sa prejavuje v intenzívnejšej indukcii génov podriadených HSFA1 (napr. HSP a HSF) a zvýšenej odolnosti voči HS (termotolerancie). Navyše zaznamenaná upregulácia HSFA2 v regeneračnej fáze po skončení HS, môže mať pozitívny vplyv nie len na regeneráciu, zároveň sa dá očakávať, že rastlina bude termotolerantnejšia v prípade opakujúceho sa HS z dôvodu, že HSFA2 sa môžu ukladať do tzv. HS garnúl v cytosole, z ktorých sa pri HS pohotovo uvoľnia (Fragkostefanakis *et al.*, 2018).

Arabidopsis obsahuje 5 cytosolárnych HSP70, tri z nich sa konštitutívne exprimujú, pričom všetky cytosolárne HSP70 sú indukované HS, z toho 4 v rámci CPR (Sugio *et al.*, 2009). Exogénne aplikovaná SA okrem ovplyvňovania vlastností HSF, ktoré zabezpečujú CPR, aktivuje tiež dráhy UPR v endoplazmatickom retikule. Nagashima a kolektív (2011) zistili, že u *Arabidopsis* za normálnych podmienok exogénne aplikovaná SA (0,5mM) indukuje gény UPR. aktiváciou dvoch signálnych dráh UPR. SA nadreguluje bZIP60 na proteínovej aj mRNA úrovni a aktivuje IRE1-bZIP60 dráhu nezávisle od NPR1 receptoru pre SA a heat shock faktoru B1 (HSFB1). Aktivácia bZIP28 je taktiež NPR1 independentná a dochádza k nej o 3 hodiny skôr ako k aktivácii bZIP60. Dodatočne indukcia BiP3 kyselinou salicylovou je regulovaná bZIP60 dráhou (Nagashima *et al.*, 2011).

V tretej, u rastlín málo preskúmanej dráhe UPR, vystupuje kináza GCN2, ktorá je aktivovaná exogénne aplikovanou SA (o koncentrácii 0,6 mM; Lageix *et al.*, 2008). Na základe týchto informácií sa dá predpokladať, že SA v odpovedi na HS indukuje kompartment špecifické HSP prostredníctvom troch dráh UPR.

Realtívne prudká akumulácia HSP môže súvisieť s m⁶A modifikáciou mRNA kódujúcich HSP. Táto modifikácia umožňuje expresiu aj pri inhibícii translácie závislej od 7-metylguanozínovej čiapočky, ku ktorej môže dochádzať vplyvom biotických a abiotických stresov v eukaryotických bunkách (Meyer *et al.*, 2015).

5.3 Histochemická detekcia reaktívnych foriem dusíka

Sonda DAF-2 DA sa najčastejšie používa v histochemických experimentoch NO z viacerých dôvodov, pre jej efektivitu, komerčnú dostupnosť a schopnosť detegovať nanomolárne koncentrácie NO (Vishwakarma *et al.*, 2019). Dôležité je uviesť, že z pohľadu mechanizmu sondy, molekula DAF-2 nereaguje priamo s NO ale skôr s N₂O₃ za vzniku fluorescenčného produktu (DAF-2T) (Kojima *et al.*, 1998). DAF-2 nereaguje s NO₂⁻, NO₃⁻, peroxodusitanom (ONOO⁻) ani H₂O₂, Na druhej strane reakcie s monodehydroaskorbátom a askorbátom vedú k vzniku fluorescenčných produktov poskytujúcich porovnateľný fluorescenčný signál ako DAF-2T, čím môže byť skreslené stanovenie v biologických materiáloch (Vishwakarma *et al.*, 2019). Okrem toho vznik produktu DAF-2T závisí na mnohých ďalších faktoroch ako sú prítomnosť anitoxidantov, produkcia superoxidového anión-radikálu, reakcie zahrňujúce kompetíciu medzi NO, superoxidom a ONOO⁻ a ich produktami (Damasceno *et al.*, 2014).

Navzdory publikovaným informáciám (Xuan *et al.*, 2010), že HS indukuje akumuláciu NO v bunkách, získané výsledky to spoľahlivo nepotvrdili. Hodnoty fluorescencie v negatívnych kontrolách boli častokrát vyššie, a preto sa účinky SA a PTIO na produkciu NO nedali medzi sebou porovnať. Vzhľadom na schopnosť PTIO vychytávať NO, intenzita signálu v negatívnych kontrolách mala byť znížená.

Napriek tomu, že HS indukuje akumuláciu NO v bunkách, získané výsledky túto informáciu nepotvrdili pravdepodobne z dôvodu, že zvolená koncentrácia PTIO nebola dostatočne vysoká, alebo vo vhodnom čase aplikovaná vzhľadom na aplikáciu DAF-2 DA. Kapacita PTIO vychytávať NO mohla byť vyčerpaná prídlhou inkubáciou rezov v roztoku vzhľadom na čas pozorovania preparátu pod mikroskopom.

Pre vysvetlenie zaznamenaných hodnôt fluorescenčného signálu v negatívnych kontrolách (rezy listov inkubované s lapačom NO) treba vziať do úvahy okrem mechanizmu účinku PTIO aj chemické deje v bunke, ktoré viedli k pozorovaniu, že použitá koncentrácia PTIO, prípadne samotná látka PTIO a načasovanie jej aplikácie neboli vhodne zvolené pre monitorovanie akumulácie NO vo vzorkách.

Mechanizmus, ktorým PTIO vycytáva NO je založený na redoxnej reakcii, pri ktorej dochádza k oxidácii NO na NO₂ (Gupta a Igamberdiev, 2013). NO môže súčasne vstupovať do ďalších reakcií, napr. s O₂ reaguje za vzniku NO₂. NO₂ reaguje s NO za vzniku N₂O₃, ktorý premieňa sondu na fluorescenčný produkt DAF-2T (Kojima *et al.*, 1998; Damasceno *et al.*, 2014). Vznik DAF-2T závisí od kinetiky produkcie NO a superoxidu (Damasceno *et al.*, 2014). Na základe čoho sa dá predpokladať, že superoxid s NO vytvára ONOO⁻, ktorý reaguje s ďalšími látkami, a tie môžu kompetovať o NO spolu s lapačom NO. V dôsledku kompetície pokles fluorescenčného signálu nemusí byť taký výrazný. Vznikajúci ONOO⁻ rýchlo reaguje s antioxidantmi a CO₂ (Bonini *et al.*, 1999). Reakciou s CO₂ môžu vzniknúť produkty NO₂ a CO₃^{•-} (a tiež NO₃⁻ and CO₂). NO₂ reaguje s NO za vzniku N₂O₃. N₂O₃ zvyšuje fluorescenciu premenou sondy na fluorescenčný produkt.

Vykonané histochemické experimenty neposkytli dáta, z ktorých sa dá zhodnotiť vplyv HS na akumuláciu NO za súčasného ošetrenia SA a PTIO. Na základe obr. 25 voľba objektívov s väčším zväčšením aké boli použité v experimentoch môže priniesť výsledky, z ktorých sa bude dať interpretovať vplyv vybraných látok na akumuláciu NO. Alternatívnym riešením je využitie konfokálnej mikroskopie, ktorá sa často používa pri histochemických experimentoch. Tento typ mikroskopie by umožňoval detekciu NO v bunkách intaktných listov, čím by sa eliminovalo vyvolanie mechanického stresu (rezanie listov) a možné skreslenie výsledkov z dôvodu, že mechanický stres taktiež indukuje tvorbu NO (Huang *et al.*, 2004).

Dá sa predpokladať, že HS vyvolaná akumulácia NO sa v časových intervaloch 2 h. a 4 h. môže líšiť. Vzhľadom na radikálovú povahu NO jeho akumulácia sa časom mohla rýchlo meniť a po 2 hodinách nemusela byť zaznamenaná. Na meranie produkcie NO existuje viacero metód. Molekuly NO vďaka svojim vlastnostiam ľahko prenikajú do vonkajšieho prostredia buniek, takže emisia NO zo stresovaných listov v plynnej fáze môže byť meraná chemiluminiscenčným detektorom (Gupta a Igamberdiev, 2013). SA môže vyvolať tvorbu NO (Zottini *et al.*, 2007) zostáva otáznou v akej miere sa tento účinok prejaví počas HS.

V prípade získania hodnotiteľných výsledkov sa odporúča použiť minimálne jednu ďalšiu sondu detegujúcu NO. Druhou možnosťou je zvolenie alternatívneho spôsobu detekcie NO. Týmto prístupom sa zvýši spoľahlivosť výsledkov. Gupta a Igamberdiev (2013) odporúčajú pri použití fluorescenčnej sondy zvoliť jednu z metód, ktoré detegujú NO v plynnej fáze.

5.3.1 Mechanizmus signalizácie SA a NO pri HS, vzťah SA a NO

Suzuki a kolektív (2008) demonštrovali, že transkripčný koaktivátor AtMBF1c je jedným z hlavných regulátorov termotolerancie u *Arabidopsis*. Počas HS rýchlo dochádza k jeho expresii už po 10 min (Suzuki *et al.*, 2008). V rastlinách existujú homológy AtMBF1c, u pšenice objavený TaMBF1c je takisto dôležitý pre termotoleranciu. V DNA kódujúcej TaMBF1c boli objavené tri HSE, čo naznačuje že na jeho indukciu sa môžu spolupodieľať HSF (Qin *et al.*, 2015). Zistenia Bechtold a kolektívu (2013) naznačujú, že s HSE v promotore AtMBF1c môže interagovať HSFA1b, čo má vplyv na jeho expresiu, okrem toho MBF1c môže byť podradený DREB2A, iné experimenty však naznačujú opak (Qin *et al.*, 2015). Podľa navrhnutého modelu Suzuki a kolektívom (2008), MBF1c predstavuje samostatnú dráhu spustenú HS, dráhu nezávislú od HSF. Z výsledkov Qin a kolektívu (2015) však vyplýva, že nemožno vylúčiť modulovanie hladiny SA prostredníctvom HSF aktivovaných pri HS.

NO dokáže vyvolať akumuláciu SA v nestresovaných bunkách (Huang *et al.*, 2004), čo však v experimentoch (histochemický dôkaz RNS) nebolo pozorované napriek tomu, že v čase 3 hod. od aplikácie exogénnej SA hladina NO výrazne narastá (Huang *et al.*, 2004). Vzťah NO a SA bol podrobnejšie skúmaný v kontexte útoku patogénnych mikroorganizmov. Navrhovaný mechanizmus popisuje nasledovný sled udalostí: donor NO napodobní rýchlu akumuláciu NO (vzplanutie, inak indukované infekciou patogénom). Následne dochádza k redoxným zmenám v bunke. Oxiduje sa glutation, zvýši sa syntéza nového glutationu a dochádza k akumulácii redukovaného GSH. Toto je ďalej nasledované akumuláciou SA, z dôvodu aktivácie ICS1 dependentnej dráhy biosyntézy SA. Následne dochádza k monomerizácii NPR1, jeho transportu do jadra a modulovaní expresie obranných génov (Kovacs *et al.*, 2015). Je možné predpokladať, že s nadreguláciou ICS1 bude sprevádzaná nadregulácia PBS3 a EPS1, ktoré sú v biosyntetickej dráhe SA podriadené ICS1 ako bolo nedávno zistené (Torrens-Spence *et al.*, 2019; Rekhter *et al.*, 2019)

Vzhľadom na skutočnosť, že počas HS dochádza k akumulácii NO (Gould *et al.*, 2003; Xuan *et al.*, 2010), súčasná aplikácia donoru NO by hypoteticky mohla takisto aktivovať popísaný sled udalostí v bunke. Či to dokáže SNP nemožno vylúčiť, keďže ide o donor NO, na druhej strane účinok SNP sa nemusí podobať účinku exogénne aplikovaného GSNO (donor NO), ktorý bol použitý v týchto experimentoch (Kovacs *et al.*, 2015;

Lindermayr *et al.*, 2010) hoci sa dá predpokladať, že zvýšená koncentrácia voľného NO vplyvom SNP, spôsobí nárast GSNO, pretože glutation reaguje s NO (Sami *et al.*, 2018).

Plynný NO a GSNO ako jeho donor spôsobujú akumuláciu NPR1 v jadre podľa mechanizmu uvedeného vyššie (Kovacs *et al.*, 2015; Lindermayr *et al.*, 2010). Receptorom SA je NPR1 a nedávno bolo demonštrované, že tento proteín dokáže v jadre interagovať s HSFA1, čím dochádza k indukcii expresie HS rozpoznívných génov (vrátane HSP, HSF), ktoré v určitej miere udeľujú toleranciu voči stresu nízkou teplotou (Olate *et al.*, 2018). Aj z ďalších dostupných informácií vyplýva (Weigel *et al.*, 2001), že NPR1 neinteraguje výhradne s TGA transkripčnými faktormi, preto nemožno vylúčiť interakciu NPR1 s HSFA1 alebo inými HSF počas HS, kedy dochádza k akumulácii SA a pravdepodobne aj aktivácii NPR1.

Vzhľadom na to, že donory NO dokážu akumulovať NPR1 v jadre, týmto spôsobom by počas HS mohli prispieť k umocneniu expresie niektorých génov zvyšujúcich termotoleranciu (napr. HSP). Pravdepodobná interakcia NPR1 s HSF môže eventuálne vysvetľovať mechanizmus, ktorým prispieva NPR1 k termotolerancii (a pokles termotolerance u rastlín s mutovaným NPR1). NPR1 sa ukázal byť tiež dôležitý v podregulácii expresie ICS1, čo vedie k zníženiu hladiny SA (regulácia negatívnou spätnou väzbou; Zhang *et al.*, 2010). *Arabidopsis* s kockoutovaným NPR1 akumuluje vyššie hladiny SA počas HS (Clarke *et al.*, 2004), nie len v rámci imunitnej odpovede (Zhang *et al.*, 2010). Napriek tomu, že NPR1 je receptorom SA doposiaľ nebolo skúmané či je aktivovaný v rámci regulácie HSR (Rai *et al.*, 2019),

TGA1 transkripčný faktor, s ktorým interaguje NPR1, môže podstúpiť S-nitrosyláciu. Táto posttranslačná modifikácia podmieňuje konformačnú zmenu a efektívnejšiu interakciu NPR1-TGA1 (Lindermayr *et al.*, 2010), či však k tomu dochádza aj počas HS a nie len v odpovedi na biotický stress (Kovacs *et al.*, 2015) je otázne. Hoci počas HS môžu byť v rastlinných bunkách zvýšená hladina celkových S-nitróthiolov (Chaki *et al.*, 2011).

5.4 Modulácia aktivity APX

Askorbátperoxidáza (APX) je enzýmom askorbát-glutationového cyklu, ktorý sa vo veľkej miere podieľa na detoxikácii H₂O₂, čím reguluje jeho škodlivé účinky na bunky a signálnu funkciu (Caverzan *et al.*, 2012).

Vplyvom SNP u stresovaných listov došlo k zvýšeniu aktivity APX, čo súhlasí s informáciami v literatúre (Camejo *et al.*, 2006; Siddiqui *et al.*, 2017) a potvrdzuje

zistenia, že zvýšenie hladiny NO zmierňuje oxidačný stres vyvolaný vysokou teplotou prostredníctvom stimulácie aktivity APX (Song *et al.*, 2006), ktorá tým pádom detoxikuje škodlivý H₂O₂ vo väčšej miere a zvyšuje termotoleranciu rastliny.

Genóm *Arabidopsis* obsahuje 9 génov kódujucich APX, ktoré sa nachádzajú v cytosole a rôznych kompartmentoch bunky (Yang *et al.*, 2015). Významný nárast v expresii vplyvom HS bol zaznamenaný pre cytosolickú izoformu APX1 (Panchuk *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2008), pretože obsahuje funkčný HSE v poromotore (Storozhenko *et al.*, 1998). U rajčiaka existuje 7 izoform (Najami *et al.*, 2008), z toho expresia APX1 je najviac nadregulovaná vplyvom HS, v menšej miere tiež APX2 (Yu *et al.*, 2019). Expresia APX2 *Arabidopsis* na úrovni mRNA vplyvom HS 40°C s časom narastá po 1. a 2. hodine HS je rozdiel malý ale po 4h sa expresia zdvojnásobuje a po 6. h sa strojnásobuje (Wang *et al.*, 2020). Navzdory očakávanému nárastu aktivity APX u rajčiaka (Camejo *et al.*, 2006, Formánková, 2018) bol nameraný pokes po 4. hod. HS.

HS zvyšuje expresiu APX, a to z väčšej časti prostredníctvom heat-shock faktorov AtHSF2A (Schramm *et al.*, 2006), ktoré sú aktivované v rámci dráhy HSR (Suzuki *et al.*, 2008). Dá sa predpokladať, že pri HS narastajúca hladina NO u rajčiaka zvýši aktivitu APX S-nitrosyláciou, ako to bolo pozorované pri oxidačnom strese u *Arabidopsis* (Yang *et al.*, (2015). Yang a kolektív (2015) sa domnievajú, že u rastlín môže ísť o konzervovaný mechanizmus vzhľadom na to, že Cys32 u APX je konzerovaný (platí aj pre *S. lycopersicum*) a S -nitrosylácia bol tiež dokázaná aj u hrachu (Begara-Morales *et al.*, 2014). Okrem toho NO nemá pozitívny vplyv len na APX ale aj ďalšie antioxidantné enzýmy (superoxiddizmutáza, glutathionreduktáza). Zvýšenie aktivity ROS detoxikačných enzýmov sa odzrkadlilo tiež poklesom množstva malondialdehydu - markeru oxidačného stresu (Siddiqui *et al.*, 2017). NO stimuluje tvorbu karotenoidov (Yang *et al.*, 2011), ktoré sa vzhľadom na ich lipofilnú povahu akumulujú v membránach, z tohto sa dá predpokladať, že karotenoidy pre svoje antioxidantné účinky prispievajú k zníženiu peroxidácie membránových lipidov (vátane fotooxidácie chlorofylu; Camejo *et al.*, 2006).

SA zvyšuje hladinu NO (Zottini *et al.*, 2007), SA by pravdepodobne mohla v určitej miere podporovať antioxidantné účinky NO, zvyšovaním jeho hladiny počas HS. Tuto hypotéza môže podporuje pozorovanie, že inkubácia listov s SA počas HS neznížila aktivitu APX ako v prípade inkubácie pri laboratórnej teplote.

			32		49				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	11	DYKKA	VEK	CRR	KL	RGLIAEKNCAPIMVRLAWHSAGTFDCQSR	TGGPFGTM	60	
<i>Brassica juncea</i>	11	EYQKA	TEK	CKR	KL	RGLIAEKNCAPIMVRLAWHSAGTFDCASRTG	VPPFGTM	60	
<i>Solanum lycopersicum</i>	11	EYLKA	VDK	CKR	KL	RGLIAEKNCAPIMVRLAWHSAGTYDVC	SKTGGPFGTM	60	
<i>Nicotiana tabacum</i>	11	EYLKA	VDK	CKR	KL	RGLIAEKNCAPIMVRLAWHSAGTYDVC	SKTGGPFGTM	60	
<i>Glycine max</i>	11	DYQKA	VEK	KAK	K	LRGFI	AEKRCAPIMVRLAWHSAGTYDVSSKTGGPFGTI	60	
<i>Pisum sativa</i>	11	DYQKA	TEK	KAK	R	LRGFI	AEKRCAPILIRLAWHSAGTFDSKTGTGGPFGTI	60	
<i>Oryza sativa</i>	10	EYLA	AVG	KAK	R	KL	RGLIAEKNCAPIMVRLAWHSAGTFDVS	SRTGGPFGTM	59
<i>Zea mays</i>	11	EYKKA	IDK	AKR	K	L	RGLIAEKNCAPIMVRLAWHSAGTYDVT	TKTGGPFGTM	60
<i>Galdieria partita</i>	7	DLEQK	V				RSRLVKLFEQTECPIMVRLAWHDAGTYDAQTGTGGVNGSI	53	

Obr. 34 Primárne štruktúry proteínov askorbátperoxidáz z rôznych druhov rastlín ukazujú, že pozícia cysteínu (Cys32) je konzervovaná a u niektorých rastlín bola potvrdená jej posttranslačná modifikácia S-nitrosyláciou (prevzaté z Yang *et al.*, 2015).

Camejo a kolektív (2006) porovnali aktivitu dvoch rajčiaka *S. lycopersicum* var Amalia a termotolerantnejšieho kultivaru Nagcarlang, pričom aktivita APX u druhého uvedeného sa zvýšila menej ako u Amalia a súčasne aktivita CAT bola vyššia u Nagcarlang, zatiaľ čo u Amalia zostala porovnaná s kontrolou. Navzdory zaznamenanému zvýšeniu aktivity APX nemusí byť termotolerancia rastliny zvýšená a je možné očakávať oxidačné poškodenie, ktoré bolo u Amalia vyššie (Camejo *et al.*, 2006).

Prekvapivo lapač NO neznižil aktivitu APX. Zvolená koncentrácia PTIO nemusela byť dostatočná na ovplyvnenie signálnej funkcie NO.

Aplikácia 0,1 mM-SA nemala účinok na aktivitu APX (Dat *et al.*, 1998), čo platí aj pre namerané hodnotami pri použití 0,5 mM-SA počas stresovania teplotou 40°C. Ale použitá 0,5 mM-SA spôsobila pokles aktivity APX v listoch inkubovaných pri lab. teplote (pokles zaznamenala aj Formánková, 2018). Okrem toho SA dokáže inhibovať aktivitu CAT (Sanchez-Casas a Klessig, 1994).

Pri zvážení účinku SA na väzbu HSF na HSE v DNA by sa dalo očakávať, že expresia a aktivita APX sa zvýši, pretože APX obsahuje v poromotore HSE (Storozhenko *et al.*, 1998), čo ale nebolo pozorované. Vysvetlenie môže spočívať v tom, že SA funguje ako redukujúci substrát APX, ktorý je schopný poskytnúť jeden elektrón do reakčného cyklu katalyzovaného APX, pričom elektrónakceptorné vlastnosti karboxylovej skupiny SA spomaľujú túto reakciu (Kvaratskhelia *et al.*, 1997).

Z experimentálne získaných výsledkov vyplýva, že SA na rozdiel od SNP nemá pozitívny a ani negatívny vplyv na aktivitu APX počas HS.

6 ZÁVER

Diplomová práca vo svojej teoretickej časti zhŕňa prehľad aktuálnych poznatkov o rastlinných odpovediach a obrane proti teplotnému stresu. Pozornosť je venovaná významu signálnych dráh oxidu dusnatého a kyseliny salicylovej. V experimentálnej časti diplomovej práce bola optimalizovaná metóda stanovenia HSP70. Ďalej bol skúmaný vplyv nitroprussidu sodného ako donoru NO, lapača NO (PTIO) a kyseliny salicylovej na akumuláciu HSP70, aktivitu askorbátperoxidázy a hladiny reaktívnych foriem dusíka so zameraním na NO.

Z výsledkov experimentálnej časti diplomovej práce sa dá usúdiť, že:

- teplotný stres indukuje expresiu HSP70 v listoch rajčiaka a *Arabidopsis*
- kyselina salicylová a nitroprussid sodný potencujú expresiu HSP70 v listoch rajčiaka a *Arabidopsis* v odpovedi na teplotný stres
- účinok kyseliny salicylovej zvyšuje expresiu HSP70 viac ako účinok nitroprussidu sodného v odpovedi rajčiaka a *Arabidopsis* na teplotný stres
- NO zvyšuje aktivitu askorbátperoxidázy v listoch rajčiak počas teplotného stresu
- kyselina salicylová nemá vplyv na aktivitu askorbátperoxidázy v listoch rajčiaka počas teplotného stresu

Účinkom kyseliny salicylovej, lapaču NO počas HS dochádza k zmenám v hladinách NO. Na exaktné vyhodnotenie týchto zmien bude treba použiť alternatívny metodický postup, ideálne kombináciu dvoch prístupov napr. konfokálnu mikroskopiu doplnenú detekciou NO v plynnej fáze.

Medzi rastlinnými hormónmi a rastovými regulátormi existujú komplexné vzťahy. Výsledky predloženej práce poukazujú na významnú úlohu NO v interakcii so signálnymi dráhami kyseliny salicylovej pri teplotnom strese u rastlín. Výsledné efekty modulácie hladín NO a kyseliny salicylovej sa môžu výrazne líšiť u rôznych druhov rastlín.

7 LITERATURA

- Afrin, T., Diwan, D., Sahawneh, K., Pajerowska-Mukhtar, K., & Mittler, R. (2020). Multilevel regulation of endoplasmic reticulum stress responses in plants: where old roads and new paths meet [Online]. *Journal Of Experimental Botany*, 71(5), 1659-1667. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz487>
- Agarwal, M., Sahi, C., Katiyar-Agarwal, S., Agarwal, S., Young, T., Gallie, D. R., et al. (2010) [Online]. *Plant Molecular Biology*, 51(4), 543-553. <https://doi.org/10.1023/A:1022324920316>
- Alcázar, R., & Parker, J. E. (2011). The impact of temperature on balancing immune responsiveness and growth in Arabidopsis [Online]. *Trends In Plant Science*, 16(12), 666-675. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.09.001>
- Alderson, T. R., Kim, J. H., & Markley, J. L. (2016). Dynamical Structures of Hsp70 and Hsp70-Hsp40 Complexes [Online]. *Structure*, 24(7), 1014-1030. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.05.011>
- Ali, M. M. U., Roe, S. M., Vaughan, C. K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P. W., et al. (2006). Crystal structure of an Hsp90–nucleotide–p23/Sba1 closed chaperone complex [Online]. *Nature*, 440(7087), 1013-1017. <https://doi.org/10.1038/nature04716>
- Amm, I., Sommer, T., & Wolf, D. H. (2014). Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin–proteasome system [Online]. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research*, 1843(1), 182-196. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.031>
- Andrási, N., Rigó, G., Zsigmond, L., Pérez-Salamó, I., Papdi, C., Klement, E., et al. (2019). The mitogen-activated protein kinase 4-phosphorylated heat shock factor A4A regulates responses to combined salt and heat stresses [Online]. *Journal Of Experimental Botany*, 70(18), 4903-4918. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz217>
- Assenza, S., Sassi, A. S., Kellner, R., Schuler, B., De Los Rios, P., & Barducci, A. (2019). Efficient conversion of chemical energy into mechanical work by Hsp70 chaperones [Online]. *Elife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.48491>
- Astier, J., Gross, I., & Durner, J. (2018). Nitric oxide production in plants: an update [Online]. *Journal Of Experimental Botany*, 69(14), 3401-3411. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx420>
- Avellaneda, M. J., Franke, K. B., Sunderlikova, V., Bukau, B., Mogk, A., & Tans, S. J. (2020). Processive extrusion of polypeptide loops by a Hsp100 disaggregase [Online]. *Nature*, 578(7794), 317-320. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1964-y>
- Balogh, G., Péter, M., Glatz, A., Gombos, I., Török, Z., Horváth, I., et al. (2013). Key role of lipids in heat stress management [Online]. *Febs Letters*, 587(13), 1970-1980. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.016>
- Baniwal, S. K., Chan, K. Y., Scharf, K. -D., & Nover, L. (2006). Role of Heat Stress Transcription Factor HsfA5 as Specific Repressor of HsfA4 [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 282(6), 3605-3613. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609545200>
- Baniwal, S. K., Chan, K. Y., Scharf, K. -D., & Nover, L. (2006). Role of Heat Stress Transcription Factor HsfA5 as Specific Repressor of HsfA4 [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 282(6), 3605-3613. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609545200>
- Bartesaghi, S., & Radi, R. (2018). Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration [Online]. *Redox Biology*, 14, 618-625. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.009>
- Bechtold, U., Albihlal, W. S., Lawson, T., Fryer, M. J., Sparrow, P. A. C., Richard, F., et al. (2013). Arabidopsis HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR1b overexpression enhances water productivity, resistance to drought, and infection [Online]. *Journal Of Experimental Botany*, 64(11), 3467-3481. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert185>
- Begara-Morales, J. C., Chaki, M., Valderrama, R., Sánchez-Calvo, B., Mata-Pérez, C., Padilla, M. N., et al. (2018). Nitric oxide buffering and conditional nitric oxide release in stress response [Online]. *Journal Of Experimental Botany*, 69(14), 3425-3438. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery072>
- Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., López-Jaramillo, J., et al. (2014). Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine

nitration and S-nitrosylation [Online]. *Journal Of Experimental Botany*, 65(2), 527-538. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert396>

Bergey, D. R., Kandel, R., Tyree, B. K., Dutt, M., & Dhekney, S. A. The Role of Calmodulin and Related Proteins in Plant Cell Function: An Ever-Thickening Plot [Online]. *Springer Science Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s40362-014-0025-z>

Bharti, K., von Koskull-Döring, P., Bharti, S., Kumar, P., Tintschl-Körbitzer, A., Treuter, E., & Nover, L. (2004). Tomato Heat Stress Transcription Factor HsfB1 Represents a Novel Type of General Transcription Coactivator with a Histone-Like Motif Interacting with the Plant CREB Binding Protein Ortholog HAC1 [Online]. *The Plant Cell*, 16(6), 1521-1535. <https://doi.org/10.1105/tpc.019927>

Bienert, G. P., Møller, A. L. B., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2007). Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 282(2), 1183-1192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603761200>

Bitá, C. E., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops [Online]. *Frontiers In Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00273>

Bonini, M. G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A. M. D. C., & Augusto, O. (1999). Direct EPR Detection of the Carbonate Radical Anion Produced from Peroxynitrite and Carbon Dioxide [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 274(16), 10802-10806. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.10802>

Bonner, J. J., Carlson, T., Fackenthal, D. L., Paddock, D., Storey, K., Lea, K., & Pelham, H. R. B. (2000). Complex Regulation of the Yeast Heat Shock Transcription Factor [Online]. *Molecular Biology Of The Cell*, 11(5), 1739-1751. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.5.1739>

Bukau, B., & Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines [Online]. *Cell*, 92(3), 351-366. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80928-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80928-9)

Camejo, D., Jiménez, A., Alarcón, J. J., Torres, W., Gómez, J. M., & Sevilla, F. (2006). Changes in photosynthetic parameters and antioxidant activities following heat-shock treatment in tomato plants [Online]. *Functional Plant Biology*, 33(2). <https://doi.org/10.1071/FP05067>

Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection [Online]. *Genetics And Molecular Biology*, 35(4 suppl 1), 1011-1019. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600016>

CHAKI, M. O. U. N. I. R. A., VALDERRAMA, R. A. Q. U. E. L., FERNÁNDEZ-OCAÑA, A. N. A. M., CARRERAS, A. L. F. O. N. S. O., GÓMEZ-RODRÍGUEZ, M. A. R. I. A. V., LÓPEZ-JARAMILLO, J. A. V. I. E. R., et al. (2011). High temperature triggers the metabolism of S-nitrosothiols in sunflower mediating a process of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin-NADP reductase by tyrosine nitration [Online]. *Plant, Cell & Environment*, 34(11), 1803-1818. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02376.x>

Chan-Schaminet, K. Y., Baniwal, S. K., Bublak, D., Nover, L., & Scharf, K. -D. (2009). Specific Interaction between Tomato HsfA1 and HsfA2 Creates Hetero-oligomeric Superactivator Complexes for Synergistic Activation of Heat Stress Gene Expression [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 284(31), 20848-20857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007336>

Charng, Y. -yung, Liu, H. -chin, Liu, N. -yu, Chi, W. -tzu, Wang, C. -neng, Chang, S. -hsun, & Wang, T. -tsuen. (2007). A Heat-Inducible Transcription Factor, HsfA2, Is Required for Extension of Acquired Thermotolerance in Arabidopsis [Online]. *Plant Physiology*, 143(1), 251-262. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091322>

Chen, X., Shi, L., Chen, Y., Zhu, L., Zhang, D., Xiao, S., et al. (2018). Arabidopsis HSP70-16 is required for flower opening under normal or mild heat stress temperatures [Online]. *Plant, Cell & Environment*, 42(4), 1190-1204. <https://doi.org/10.1111/pce.13480>

Cho, E. K., & Choi, Y. J. (2009). A nuclear-localized HSP70 confers thermoprotective activity and drought-stress tolerance on plants [Online]. *Biotechnology Letters*, 31(4), 597-606. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9880-5>

Choi, W. -G., Toyota, M., Kim, S. -H., Hilleary, R., & Gilroy, S. (2014). Salt stress-induced Ca²⁺ waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants [Online].

- Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 111(17), 6497-6502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319955111>
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination [Online]. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867. <https://doi.org/10.1111/tpj.13299>
- Clarke, S. M., Mur, L. A. J., Wood, J. E., & Scott, I. M. (2004). Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana* [Online]. *The Plant Journal*, 38(3), 432-447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02054.x>
- Cronjé, M. J., & Bornman, L. (1999). Salicylic Acid Influences Hsp70/Hsc70 Expression in *Lycopersicon esculentum*: Dose- and Time-Dependent Induction or Potentiation [Online]. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 265(2), 422-427. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1692>
- Cronjé, M. J., & Bornman, L. (1999). Salicylic Acid Influences Hsp70/Hsc70 Expression in *Lycopersicon esculentum*: Dose- and Time-Dependent Induction or Potentiation [Online]. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 265(2), 422-427. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1692>
- Damasceno, F. C., Facci, R. R., da Silva, T. M., & Toledo, J. C. (2014). Mechanisms and kinetic profiles of superoxide-stimulated nitrosative processes in cells using a diaminofluorescein probe [Online]. *Free Radical Biology And Medicine*, 77, 270-280. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.012>
- Dat, J. F., Foyer, C. H., & Scott, I. M. (1998). Changes in Salicylic Acid and Antioxidants during Induced Thermotolerance in Mustard Seedlings [Online]. *Plant Physiology*, 118(4), 1455-1461. <https://doi.org/10.1104/pp.118.4.1455>
- Dat, J. F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C. H., & Scott, I. M. (1998). Parallel Changes in H₂O₂ and Catalase during Thermotolerance Induced by Salicylic Acid or Heat Acclimation in Mustard Seedlings [Online]. *Plant Physiology*, 116(4), 1351-1357. <https://doi.org/10.1104/pp.116.4.1351>
- Dat, J. F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C. H., & Scott, I. M. (1998). Parallel Changes in H₂O₂ and Catalase during Thermotolerance Induced by Salicylic Acid or Heat Acclimation in Mustard Seedlings [Online]. *Plant Physiology*, 116(4), 1351-1357. <https://doi.org/10.1104/pp.116.4.1351>
- de Jong, W. W., Caspers, G. -J., & Leunissen, J. A. M. (1998). Genealogy of the α -crystallin—small heat-shock protein superfamily [Online]. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 22(3-4), 151-162. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00013-0](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00013-0)
- Deng, Y., Humbert, S., Liu, J. -X., Srivastava, R., Rothstein, S. J., & Howell, S. H. (2011). Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in *Arabidopsis* [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 108(17), 7247-7252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102117108>
- Deville, C., Carroni, M., Franke, K. B., Topf, M., Bukau, B., Mogk, A., & Saibil, H. R. (2017). Structural pathway of regulated substrate transfer and threading through an Hsp100 disaggregase [Online]. *Science Advances*, 3(8). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1701726>
- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2018). Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity [Online]. *Cell*, 173(6), 1454-1467.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.044>
- Dinkova, T. D., Zepeda, H., Martínez-Salas, E., Martínez, L. M., Nieto-Sotelo, J., & Jiménez, E. S. (2005). Cap-independent translation of maize Hsp101 [Online]. *The Plant Journal*, 41(5), 722-731. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02333.x>
- Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J., & Hinnebusch, A. G. (2000). Uncharged tRNA Activates GCN2 by Displacing the Protein Kinase Moiety from a Bipartite tRNA-Binding Domain [Online]. *Molecular Cell*, 6(2), 269-279. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00028-9)
- Doyle, S. M., & Wickner, S. (2009). Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines [Online]. *Trends In Biochemical Sciences*, 34(1), 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.09.010>
- Dragovic, Z., Broadley, S. A., Shomura, Y., Bracher, A., & Hartl, F. U. (2006). Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s [Online]. *The Embo Journal*, 25(11), 2519-2528. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601138>

- Drerup, M. M., Schlücking, K., Hashimoto, K., Manishankar, P., Steinhorst, L., Kuchitsu, K., & Kudla, J. (2013). The Calcineurin B-Like Calcium Sensors CBL1 and CBL9 Together with Their Interacting Protein Kinase CIPK26 Regulate the Arabidopsis NADPH Oxidase RBOHF [Online]. *Molecular Plant*, 6(2), 559-569. <https://doi.org/10.1093/mp/sst009>
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., Witte, C. -P., et al. (2013). Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 110(21), 8744-8749. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221294110>
- Evrard, A., Kumar, M., Lecourieux, D., Lucks, J., von Koskull-Döring, P., & Hirt, H. (2013). Regulation of the heat stress response in Arabidopsis by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2 [Online]. *Peerj*, 1. <https://doi.org/10.7717/peerj.59>
- Evstigneeva, Z. G., Solov'eva, N. A., & Sidel'nikova, L. I. (2001). [Online]. *Applied Biochemistry And Microbiology*, 37(1), 1-13. <https://doi.org/10.1023/A:1002835921817>
- Fariduddin, Q., Hayat, S., & Ahmad, A. (2003). Salicylic Acid Influences Net Photosynthetic Rate, Carboxylation Efficiency, Nitrate Reductase Activity, and Seed Yield in Brassica juncea [Online]. *Photosynthetica*, 41(2), 281-284. <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000011962.05991.6c>
- Fawcett, T. W., Qingbo, X., & Holbrook, N. J. (1997). Potentiation of heat stress-induced hsp70 expression in vivo by aspirin. *Cell Stress And Chaperones*, (2), 104-109.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B. -W., Wang, Y., Pallas, J. A., & Loake, G. J. (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 102(22), 8054-8059. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501456102>
- Feldman, D. E., & Frydman, J. (2000). Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones [Online]. *Current Opinion In Structural Biology*, 10(1), 26-33. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00044-5](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00044-5)
- Fernández-Fernández, M. R., & Valpuesta, J. M. (2018). Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis [Online]. *F1000Research*, 7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15528.1>
- Finka, A., Cuendet, A. F. H., Maathuis, F. J. M., Saidi, Y., & Goloubinoff, P. (2012). Plasma Membrane Cyclic Nucleotide Gated Calcium Channels Control Land Plant Thermal Sensing and Acquired Thermotolerance [Online]. *The Plant Cell*, 24(8), 3333-3348. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.095844>
- Fitter, A. H., & Fitter, R. S R. (2002). Rapid Changes in Flowering Time in British Plants [Online]. *Science*, 296(5573), 1689-1691. <https://doi.org/10.1126/science.1071617>
- Formánková, E. 2018 Úloha signálních drah oxidu dusnatého a kyseliny salicylové v odpovědi rostlin rajčete na teplotní stres a infekci patogeny (Diplomová práce), Univerzita Palackého v olomouci
- Fragkostefanakis, S., Simm, S., El-Shershaby, A., Hu, Y., Bublak, D., Mesihovic, A., et al. (2018). The repressor and co-activator HsfB1 regulates the major heat stress transcription factors in tomato [Online]. *Plant, Cell & Environment*, 42(3), 874-890. <https://doi.org/10.1111/pce.13434>
- Frungillo, L., Skelly, M. J., Loake, G. J., Spoel, S. H., & Salgado, I. (2014). S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway [Online]. *Nature Communications*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms6401>
- Gao, F., Han, X., Wu, J., Zheng, S., Shang, Z., Sun, D., et al. (2012). A heat-activated calcium-permeable channel - Arabidopsis cyclic nucleotide-gated ion channel 6 - is involved in heat shock responses [Online]. *The Plant Journal*, 70(6), 1056-1069. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04969.x>
- Gao, H., Brandizzi, F., Benning, C., & Larkin, R. M. (2008). A membrane-tethered transcription factor defines a branch of the heat stress response in Arabidopsis thaliana [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 105(42), 16398-16403. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808463105>
- Gao, K., Liu, Y. -L., Li, B., Zhou, R. -G., Sun, D. -Y., & Zheng, S. -Z. (2014). Arabidopsis thaliana Phosphoinositide-Specific Phospholipase C Isoform 3 (AtPLC3) and AtPLC9 have an

Additive Effect on Thermotolerance [Online]. *Plant And Cell Physiology*, 55(11), 1873-1883. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu116>

Gao, K., Liu, Y. -L., Li, B., Zhou, R. -G., Sun, D. -Y., & Zheng, S. -Z. (2014). Arabidopsis thaliana Phosphoinositide-Specific Phospholipase C Isoform 3 (AtPLC3) and AtPLC9 have an Additive Effect on Thermotolerance [Online]. *Plant And Cell Physiology*, 55(11), 1873-1883. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu116>

Gates, S. N., Yokom, A. L., Lin, J. B., Jackrel, M. E., Rizo, A. N., Kendsersky, N. M., et al. (2017). Ratchet-like polypeptide translocation mechanism of the AAA+ disaggregase Hsp104 [Online]. *Science*, 357(6348), 273-279. <https://doi.org/10.1126/science.aan1052>

Gilroy, S., Bialasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A. R., Karpiński, S., & Mittler, R. (2016). ROS, Calcium, and Electric Signals: Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants [Online]. *Plant Physiology*, 171(3), 1606-1615. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00434>

Goloubinoff, P., Sassi, A. S., Fauvet, B., Barducci, A., & De Los Rios, P. (2018). Chaperones convert the energy from ATP into the nonequilibrium stabilization of native proteins [Online]. *Nature Chemical Biology*, 14(4), 388-395. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0013-8>

Gomez-Pastor, R., Burchfiel, E. T., & Thiele, D. J. (2018). Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease [Online]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(1), 4-19. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.73>

GOULD, K. S., LAMOTTE, O., KLINGUER, A., PUGIN, A., & WENDEHENNE, D. (2003). Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? [Online]. *Plant, Cell And Environment*, 26(11), 1851-1862. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01101.x>

Gould, P. D., Locke, J. C. W., Larue, C., Southern, M. M., Davis, S. J., Hanano, S., et al. (2006). The Molecular Basis of Temperature Compensation in the Arabidopsis Circadian Clock [Online]. *The Plant Cell*, 18(5), 1177-1187. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039990>

Guo, M., Liu, J. -H., Ma, X., Luo, D. -X., Gong, Z. -H., & Lu, M. -H. (2016). The Plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, Regulation, and Function in Response to Abiotic Stresses [Online]. *Frontiers In Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00114>

Gupta, K. J., & Igamberdiev, A. U. (2013). Recommendations of using at least two different methods for measuring NO [Online]. *Frontiers In Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00058>

Hahn, A., Bublak, D., Schleiff, E., & Scharf, K. -D. (2011). Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 Chaperones and Heat Stress Transcription Factors in Tomato [Online]. *The Plant Cell*, 23(2), 741-755. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076018>

Hartmann, M., & Zeier, J. (2019). N-hydroxypipicolinic acid and salicylic acid: a metabolic duo for systemic acquired resistance [Online]. *Current Opinion In Plant Biology*, 50, 44-57. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.006>

Haslbeck, M., Miess, A., Stromer, T., Walter, S., & Buchner, J. (2005). Disassembling Protein Aggregates in the Yeast Cytosol [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(25), 23861-23868. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502697200>

Hayer-Hartl, M., Bracher, A., & Hartl, F. U. (2016). The GroEL–GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding [Online]. *Trends In Biochemical Sciences*, 41(1), 62-76. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.009>

Hemantaranjan, A. (2014). Heat Stress Responses and Thermotolerance [Online]. *Advances In Plants & Agriculture Research*, 1(3). <https://doi.org/10.15406/apar.2014.01.00012>

Hoter, A., El-Sabban, M., & Naim, H. (2018). The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease [Online]. *International Journal Of Molecular Sciences*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092560>

Hrabarova, E., Juranek, I., & Soltes, L. (2011). Pro-oxidative effect of peroxynitrite regarding biological systems: a special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation [Online]. *General Physiology And Biophysics*, 30(3), 223-238. https://doi.org/10.4149/gpb_2011_03_223

Hu, Z., Song, N., Zheng, M., Liu, X., Liu, Z., Xing, J., et al. (2015). Histone acetyltransferase GCN5 is essential for heat stress-responsive gene activation and thermotolerance in Arabidopsis [Online]. *The Plant Journal*, 84(6), 1178-1191. <https://doi.org/10.1111/tpj.13076>

- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y. -H., et al. (2010). Functional Analysis of the Arabidopsis PAL Gene Family in Plant Growth, Development, and Response to Environmental Stress [Online]. *Plant Physiology*, 153(4), 1526-1538. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157370>
- Huang, X., Stettmaier, K., Michel, C., Hutzler, P., Mueller, M. J., & Durner, J. (2004). Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in Arabidopsis thaliana [Online]. *Planta*, 218(6), 938-946. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1178-1>
- Huang, X., Stettmaier, K., Michel, C., Hutzler, P., Mueller, M. J., & Durner, J. (2004). Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in Arabidopsis thaliana [Online]. *Planta*, 218(6), 938-946. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1178-1>
- Hussain, A., Mun, B. -G., Imran, Q. M., Lee, S. -U., Adamu, T. A., Shahid, M., et al. (2016). Nitric Oxide Mediated Transcriptome Profiling Reveals Activation of Multiple Regulatory Pathways in Arabidopsis thaliana [Online]. *Frontiers In Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00975>
- Iizuka, R., & Funatsu, T. (2016). Chaperonin GroEL uses asymmetric and symmetric reaction cycles in response to the concentration of non-native substrate proteins [Online]. *Biophysics And Physicobiology*, 13, 63-69. https://doi.org/10.2142/biophysico.13.0_63
- Ikeda, M., Mitsuda, N., & Ohme-Takagi, M. (2011). Arabidopsis HsfB1 and HsfB2b Act as Repressors of the Expression of Heat-Inducible Hsfs But Positively Regulate the Acquired Thermotolerance [Online]. *Plant Physiology*, 157(3), 1243-1254. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179036>
- Ishida, H., Makino, A., & Mae, T. (1999). Fragmentation of the Large Subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase by Reactive Oxygen Species Occurs near Gly-329 [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 274(8), 5222-5226. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.8.5222>
- Iwata, Y., Ashida, M., Hasegawa, C., Tabara, K., Mishiba, K. -ichiro, & Koizumi, N. (2017). Activation of the Arabidopsis membrane-bound transcription factor bZIP28 is mediated by site-2 protease, but not site-1 protease [Online]. *The Plant Journal*, 91(3), 408-415. <https://doi.org/10.1111/tpj.13572>
- Jahnová, J., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2019). S-Nitrosogluthathione Reductase—The Master Regulator of Protein S-Nitrosation in Plant NO Signaling [Online]. *Plants*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/plants8020048>
- Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D. J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., et al. (2016). Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom [Online]. *Science Signaling*, 9(417), re2-re2. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad4403>
- Jiang, Y., & Kalodimos, C. G. (2018). Confirmation for conformational selection [Online]. *Elife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.34923>
- Kadota, Y., Shirasu, K., & Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity [Online]. *Plant And Cell Physiology*, 56(8), 1472-1480. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv063>
- Kampinga, H. H., & Craig, E. A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity [Online]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(8), 579-592. <https://doi.org/10.1038/nrm2941>
- Kanno, K., Mae, T., & Makino, A. (2009). High night temperature stimulates photosynthesis, biomass production and growth during the vegetative stage of rice plants [Online]. *Soil Science And Plant Nutrition*, 55(1), 124-131. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2008.00343.x>
- Kellner, R., Hofmann, H., Barducci, A., Wunderlich, B., Nettels, D., & Schuler, B. (2014). Single-molecule spectroscopy reveals chaperone-mediated expansion of substrate protein [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 111(37), 13355-13360. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407086111>
- Khan, M. I. R., Iqbal, N., Masood, A., Per, T. S., & Khan, N. A. (2014). Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation [Online]. *Plant Signaling & Behavior*, 8(11). <https://doi.org/10.4161/psb.26374>
- Kim, K. K., Kim, R., & Kim, S. -H. (1998). Crystal structure of a small heat-shock protein [Online]. *Nature*, 394(6693), 595-599. <https://doi.org/10.1038/29106>

- Kirschke, E., Goswami, D., Southworth, D., Griffin, P. R., & Agard, D. A. (2014). Glucocorticoid Receptor Function Regulated by Coordinated Action of the Hsp90 and Hsp70 Chaperone Cycles [Online]. *Cell*, 157(7), 1685-1697. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.038>
- Klessig, D. F., Choi, H. W., & Dempsey, D. 'M. A. (2018). Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and Future [Online]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(9), 871-888. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0067-CR>
- Kohli, S. K., Handa, N., Kaur, R., Kumar, V., Khanna, K., Bakshi, P., et al. (2017). Role of Salicylic Acid in Heavy Metal Stress Tolerance: Insight into Underlying Mechanism [Online]. In *Salicylic Acid: A Multifaceted Hormone* (pp. 123-144). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6068-7_7
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., et al. (1998). Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins [Online]. *Analytical Chemistry*, 70(13), 2446-2453. <https://doi.org/10.1021/ac9801723>
- Koo, Y. M., A Yeong Heo, A., & Choi, H. W. (2020). Salicylic Acid as a Safe Plant Protector and Growth Regulator. *The Plant Pathology Journal*, 36(1), 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.12.2019.0295>
- Korennykh, A., & Walter, P. (2012). Structural Basis of the Unfolded Protein Response [Online]. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, 28(1), 251-277. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155826>
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., & Scharf, K. -D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants [Online]. *Current Opinion In Plant Biology*, 10(3), 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.011>
- Kovacs, I., Durner, J., & Lindermayr, C. (2015). Crosstalk between nitric oxide and glutathione is required for NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1)-dependent defense signaling in *Arabidopsis thaliana* [Online]. *New Phytologist*, 208(3), 860-872. <https://doi.org/10.1111/nph.13502>
- Krishnamoorthy, T., Pavitt, G. D., Zhang, F., Dever, T. E., & Hinnebusch, A. G. (2001). Tight Binding of the Phosphorylated α Subunit of Initiation Factor 2 (eIF2 α) to the Regulatory Subunits of Guanine Nucleotide Exchange Factor eIF2B Is Required for Inhibition of Translation Initiation [Online]. *Molecular And Cellular Biology*, 21(15), 5018-5030. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.15.5018-5030.2001>
- Krishnamoorthy, T., Pavitt, G. D., Zhang, F., Dever, T. E., & Hinnebusch, A. G. (2001). Tight Binding of the Phosphorylated α Subunit of Initiation Factor 2 (eIF2 α) to the Regulatory Subunits of Guanine Nucleotide Exchange Factor eIF2B Is Required for Inhibition of Translation Initiation [Online]. *Molecular And Cellular Biology*, 21(15), 5018-5030. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.15.5018-5030.2001>
- Krivoruchko, A., & Storey, K. B. (2010). Forever Young: Mechanisms of Natural Anoxia Tolerance and Potential Links to Longevity [Online]. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 3(3), 186-198. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.3.12356>
- Kvaratskhelia, M., George, S. J., & Thorneley, R. N. F. (1997). Salicylic Acid Is a Reducing Substrate and Not an Effective Inhibitor of Ascorbate Peroxidase [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 272(34), 20998-21001. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.20998>
- Lageix, S., Lanet, E., Pouch-Pélissier, M. -N., Espagnol, M. -C., Robaglia, C., Deragon, J. -M., & Pélissier, T. (2008). *Arabidopsis* eIF2 α kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding [Online]. *Bmc Plant Biology*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-134>
- Lai, A. L., Clerico, E. M., Blackburn, M. E., Patel, N. A., Robinson, C. V., Borbat, P. P., et al. (2017). Key features of an Hsp70 chaperone allosteric landscape revealed by ion-mobility native mass spectrometry and double electron-electron resonance [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 292(21), 8773-8785. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770404>
- Larkindale, J., & Vierling, E. (2008). Core Genome Responses Involved in Acclimation to High Temperature [Online]. *Plant Physiology*, 146(2), 748-761. <https://doi.org/10.1104/pp.107.112060>

- Lee, G. J., & Vierling, E. (2000). A Small Heat Shock Protein Cooperates with Heat Shock Protein 70 Systems to Reactivate a Heat-Denatured Protein [Online]. *Plant Physiology*, 122(1), 189-198. <https://doi.org/10.1104/pp.122.1.189>
- Lee, J., Kim, J. -H., Biter, A. B., Sielaff, B., Lee, S., & Tsai, F. T. F. (2013). Heat shock protein (Hsp) 70 is an activator of the Hsp104 motor [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 110(21), 8513-8518. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217988110>
- Lee, U., Rioflorida, I., Hong, S. -W., Larkindale, J., Waters, E. R., & Vierling, E. (2007). The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development [Online]. *The Plant Journal*, 49(1), 115-127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02940.x>
- Lee, U., Wie, C., 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 [Online]. *The Plant Cell*, 20(3), 786-802. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052647>
- Lemtiri-Chlieh, F., MacRobbie, E. A. C., Webb, A. A. R., Manison, N. F., Brownlee, C., Skepper, J. N., et al. (2003). Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 100(17), 10091-10095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1133289100>
- León, J., & Costa-Broseta, Á. (2019). Present knowledge and controversies, deficiencies, and misconceptions on nitric oxide synthesis, sensing, and signaling in plants [Online]. *Plant, Cell & Environment*, 43(1), 1-15. <https://doi.org/10.1111/pce.13617>
- Li, B., Gao, K., Ren, H., & Tang, W. (2018). Molecular mechanisms governing plant responses to high temperatures [Online]. *Journal Of Integrative Plant Biology*, 60(9), 757-779. <https://doi.org/10.1111/jipb.12701>
- Li, L. -M., Lü, S. -Y., & Li, R. -J. (2017). The Arabidopsis endoplasmic reticulum associated degradation pathways are involved in the regulation of heat stress response [Online]. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 487(2), 362-367. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.066>
- Liao, C., Zheng, Y., & Guo, Y. (2017). MYB30 transcription factor regulates oxidative and heat stress responses through ANNEXIN-mediated cytosolic calcium signaling in Arabidopsis [Online]. *New Phytologist*, 216(1), 163-177. <https://doi.org/10.1111/nph.14679>
- Lin, K. -F., Tsai, M. -Y., Lu, C. -A., Wu, S. -J., & Yeh, C. -H. (2018). The roles of Arabidopsis HSFA2, HSFA4a, and HSFA7a in the heat shock response and cytosolic protein response [Online]. *Botanical Studies*, 59(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-018-0231-0>
- Lindermayr, C., Sell, S., Müller, B., Leister, D., & Durner, J. (2010). Redox Regulation of the NPR1-TGA1 System of Arabidopsis thaliana by Nitric Oxide [Online]. *The Plant Cell*, 22(8), 2894-2907. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066464>
- Lindermayr, C., Sell, S., Müller, B., Leister, D., & Durner, J. (2010). Redox Regulation of the NPR1-TGA1 System of Arabidopsis thaliana by Nitric Oxide [Online]. *The Plant Cell*, 22(8), 2894-2907. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066464>
- Liu, H. S. I. A. N. G. -C. H. I. N., Liao, H. S. I. U. -T. I. N. G., & Charng, Y. E. E. -Y. U. N. G. (2011). The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in Arabidopsis [Online]. *Plant, Cell & Environment*, 34(5), 738-751. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02278.x>
- Liu, H. -T., Gao, F., Li, G. -L., Han, J. -L., Liu, D. -L., Sun, D. -Y., & Zhou, R. -G. (2008). The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat-shock signal transduction in Arabidopsis thaliana [Online]. *The Plant Journal*, 55(5), 760-773. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03544.x>
- Liu, H. -T., Li, B., Shang, Z. -L., Li, X. -Z., Mu, R. -L., Sun, D. -Y., & Zhou, R. -G. (2003). Calmodulin Is Involved in Heat Shock Signal Transduction in Wheat [Online]. *Plant Physiology*, 132(3), 1186-1195. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018564>
- Liu, J. -X., Srivastava, R., Che, P., & Howell, S. H. (2008). An Endoplasmic Reticulum Stress Response in Arabidopsis Is Mediated by Proteolytic Processing and Nuclear Relocation of a Membrane-Associated Transcription Factor, bZIP28 [Online]. *The Plant Cell*, 19(12), 4111-4119. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.050021>

- Lobell, D. B., Schlenker, W., & Costa-Roberts, J. (2011). Climate Trends and Global Crop Production Since 1980 [Online]. *Science*, 333(6042), 616-620. <https://doi.org/10.1126/science.1204531>
- Ma, W., Guan, X., Li, J., Pan, R., Wang, L., Liu, F., et al. (2019). Mitochondrial small heat shock protein mediates seed germination via thermal sensing [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 116(10), 4716-4721. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815790116>
- Mapa, K., Sikor, M., Kudryavtsev, V., Waegemann, K., Kalinin, S., Seidel, C. A. M., et al. (2010). The Conformational Dynamics of the Mitochondrial Hsp70 Chaperone [Online]. *Molecular Cell*, 38(1), 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.010>
- Marino, S. M., & Gladyshev, V. N. (2010). Structural Analysis of Cysteine S-Nitrosylation: A Modified Acid-Based Motif and the Emerging Role of Trans-Nitrosylation [Online]. *Journal Of Molecular Biology*, 395(4), 844-859. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.10.042>
- Maruri-López, I., Aviles-Baltazar, N. Y., Buchala, A., & Serrano, M. (2019). Intra and Extracellular Journey of the Phytohormone Salicylic Acid [Online]. *Frontiers In Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00423>
- Mayer, M. P. (2010). Gymnastics of Molecular Chaperones [Online]. *Molecular Cell*, 39(3), 321-331. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.012>
- Mayer, M. P. (2013). Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism [Online]. *Trends In Biochemical Sciences*, 38(10), 507-514. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.08.001>
- Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism [Online]. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 62(6), 670-684. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>
- Mayer, M. P., & Gierasch, L. M. (2019). Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 294(6), 2085-2097. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002810>
- Mayer, M. P., & Gierasch, L. M. (2019). Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 294(6), 2085-2097. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002810>
- Merret, R., Descombin, J., Juan, Y. -ting, Favory, J. -J., Carpentier, M. -C., Chaparro, C., et al. (2013). XRN4 and LARP1 Are Required for a Heat-Triggered mRNA Decay Pathway Involved in Plant Acclimation and Survival during Thermal Stress [Online]. *Cell Reports*, 5(5), 1279-1293. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.019>
- Meyer, K. D., Patil, D. P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M. A., Elemento, O., et al. (2015). 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation [Online]. *Cell*, 163(4), 999-1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.012>
- MILLER, G. A. D., & MITTLER, R. O. N. (2006). Could Heat Shock Transcription Factors Function as Hydrogen Peroxide Sensors in Plants? [Online]. *Annals Of Botany*, 98(2), 279-288. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl107>
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., et al. (2009). The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli [Online]. *Science Signaling*, 2(84), ra45-ra45. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000448>
- Mishkind, M., Vermeer, J. E. M., Darwish, E., & Munnik, T. (2009). Heat stress activates phospholipase D and triggers PIP 2 accumulation at the plasma membrane and nucleus [Online]. *The Plant Journal*, 60(1), 10-21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03933.x>
- Mishra, R. C., & Grover, A. (2015). ClpB/Hsp100 proteins and heat stress tolerance in plants [Online]. *Critical Reviews In Biotechnology*, 36(5), 862-874. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1051942>
- Mishra, R. C., & Grover, A. (2019). Voyaging around ClpB/Hsp100 proteins and plant heat tolerance [Online]. *Proceedings Of The Indian National Science Academy*. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2019/49592>
- Mishra, R. C., Richa, Singh, A., Tiwari, L. D., & Grover, A. (2016). Characterization of 5'UTR of rice ClpB-C/Hsp100 gene: evidence of its involvement in post-transcriptional regulation [Online]. *Cell Stress And Chaperones*, 21(2), 271-283. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0657-1>

Mishra, S. K. In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato [Online]. *Genes & Development*, 16(12), 1555-1567. <https://doi.org/10.1101/gad.228802>

Mishra, S. K. In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato [Online]. *Genes & Development*, 16(12), 1555-1567. <https://doi.org/10.1101/gad.228802>

Misselwitz, B., Staack, O., & Rapoport, T. A. (1998). J Proteins Catalytically Activate Hsp70 Molecules to Trap a Wide Range of Peptide Sequences [Online]. *Molecular Cell*, 2(5), 593-603. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80158-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80158-6)

Mittler, R., Finka, A., & Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat? [Online]. *Trends In Biochemical Sciences*, 37(3), 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.007>

Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., et al. (2011). ROS signaling: the new wave? [Online]. *Trends In Plant Science*, 16(6), 300-309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>

Mogk, A. Identification of thermolabile Escherichia coli proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB [Online]. *The Embo Journal*, 18(24), 6934-6949. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.6934>

Motojima, F. (2015). How do chaperonins fold protein? [Online]. *Biophysics*, 11, 93-102. <https://doi.org/10.2142/biophysics.11.93>

Motojima, F., & Yoshida, M. (2010). Polypeptide in the chaperonin cage partly protrudes out and then folds inside or escapes outside [Online]. *The Embo Journal*, 29(23), 4008-4019. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.262>

Motojima, F., Motojima-Miyazaki, Y., & Yoshida, M. (2012). Revisiting the contribution of negative charges on the chaperonin cage wall to the acceleration of protein folding [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(39), 15740-15745. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204547109>

Mou, Z., Fan, W., & Dong, X. (2003). Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes [Online]. *Cell*, 113(7), 935-944. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00429-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00429-X)

Nagashima, Y., Mishiba, K., -ichiro, Suzuki, E., Shimada, Y., Iwata, Y., & Koizumi, N. (2011). Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor [Online]. *Scientific Reports*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/srep00029>

Najami, N., Janda, T., Barriah, W., Kayam, G., Tal, M., Guy, M., & Volokita, M. (2008). Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization [Online]. *Molecular Genetics And Genomics*, 279(2), 171-182. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0305-2>

Nazar, R., Iqbal, N., & Umar, S. (2017). Heat Stress Tolerance in Plants: Action of Salicylic Acid [Online]. In *Salicylic Acid: A Multifaceted Hormone* (pp. 145-161). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6068-7_8

Niu, Y., & Xiang, Y. (2018). An Overview of Biomembrane Functions in Plant Responses to High-Temperature Stress [Online]. *Frontiers In Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00915>

Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., et al. (2008). Synergistic Activation of the Arabidopsis NADPH Oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and Phosphorylation [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 283(14), 8885-8892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708106200>

Ohama, N., Kusakabe, K., Mizoi, J., Zhao, H., Kidokoro, S., Koizumi, S., et al. (2016). The Transcriptional Cascade in the Heat Stress Response of Arabidopsis Is Strictly Regulated at the Level of Transcription Factor Expression [Online]. *The Plant Cell*, 28(1), 181-201. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00435>

Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response [Online]. *Trends In Plant Science*, 22(1), 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.015>

Olate, E., Jiménez-Gómez, J. M., Holuigue, L., & Salinas, J. (2018). NPR1 mediates a novel regulatory pathway in cold acclimation by interacting with HSFA1 factors [Online]. *Nature Plants*, 4(10), 811-823. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0254-2>

Panchuk, I. I., Volkov, R. A., & Schöffl, F. (2002). Heat Stress- and Heat Shock Transcription Factor-Dependent Expression and Activity of Ascorbate Peroxidase in Arabidopsis [Online]. *Plant Physiology*, 129(2), 838-853. <https://doi.org/10.1104/pp.001362>

Parankusam, S., Adimulam, S. S., Bhatnagar-Mathur, P., & Sharma, K. K. (2017). Nitric Oxide (NO) in Plant Heat Stress Tolerance: Current Knowledge and Perspectives [Online]. *Frontiers In Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01582>

Park, C. -J., & Seo, Y. -S. (2015). Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity [Online]. *The Plant Pathology Journal*, 31(4), 323-333. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150>

Pearl, L. H., & Prodromou, C. (2000). Structure and in vivo function of Hsp90 [Online]. *Current Opinion In Structural Biology*, 10(1), 46-51. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00047-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00047-0)

Pérez-Salamó, I., Papdi, C., Rigó, G., Zsigmond, L., Vilela, B., Lumberas, V., et al. (2014). The Heat Shock Factor A4A Confers Salt Tolerance and Is Regulated by Oxidative Stress and the Mitogen-Activated Protein Kinases MPK3 and MPK6 [Online]. *Plant Physiology*, 165(1), 319-334. <https://doi.org/10.1104/pp.114.237891>

Piterková, J., Luhová, L., Mieslerová, 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 [Online]. *Plant Science*, 207, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.02.010>

Pospíšil, P., & Yamamoto, Y. (2017). Damage to photosystem II by lipid peroxidation products [Online]. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects*, 1861(2), 457-466. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.005>

Pratt, W. B., & Toft, D. O. (2003). Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70-Based Chaperone Machinery [Online]. *Experimental Biology And Medicine*, 228(2), 111-133. <https://doi.org/10.1177/153537020322800201>

Qin, D., Wang, F., Geng, X., Zhang, L., Yao, Y., Ni, Z., et al. (2015). Overexpression of heat stress-responsive TaMBF1c, a wheat (*Triticum aestivum* L.) Multiprotein Bridging Factor, confers heat tolerance in both yeast and rice [Online]. *Plant Molecular Biology*, 87(1-2), 31-45. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0259-9>

Qu, A. -L., Ding, Y. -F., Jiang, Q., & Zhu, C. (2013). Molecular mechanisms of the plant heat stress response [Online]. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 432(2), 203-207. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.104>

Queitsch, C., Hong, S. -W., Vierling, E., & Lindquist, S. (2000). Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in Arabidopsis [Online]. *The Plant Cell*, 12(4), 479-492. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.479>

Rai, K. K., Pandey, N., & Rai, S. P. (2019). Salicylic acid and nitric oxide signaling in plant heat stress [Online]. *Physiologia Plantarum*. <https://doi.org/10.1111/ppl.12958>

Reichmann, D., Voth, W., & Jakob, U. (2018). Maintaining a Healthy Proteome during Oxidative Stress [Online]. *Molecular Cell*, 69(2), 203-213. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.021>

Rekhter, D., Lüdke, D., Ding, Y., Feussner, K., Zienkiewicz, K., Lipka, V., et al. (2019). Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid [Online]. *Science*, 365(6452), 498-502. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1720>

Ren, H., Gao, K., Liu, Y., Sun, D., & Zheng, S. (2017). The role of AtPLC3 and AtPLC9 in thermotolerance in Arabidopsis [Online]. *Plant Signaling & Behavior*, 12(10). <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1162368>

Rizo, A. N., Lin, J. B., Gates, S. N., Tse, E., Bart, S. M., Castellano, L. M., et al. (2019). Structural basis for substrate gripping and translocation by the ClpB AAA+ disaggregase [Online]. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10150-y>

Roh, S. -H., Hryc, C. F., Jeong, H. -H., Fei, X., Jakana, J., Lorimer, G. H., & Chiu, W. (2017). Subunit conformational variation within individual GroEL oligomers resolved by Cryo-EM [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 114(31), 8259-8264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704725114>

Rosenzweig, R., Farber, P., Velyvis, A., Rennella, E., Latham, M. P., & Kay, L. E. (2015). ClpB N-terminal domain plays a regulatory role in protein disaggregation [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 112(50), E6872-E6881. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512783112>

Röth, S., Mirus, O., Bublak, D., Scharf, K. -D., & Schleiff, E. (2017). DNA-binding and repressor function are prerequisites for the turnover of the tomato heat stress transcription factor HsfB1 [Online]. *The Plant Journal*, 89(1), 31-44. <https://doi.org/10.1111/tpj.13317>

Rothman, J. E. (1989). Polypeptide chain binding proteins: Catalysts of protein folding and related processes in cells [Online]. *Cell*, 59(4), 591-601. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90005-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90005-6)

Sage, T. L., Bagha, S., Lundsgaard-Nielsen, V., Branch, H. A., Sultmanis, S., & Sage, R. F. (2015). The effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants [Online]. *Field Crops Research*, 182, 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.06.011>

Saidi, Y., Finka, A., Muriset, M., Bromberg, Z., Weiss, Y. G., Maathuis, F. J. M., & Goloubinoff, P. (2009). The Heat Shock Response in Moss Plants Is Regulated by Specific Calcium-Permeable Channels in the Plasma Membrane [Online]. *The Plant Cell*, 21(9), 2829-2843. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.065318>

Saleh, A., Withers, J., Mohan, R., Marqués, J., Gu, Y., Yan, S., et al. (2015). Posttranslational Modifications of the Master Transcriptional Regulator NPR1 Enable Dynamic but Tight Control of Plant Immune Responses [Online]. *Cell Host & Microbe*, 18(2), 169-182. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.07.005>

Sami, F., Faizan, M., Faraz, A., Siddiqui, H., Yusuf, M., & Hayat, S. (2018). Nitric oxide-mediated integrative alterations in plant metabolism to confer abiotic stress tolerance, NO crosstalk with phytohormones and NO-mediated post translational modifications in modulating diverse plant stress [Online]. *Nitric Oxide*, 73, 22-38. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.12.005>

Sanchez-Casas, P., & Klessig, D. F. (1994). A Salicylic Acid-Binding Activity and a Salicylic Acid-Inhibitible Catalase Activity Are Present in a Variety of Plant Species [Online]. *Plant Physiology*, 106(4), 1675-1679. <https://doi.org/10.1104/pp.106.4.1675>

Sangwan, V., Orvar, B. L., Beyerly, J., Hirt, H., & Dhindsa, R. S. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways [Online]. *The Plant Journal*, 31(5), 629-638. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01384.x>

Santhanagopalan, I., Basha, E., Ballard, K. N., Bopp, N. E., & Vierling, E. (2015). Model Chaperones: Small Heat Shock Proteins from Plants [Online]. In *The Big Book on Small Heat Shock Proteins* (pp. 119-153). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16077-1_5

Santoro, M. G. (2000). Heat shock factors and the control of the stress response [Online]. *Biochemical Pharmacology*, 59(1), 55-63. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00299-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00299-3)

Santoro, M. G. (2000). Heat shock factors and the control of the stress response [Online]. *Biochemical Pharmacology*, 59(1), 55-63. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00299-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00299-3)

Satyal, S. H., Chen, D., Fox, S. G., Kramer, J. M., & Morimoto, R. I. (1998). Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1 [Online]. *Genes & Development*, 12(13), 1962-1974. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.1962>

Scharf, K. -D., Berberich, T., Ebersberger, I., & Nover, L. (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution [Online]. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 104-119. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.002>

Schramm, F., Ganguli, A., Kiehlmann, E., English, G., Walch, D., & von Koskull-Döring, P. (2006). The Heat Stress Transcription Factor HsfA2 Serves as a Regulatory Amplifier of a Subset of Genes in the Heat Stress Response in Arabidopsis [Online]. *Plant Molecular Biology*, 60(5), 759-772. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-5750-x>

Sekhar, A., Velyvis, A., Zoltsman, G., Rosenzweig, R., Bouvignies, G., & Kay, L. E. (2018). Conserved conformational selection mechanism of Hsp70 chaperone-substrate interactions [Online]. *Elife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.32764>

Siddiqui et al., (2017) Nitric oxide and calcium induced physio-biochemical changes in tomato (*Solanum lycopersicum*) plant under heat stress [online]

- Singh, A., Singh, U., Mittal, D., & Grover, A. (2010). Genome-wide analysis of rice ClpB/HSP100, ClpC and ClpD genes [Online]. *Bmc Genomics*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-95>
- Skelly, M. J., Furniss, J. J., Grey, H., Wong, K. -W., & Spoel, S. H. (2019). Dynamic ubiquitination determines transcriptional activity of the plant immune coactivator NPR1 [Online]. *Elife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.47005>
- Slavotinek, A. M., & Biesecker, L. G. (2001). Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease [Online]. *Trends In Genetics*, *17*(9), 528-535. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02413-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02413-1)
- Slepenkov, S. V., & Witt, S. N. (2002). The unfolding story of the Escherichia coli Hsp70 DnaK: is DnaK a holdase or an unfoldase? [Online]. *Molecular Microbiology*, *45*(5), 1197-1206. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03093.x>
- Slepenkov, S. V., & Witt, S. N. (2002). The unfolding story of the Escherichia coli Hsp70 DnaK: is DnaK a holdase or an unfoldase? [Online]. *Molecular Microbiology*, *45*(5), 1197-1206. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03093.x>
- Snyman, M., & Cronje, M. J. (2008). Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings [Online]. *Journal Of Experimental Botany*, *59*(8), 2125-2132. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern075>
- 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 [Online]. *Plant Science*, *171*(4), 449-458. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.05.002>
- Spiess, C., Meyer, A. S., Reissmann, S., & Frydman, J. (2004). Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets [Online]. *Trends In Cell Biology*, *14*(11), 598-604. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.015>
- Stamler, J. S., Lamas, S., & Fang, F. C. (2001). Nitrosylation [Online]. *Cell*, *106*(6), 675-683. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00495-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00495-0)
- Stamler, J. S., Lamas, S., & Fang, F. C. (2001). Nitrosylation [Online]. *Cell*, *106*(6), 675-683. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00495-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00495-0)
- Storozhenko, S., De Pauw, P., Van Montagu, M., Inzé, D., & Kushnir, S. (1998). The Heat-Shock Element Is a Functional Component of the Arabidopsis APX1 Gene Promoter [Online]. *Plant Physiology*, *118*(3), 1005-1014. <https://doi.org/10.1104/pp.118.3.1005>
- Sugio, A., Dreos, R., Aparicio, F., & Maule, A. J. (2009). The Cytosolic Protein Response as a Subcomponent of the Wider Heat Shock Response in Arabidopsis [Online]. *The Plant Cell*, *21*(2), 642-654. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062596>
- Sun, T., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, Q., Ding, Y., & Zhang, Y. (2015). ChIP-seq reveals broad roles of SARD1 and CBP60g in regulating plant immunity [Online]. *Nature Communications*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms10159>
- Suzuki, N., & Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction [Online]. *Physiologia Plantarum*, *126*(1), 45-51. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x>
- Suzuki, N., Bajad, S., Shuman, J., Shulaev, V., & Mittler, R. (2008). The Transcriptional Co-activator MBF1c Is a Key Regulator of Thermotolerance in Arabidopsis thaliana [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, *283*(14), 9269-9275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709187200>
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A., & Mittler, R. (2011). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling [Online]. *Current Opinion In Plant Biology*, *14*(6), 691-699. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.07.014>
- Suzuki, N., Miller, G., Salazar, C., Mondal, H. A., Shulaev, E., Cortes, D. F., et al. (2013). Temporal-Spatial Interaction between Reactive Oxygen Species and Abscisic Acid Regulates Rapid Systemic Acclimation in Plants [Online]. *The Plant Cell*, *25*(9), 3553-3569. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114595>
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., et al. (2008). Plant Immunity Requires Conformational Charges of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins [Online]. *Science*, *321*(5891), 952-956. <https://doi.org/10.1126/science.1156970>
- Talke, I. (2003). CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? [Online]. *Trends In Plant Science*, *8*(6), 286-293. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00099-2)

- Tewari, R. K., Kim, S., Hahn, E. -J., & Paek, K. -Y. (2008). Involvement of nitric oxide-induced NADPH oxidase in adventitious root growth and antioxidant defense in *Panax ginseng* [Online]. *Plant Biotechnology Reports*, 2(2), 113-122. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0052-9>
- Tharmalingam, S., Alhasawi, A., Appanna, V. P., Lemire, J., & Appanna, V. D. (2017). Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications [Online]. *Biological Chemistry*, 398(11), 1193-1208. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0152>
- Thirumalai, D., Lorimer, G. H., & Hyeon, C. (2020). Iterative annealing mechanism explains the functions of the GroEL and RNA chaperones [Online]. *Protein Science*, 29(2), 360-377. <https://doi.org/10.1002/pro.3795>
- Torok, Z., Goloubinoff, P., Horvath, I., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., et al. (2001). Synechocystis HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 98(6), 3098-3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.051619498>
- Torrens-Spence, M. P., Bobokalonova, A., Carballo, V., Glinkerman, C. M., Pluskal, T., Shen, A., & Weng, J. -K. (2019). PBS3 and EPS1 Complete Salicylic Acid Biosynthesis from Isochorismate in *Arabidopsis* [Online]. *Molecular Plant*, 12(12), 1577-1586. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.11.005>
- Tuang, Z. K., Wu, Z., Jin, Y., Wang, Y., Oo, P. P. Z., Zuo, G., et al. (2019). Pst DC3000 infection alleviates subsequent freezing and heat injury to host plants via a salicylic acid-dependent pathway in *Arabidopsis* [Online]. *Plant, Cell & Environment*, 43(3), 801-817. <https://doi.org/10.1111/pce.13705>
- Tucuch-Haas, C. J., Pérez-Balam, J. V., Díaz-Magaña, K. B., Castillo-Chuc, J. M., Dzib-Ek, M. G., Alcántar-González, G., et al. (2017). Role of Salicylic Acid in the Control of General Plant Growth, Development, and Productivity [Online]. In *Salicylic Acid: A Multifaceted Hormone* (pp. 1-15). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6068-7_1
- Usman, M. G., Rafii, M. Y., Martini, M. Y., Yusuff, O. A., Ismail, M. R., & Miah, G. (2017). Molecular analysis of Hsp70 mechanisms in plants and their function in response to stress [Online]. *Biotechnology And Genetic Engineering Reviews*, 33(1), 26-39. <https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1340546>
- van Montfort, R. L. M., Basha, E., Friedrich, K. L., Slingsby, C., & Vierling, E. [Online]. *Nature Structural Biology*, 8(12), 1025-1030. <https://doi.org/10.1038/nsb722>
- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., & Morano, K. A. (2012). Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System [Online]. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 76(2), 115-158. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05018-11>
- Vishwakarma, A., Wany, A., Pandey, S., Bulle, M., Kumari, A., Kishorekumar, R., et al. (2019). Current approaches to measure nitric oxide in plants [Online]. *Journal Of Experimental Botany*, 70(17), 4333-4343. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz242>
- Volkov, R. A., Panchuk, I. I., Mullineaux, P. M., & Schöffl, F. (2006). Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* [Online]. *Plant Molecular Biology*, 61(4-5), 733-746. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-0045-4>
- von Koskull-Döring, P., Scharf, K. -D., & Nover, L. (2007). The diversity of plant heat stress transcription factors [Online]. *Trends In Plant Science*, 12(10), 452-457. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.014>
- WAHID, A., GELANI, S., ASHRAF, M., & FOOLAD, M. (2007). Heat tolerance in plants: An overview [Online]. *Environmental And Experimental Botany*, 61(3), 199-223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>
- Wang, D., Heckathorn, S. A., Mainali, K., & Tripathy, R. (2016). Timing Effects of Heat-Stress on Plant Ecophysiological Characteristics and Growth [Online]. *Frontiers In Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01629>
- Wang, L., Guo, Y., Jia, L., Chu, H., Zhou, S., Chen, K., et al. (2014). Hydrogen Peroxide Acts Upstream of Nitric Oxide in the Heat Shock Pathway in *Arabidopsis* Seedlings [Online]. *Plant Physiology*, 164(4), 2184-2196. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229369>
- Wang, L., Ma, K. -B., Lu, Z. -G., Ren, S. -X., Jiang, H. -R., Cui, J. -W., et al. (2020). Differential physiological, transcriptomic and metabolomic responses of *Arabidopsis* leaves under prolonged

warming and heat shock [Online]. *Bmc Plant Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2292-y>

Wang, L., Ma, K. -B., Lu, Z. -G., Ren, S. -X., Jiang, H. -R., Cui, J. -W., et al. (2020). Differential physiological, transcriptomic and metabolomic responses of Arabidopsis leaves under prolonged warming and heat shock [Online]. *Bmc Plant Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2292-y>

Waters, E. R., Lee, G. J., & Vierling, E. (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants [Online]. *Journal Of Experimental Botany*, 47(3), 325-338. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.3.325>

Weigel, R. R., Bäuscher, C., Pfitzner, A. J. P., & Pfitzner, U. M. (2001). NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from Arabidopsis that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. [Online]. *Plant Molecular Biology*, 46(2), 143-160. <https://doi.org/10.1023/A:1010652620115>

Wek, R. C., Jiang, H. -Y., & Anthony, T. G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control [Online]. *Biochemical Society Transactions*, 34(1). <https://doi.org/10.1042/BST20060007>

Wek, R. C., Jiang, H. -Y., & Anthony, T. G. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control [Online]. *Biochemical Society Transactions*, 34(1). <https://doi.org/10.1042/BST20060007>

Weng, J. -K., & Noel, J. P. (2013). The Remarkable Pliability and Promiscuity of Specialized Metabolism [Online]. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology*, 77, 309-320. <https://doi.org/10.1101/sqb.2012.77.014787>

Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence [Online]. *Nature*, 414(6863), 562-565. <https://doi.org/10.1038/35107108>

Wu, D., Chu, H., Jia, L., Chen, K., & Zhao, L. (2015). A feedback inhibition between nitric oxide and hydrogen peroxide in the heat shock pathway in Arabidopsis seedlings [Online]. *Plant Growth Regulation*, 75(2), 503-509. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-0014-x>

Wu, H. -C., & Jinn, T. -L. (2012). Oscillation regulation of Ca²⁺/calmodulin and heat-stress related genes in response to heat stress in rice (*Oryza sativa* L.) [Online]. *Plant Signaling & Behavior*, 7(9), 1056-1057. <https://doi.org/10.4161/psb.21124>

Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., et al. (2012b). The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid [Online]. *Cell Reports*, 1(6), 639-647. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.008>

Xuan, Y., Zhou, S., Wang, L., Cheng, Y., & Zhao, L. (2010). Nitric Oxide Functions as a Signal and Acts Upstream of AtCaM3 in Thermotolerance in Arabidopsis Seedlings [Online]. *Plant Physiology*, 153(4), 1895-1906. <https://doi.org/10.1104/pp.110.160424>

Xue, G. -P., Sadat, S., Drenth, J., & McIntyre, C. L. (2014). The heat shock factor family from *Triticum aestivum* in response to heat and other major abiotic stresses and their role in regulation of heat shock protein genes [Online]. *Journal Of Experimental Botany*, 65(2), 539-557. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert399>

Yang, H., Mu, J., Chen, L., Feng, J., Hu, J., Li, L., et al. (2015). S-Nitrosylation Positively Regulates Ascorbate Peroxidase Activity during Plant Stress Responses [Online]. *Plant Physiology*, 167(4), 1604-1615. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255216>

Yang, W., Sun, Y., Chen, S., Jiang, J., Chen, F., Fang, W., & Liu, Z. (2011). The effect of exogenously applied nitric oxide on photosynthesis and antioxidant activity in heat stressed chrysanthemum [Online]. *Biologia Plantarum*, 55(4), 737-740. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0178-4>

Yang, W., Sun, Y., Chen, S., Jiang, J., Chen, F., Fang, W., & Liu, Z. (2011). The effect of exogenously applied nitric oxide on photosynthesis and antioxidant activity in heat stressed chrysanthemum [Online]. *Biologia Plantarum*, 55(4), 737-740. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0178-4>

Yang, X., Zhu, W., Zhang, H., Liu, N., & Tian, S. (2016). Heat shock factors in tomatoes: genome-wide identification, phylogenetic analysis and expression profiling under development and heat stress [Online]. *Peerj*, 4. <https://doi.org/10.7717/peerj.1961>

- Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., et al. (2011). Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression [Online]. *Molecular Genetics And Genomics*, 286(5-6), 321-332. <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0647-7>
- Yu, J., Cheng, Y., Feng, K., Ruan, M., Ye, Q., Wang, R., et al. (2016). Genome-Wide Identification and Expression Profiling of Tomato Hsp20 Gene Family in Response to Biotic and Abiotic Stresses [Online]. *Frontiers In Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01215>
- Yu, W., Wang, L., Zhao, R., Sheng, J., Zhang, S., Li, R., & Shen, L. (2019). Knockout of SIMAPK3 enhances tolerance to heat stress involving ROS homeostasis in tomato plants [Online]. *Bmc Plant Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1939-z>
- Yu, W., Wang, L., Zhao, R., Sheng, J., Zhang, S., Li, R., & Shen, L. (2019). Knockout of SIMAPK3 enhances tolerance to heat stress involving ROS homeostasis in tomato plants [Online]. *Bmc Plant Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1939-z>
- Yue, H., Nie, X., Yan, Z., & Weining, S. (2019). N6-methyladenosine regulatory machinery in plants: composition, function and evolution [Online]. *Plant Biotechnology Journal*, 17(7), 1194-1208. <https://doi.org/10.1111/pbi.13149>
- Yun, B. -W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N. B. B., Le Bihan, T., Yu, M., et al. (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity [Online]. *Nature*, 478(7368), 264-268. <https://doi.org/10.1038/nature10427>
- Zhang, J., Du, X., Wang, Q., Chen, X., Lv, D., Xu, K., et al. (2010). Expression of pathogenesis related genes in response to salicylic acid, methyl jasmonate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd [Online]. *Bmc Research Notes*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-208>
- Zhang, J., Du, X., Wang, Q., Chen, X., Lv, D., Xu, K., et al. (2010). Expression of pathogenesis related genes in response to salicylic acid, methyl jasmonate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd [Online]. *Bmc Research Notes*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-208>
- Zhang, W., Zhou, R. -G., Gao, Y. -J., Zheng, S. -Z., Xu, P., Zhang, S. -Q., & Sun, D. -Y. (2009). Molecular and Genetic Evidence for the Key Role of AtCaM3 in Heat-Shock Signal Transduction in Arabidopsis [Online]. *Plant Physiology*, 149(4), 1773-1784. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133744>
- Zhang, X., Kim, W. -S., Hatcher, N., Potgieter, K., Moroz, L. L., Gillette, R., & Sweedler, J. V. (2002). Interfering with Nitric Oxide Measurements [Online]. *Journal Of Biological Chemistry*, 277(50), 48472-48478. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209130200>
- Zhang, X., Wang, W., Kang, X., & Zhao, L. (2020). Arabidopsis CaM3 inhibits nitric oxide accumulation and improves thermotolerance by promoting S-nitrosoglutathione reductase via direct binding [Online]. *Plant Growth Regulation*, 90(1), 41-50. <https://doi.org/10.1007/s10725-019-00552-9>
- Zhao, C., Liu, B., Piao, S., Wang, X., Lobell, D. B., Huang, Y., et al. (2017). Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 114(35), 9326-9331. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701762114>
- Zheng, S. -Z., Liu, Y. -L., Li, B., Shang, Z. -lin, Zhou, R. -G., & Sun, D. -Y. (2012). Phosphoinositide-specific phospholipase C9 is involved in the thermotolerance of Arabidopsis [Online]. *The Plant Journal*, 69(4), 689-700. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04823.x>
- Zheng, Z., Qualley, A., Fan, B., Dudareva, N., & Chen, Z. (2009). An important role of a BAHD acyl transferase-like protein in plant innate immunity [Online]. *The Plant Journal*, 57(6), 1040-1053. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03747.x>
- Zhu, J. -K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants [Online]. *Cell*, 167(2), 313-324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- Zottini, M., Costa, A., De Michele, R., Ruzzene, M., Carimi, F., & Lo Schiavo, F. (2007). Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in Arabidopsis [Online]. *Journal Of Experimental Botany*, 58(6), 1397-1405. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm001>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AA/BIS	Akrylamid-N,N'-bisakrylamid APS
APS	Persíran amonný
APX	Askorbátperoxidáza
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
BSA	Hovädzí sérový albumín
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cGMP	Cyklický guanozínmonofosfát
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
HS	Teplotný stres
HSE	Element teplotného šoku
HSF	Faktor teplotného šoku
HSP	Proteíny teplotného šoku
HSR	Odpoveď na teplotný stres
MAPK	Mitogenom aktivovaná proteinkináza
NBT	Nitroblue tetrazolium chlorid
NPR-1	Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1
PTIO	2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl 3-oxid
RBOH	respiratory burst oxidase homologs, NADPH oxidázy
RNS	Reaktívne formy dusíka
ROS	Reaktívne formy kyslíka
RUBISCO	Ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza
SA	Kyselina salicylová
SAR	Systémová získaná rezistencia
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Polyakrylamidová elektroforéza v prítomnosti SDS
SNP	Nitroprussid sodný
sHSP	Malé proteíny teplotného šoku
TBS	Tris-buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylenediamin