

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Alžběta Lengálová

Detekce proteinu Hsp70 v rostlinách vystavených různým stresovým faktorům.

Detection of Hsp70 protein in plants exposed to various stress conditions.

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Veronika Hýsková, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Veroniky Hýskové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: _____

Podpis: _____

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce RNDr. Veronice Doubnerové, Ph.D. za odborné rady, ochotu a trpělivost při řešení této bakalářské práce. Děkuji také doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za veškeré poskytnuté rady. Můj dík patří také doc. RNDr. Noemi Čerovské, CSc. a Renatě Hadámkové z Ústavu experimentální botaniky AV ČR za poskytnutí rostlinného a infekčního materiálu a za pomoc s pěstováním rostlin tabáku. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, zvláště mé mamince a sestře, za všestrannou podporu a pomoc v průběhu mého studia.

Abstrakt

Rostliny musí neustále čelit působení mnoha různých stresových faktorů. Jako sesilní organismy nemohou rostliny nepříznivým podmínkám uniknout a musely si proto vyvinout specifické obranné mechanismy. Většina studií se zabývá reakcí rostlin na jeden typ stresu, v přírodě se ale rostlina musí vyrovnávat s mnoha stresovými faktory najednou. V této práci byl sledován vliv abiotického stresu v podobě teplotního šoku na rozvoj infekce vyvolané Y virem bramboru (PVY) v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* L.). Teplotní šok je jednoznačně spojen se syntézou proteinu Hsp70, který má ve stresových podmínkách mnoho důležitých funkcí, které zmírňují důsledky působení stresu (podílí se například na opětovném sbalování nebo degradaci poškozených proteinů a syntéze proteinů *de novo*). Působení proteinu Hsp70 v průběhu virové infekce však není zcela objasněno, některé studie dokazují jejich účast při multiplikaci a šíření virových částic v rostlině. V prvním pokusu provedém v rámci této práce byl imunochemickou detekcí zjištěn vyšší obsah viru PVY^{NTN} v rostlinách tabáku, které byly po infikování vystaveny teplotnímu šoku, než v rostlinách pouze infikovaných. Obsah viru odpovídal množství proteinu Hsp70 detekovaného imunochemicky pomocí specifické protilátky. Odpověď rostliny na kombinaci teplotního šoku s virovou infekcí je pravděpodobně složitým procesem, který závisí nejen na vhodném načasování působení teplotního šoku, ale také na charakteru a závažnosti virové infekce. V této práci byl proto současně sledován obecný případ indukce proteinů Hsp70 solným stresem v rostlinách okurky (*Cucumis sativa* L.). V listech stresovaných rostlin došlo k postupnému nárůstu množství proteinu Hsp70 v průběhu působení solného stresu.

Klíčová slova:

Hsp70, teplotní stres, biotický stres, Y virus bramboru, solný stres, *Nicotiana tabacum* L., *Cucumis sativa* L.

Abstract

Plants are continuously exposed to various stress conditions. Being sessile, they are not able to escape from adverse conditions. Therefore, they have developed specific defence mechanisms. Most studies focus on plant responses to a single type of stress. However, plants in nature must cope with a variety of stresses at the same time. In this work, the effects of heat shock on the interaction of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) with the *Potato virus Y* (PVY) were investigated. Obviously, heat stress is associated with the synthesis of Hsp70 protein, which has many important functions alleviating adverse effects of stress conditions (e.g. Hsp70 participates in refolding or degradation of damaged proteins and protein synthesis *de novo*). The effect of Hsp70 during viral infection is still not fully understood, some studies revealed Hsp70 as a part of viral multiplication and transport processes in plant. In the first experiment performed in this work, higher levels of PVY^{NTN} virus was found in tobacco plants that have been exposed to heat shock after inoculation than in plants only infected. The amount of the virus corresponded with the amount of Hsp70 protein detected immunochemically using a specific antibody. It seems that the plant response to combination of heat stress with viral infection is a complex process that depends not only on the appropriate timing of the heat shock, but also on the nature and severity of the viral infection. Therefore, in this study the general case of induction of Hsp70 caused by salt stress was simultaneously monitored in cucumber (*Cucumis sativa* L.). The amount of Hsp70 protein in the leaves of stressed plants has been gradually increasing during salt stress conditions.

Keywords:

Hsp70, heat stress, biotic stress, *Potato virus Y*, salt stress, *Nicotiana tabacum* L., *Cucumis sativa* L.

OBSAH

1. Úvod	5
1.1 Kombinovaný stres rostlin	5
1.1.1 Interakce biotického a abiotického stresu rostlin	7
1.1.2 Interakce teplotního stresu a virové infekce	8
1.1.2.1 Biotický stres vyvolaný rostlinnými viry	8
1.1.2.2 Abiotický stres způsobený teplotním šokem	10
1.2 Solný stres	11
1.3 Heat-shock proteiny	11
1.3.1 Proteiny Hsp70	13
1.3.2 Interakce proteinů Hsp70 s rostlinnými viry	16
1.4 Metabolická odpověď rostlin na stres	17
2. Cíl práce	20
3. Materiál a metody	21
3.1 Použité přístroje	21
3.2 Chemikálie	21
3.3 Rostlinný materiál	23
3.4 Protilátky a infekční materiál	23
3.5 Experimentální metody	24
3.5.1 Pěstování experimentálních rostlin, provedení pokusu a odběr vzorků	24
3.5.1.1 Pěstování rostlin tabáku pro studium vlivu biotického a teplotního stresu	24
3.5.1.2 Pěstování rostlin okurky seté pro studium vlivu solného stresu	25
3.5.2 Příprava rostlinného extraktu	26

3.5.3	Elektroforetické metody	26
3.5.3.1	Příprava vzorků pro SDS elektroforézu	26
3.5.3.2	Provedení SDS elektroforézy	27
3.5.3.3	Stanovení množství rozpustných proteinů Lowryho metodou	27
3.5.3.4	Detekce bílkovin po SDS elektroforéze	28
3.5.4	Imunochemické metody	28
3.5.4.1	ELISA	28
3.5.4.2	Imunochemická detekce proteinu Hsp70	30
4.	Výsledky	32
4.1	Teplotní stres a virová infekce v rostlinách tabáku	32
4.1.1	Vliv teplotního stresu a virové infekce na množství PVY ^{NTN}	32
4.1.2	Vliv teplotního stresu a virové infekce na množství proteinu Hsp70	34
4.1.3	Vliv teplotního stresu a virové infekce na množství proteinů detekovaných CBB v gelu po SDS-PAGE	37
4.1.4	Vliv biotického a teplotního stresu na množství rozpustných proteinů	38
4.2	Solný stres v rostlinách okurky	40
4.2.1	Vliv solného stresu na množství proteinu Hsp70	40
4.2.2	Vliv solného stresu na množství proteinů detekovaných CBB v gelu po SDS-PAGE	42
4.2.3	Vliv solného stresu na množství rozpustných proteinů	44
5.	Diskuze	46
6.	Závěr	48
	Seznam použité literatury	49

Seznam použitých zkratk a značek

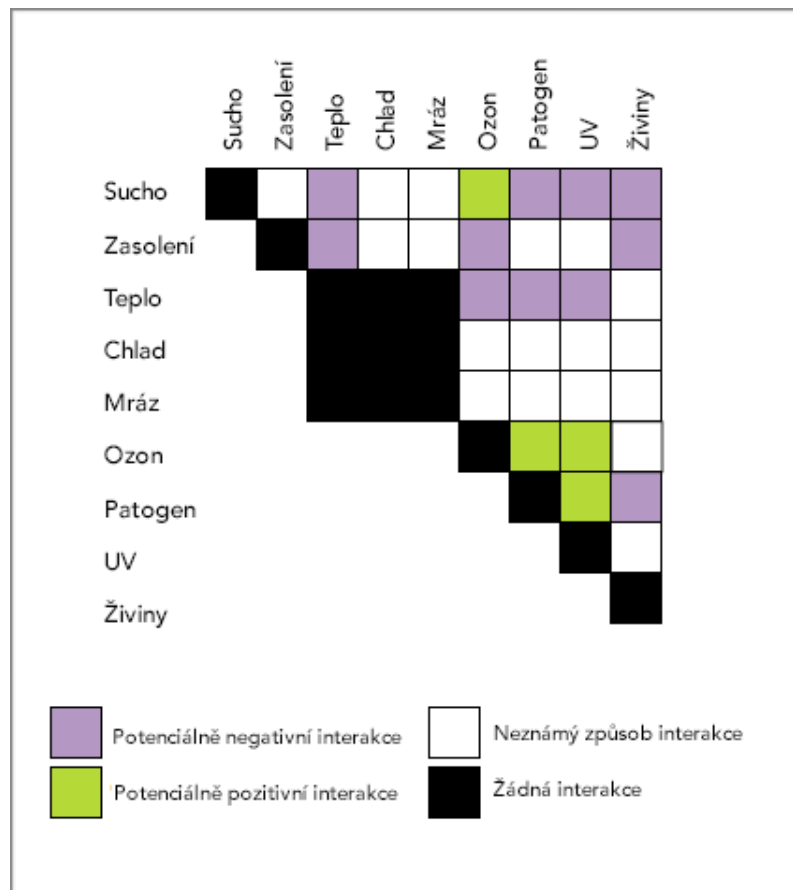
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BSA	hovězí sérový albumin (<i>z angl. Bovine serum albumine</i>)
C ₃ rostliny	rostliny, jejichž prvním fotosyntetickým produktem je tříuhlíkatá látka (3-fosfoglycerát)
C ₄ rostliny	rostliny, jejichž prvním fotosyntetickým produktem je čtyřuhlíkatá látka (oxalacetát)
CAM	metabolismus rostlin z čeledi tučnolistých (<i>z angl. Crassulacean acid metabolism</i>)
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
ELISA	imunochemická metoda (<i>z angl. Enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
HSF	transkripční faktory teplotního šoku
Hsp	proteiny teplotního šoku (<i>angl. Heat-Shock proteins</i>)
K	kontrolní skupina rostlin okurky
K ₂₀	kontrolní skupina rostlin tabáku
K ₄₀	skupina rostlin tabáku vystavených pouze teplotnímu šoku
MP	<i>z angl. movement proteins</i>
NADP-ME	NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukovaný)
NBT	Nitroblue tetrazolium chlorid
PEPC	fosfoenolpyruvátcarboxylasa
PPDK	pyruvát, fosfátdikinasa
PVP	polyvinylpolypyrrolidon

PVY	Y virus bramboru
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>z angl. Reactive oxygen species</i>)
Rubisco	ribulosabisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
SDS	dodecylsulfát sodný (<i>z angl. Sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (<i>z angl. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	polyoxyethylensorbitanmonolaurát
Y ₂₀	skupina rostlin tabáku pouze infikovaných PVY ^{NTN}
Y ₄₀	skupina rostlin tabáku nejprve infikovaných PVY ^{NTN} , poté vystavených teplotnímu šoku

1. ÚVOD

1.1 Kombinovaný stres rostlin

Většina studií se zabývá reakcí rostlin na jeden typ stresu. V přírodě se ale rostlina musí vyrovnávat s mnoha stresovými faktory najednou [1]. Nedávné studie dokazují, že rostliny reagují na působení několika stresů najednou odlišně než na působení pouze jednoho typu stresu. Dochází u nich k aktivaci specifických signalizačních a regulačních kaskád jako odpověď na konkrétní vnější podmínky, kterým jsou rostliny vystaveny [2]. Je například známo, že stres způsobený teplem a suchem působí větší poškození rostlin a hospodářské ztráty, než když tyto stresové faktory působí zvlášť [3]. Důležitost studia kombinace různých stresových faktorů ukázal i výzkum transgenních rostlin. Byly vyvinuty rostliny odolné vůči jednomu typu stresu, avšak o to náchylnější byly tyto rostliny vůči působení jiného stresového faktoru [2]. Z tohoto důvodu je důležité posuzovat společný účinek stresových faktorů jako zcela nový typ stresu. Možné interakce mezi různými biotickými a abiotickými faktory naznačuje obr. 1 (*str. 6*) Efekty kombinovaného stresu se však mohou lišit v závislosti na intenzitě působení různých stresů, na druhu rostliny, na druhu patogenu apod. [4].



Obr. 1: Kombinace stresových faktorů (“Stresová matice”). Různé interakce jsou barevně odlišeny. Potenciálně negativní interakce (tj. zvýšené poškození nebo letalita) jsou značeny fialovou barvou. Potenciálně pozitivní efekty kombinace dvou stresů (tj. vzájemná ochrana při působení kombinovaného stresu) jsou značeny zeleně. Bílá barva značí kombinace dvou stresů, u kterých není zatím známý výsledek jejich společného působení. U některých stresů nedochází k žádné interakci (černá barva). Převzato a upraveno dle [4].

Život rostlin ovlivňuje celá řada abiotických a biotických stresových faktorů [1]. Abiotický stres je způsoben chemickými a fyzikálními stresovými faktory, jako je například teplo, sucho nebo vysoká koncentrace solí. Biotický stres způsobuje celá řada potenciálních patogenů, jako jsou houby, bakterie, viry a další [5]. Studium metabolismu rostlin vystavených stresu nabývá v poslední době stále většího významu.

1.1.1 Interakce biotického a abiotického stresu rostlin

Odpovědi rostlin na různé formy stresu jsou velmi složité procesy, neboť zahrnují jak změny na úrovni transkripce, tak změny buněčné a fyziologické. Přítomnost abiotického stresu při současném působení stresu biotického má často za následek snížení či zvýšení schopnosti rostliny bránit se patogenům v závislosti na povaze a závažnosti jednotlivých stresů. A naopak vystavení rostliny působení patogenu může zvýraznit efekt působení abiotických stresových faktorů [2].

V tabulce I jsou uvedeny příklady kombinací abiotických a biotických stresů, kdy působení abiotického stresu způsobilo potlačení obranné reakce a mělo za následek větší náchylnost rostlin vůči patogenům. Tabulka II (str. 8) shrnuje výsledky studií, které dokazují, že abiotický stres může interagovat se stresem biotickým i pozitivně a vést naopak ke zvýšené odolnosti rostlin vůči patogenům.

Tabulka I

Příklady abiotických stresů, u kterých bylo zjištěno, že jejich působení negativně ovlivňuje odolnost rostlin vůči patogenům.

Abiotický stres	Patogen	Rostlina	Reference
vysoké teploty	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	[6]
		<i>Nicotiana benthamiana</i>	
sucho	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	[7]
sucho	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	[8]

Tabulka II

Příklady abiotických stresů, u kterých bylo zjištěno, že jejich působení pozitivně ovlivňuje odolnost rostlin vůči patogenům.

Abiotický stres	Patogen	Rostlina	Reference
solný stres	<i>Blumeria graminis</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	[9]
sucho	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	[10]
	<i>Oidium neolycopersici</i>		
vysoké teploty	virus chlorotické skvrnitosti jabloně (ACLSV) <i>Apple chlorotic leafspot virus</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	[11]
	virus žlábkovitosti kmene jabloně (ASGV) <i>Apple stem grooving virus</i>		

1.1.2 Interakce teplotního stresu a virové infekce

V této práci byl sledován vliv abiotického stresu v podobě teplotního šoku, vliv stresu biotického vyvolaného infekcí Y virem bramboru (PVY) a jejich kombinace. Je zřejmé, že zvýšená teplota má v mnoha případech vliv na odpověď rostlin na další typy stresu, především biotických [1].

1.1.2.1 Biotický stres vyvolaný rostlinnými viry

Viry jsou malé, nebuněčné organismy, které se mohou replikovat pouze v živých buňkách. Využívají přitom proteosyntetický aparát hostitele. Rostlinné viry napadají rostliny, houby, sinice a řasy. Je jich známo asi 600 druhů. Rozvoj virové infekce v rostlinném organismu se projevuje omezením růstu rostliny, žloutnutím listů, nekrotizací, tvorbou mozaiky na listech apod. [12].

Rostlinné viry se v hostitelském organismu šíří několika způsoby. Nejčastější je pohyb z buňky do buňky pomocí plasmodesmů, unikátních mezibuněčných spojů rostlin. Tento pohyb jim umožňují virově kódované proteiny, tzv. *movement proteiny* (MP). Tyto proteiny způsobují modifikaci a rozšíření plasmodesmů a usnadňují pohyb virové částice do sousední buňky [13]. Ukázalo se, že viry musí využívat aktivní mechanismus také k transportu z místa jejich replikace k plasmodesmům. Viry jsou příliš velké na to, aby mohly pronikat nemodifikovanými plasmodesmy, stejně tak nemohou kvůli své velikosti volně difundovat cytoplasmou buňky. Poměrně nedávno bylo zjištěno, že intracelulárního transportu virových částic se kromě MP proteinů účastní i další virové proteiny související primárně s replikací nebo genovou expresí [14].

U živočichů se v průběhu vývoje vyvinula jako obrana proti virům soustava specializovaných buněk - imunitní systém. Ten však rostliny nemají a proto se musí těmto patogenům bránit jinak. Rostlinné buňky jsou před vstupem patogenu chráněny buněčnou stěnou. Ochranu tvoří také vosková vrstva na pokožce rostliny [15]. Viry touto bariérou nemohou pronikat. Pro jejich vstup je nezbytné mechanické poranění nebo se mohou do rostlinného organismu dostat také pomocí přenašečů, např. mšic [13]. Vosková kutikulární vrstva na povrchu rostlinného těla je pasivní ochranou proti patogenům, které nejsou specializované na napadení specifického hostitele [15]. Rostliny se brání také tvorbou antimikrobiálních látek. Tyto mechanismy poskytují preventivní ochranu před napadením patogenem, existují však i obranné reakce vyvolané až vniknutím patogenu do rostlinného organismu. Mezi tyto obranné reakce patří především tvorba reaktivních forem kyslíku, syntéza oxidu dusnatého, otevření iontových kanálů, modifikace proteinů fosforylací a hypersenzitivní reakce. Hypersenzitivní reakce je příkladem programované buněčné smrti. Dochází k usmrcení rostlinných buněk v místě infekce a v jeho blízkosti za účelem omezení šíření patogenu. Napadení rostliny patogenem může také vyvolat aktivaci transkripce řady genů souvisejících s obranou a změny v primárních a sekundárních metabolických drahách [16, 17]. Pro obranu proti virům jsou důležité také molekulární procesy jako jsou ubiquitin-proteasomový systém, methylace DNA a tzv. umlčování genů (*angl. gene silencing*) [18].

Y virus bramboru

V této práci byl pro infikování rostlin použit Y virus bramboru, kmen NTN (PVY^{NTN}). Tento virus patří do rodu *Potyvirus* (čeleď *Potyviridae*), největší a nejničivější skupiny rostlinných virů [5]. Tento virus byl poprvé popsán v roce 1931. Napadá širokou škálu hostitelů a je rozšířen po celém světě. Existují různé kmeny tohoto viru, které se liší na biologické i molekulární úrovni. Do jednotlivých skupin proto byly rozděleny podle symptomů, které vyvolávají v hostitelském organismu. Kmen PVY^O způsobuje mozaiky na listech tabáku a brambor. Kmen PVY^N je zodpovědný za úplnou nebo částečnou nekrózu listů infikovaného hostitele. Později byly popsány nové kmeny, jako například PVY^{NTN}, který může vyvolat nekrózu hlíz brambor [19]. V hostitelské rostlině *Nicotiana tabacum* L., která byla použita v této práci, způsobuje PVY^{NTN} nekrotické léze [5].

1.1.2.2 Abiotický stres způsobený teplotním šokem

Teplotní stres ovlivňuje mnoho fyziologických procesů rostlin. Omezuje růst rostlin, poškozuje membrány, vede k metabolické nerovnováze a snižuje odolnost rostlin vůči chorobám [1, 20]. V důsledku skleníkového efektu se neustále zvyšuje průměrná teplota povrchu Země a živé organismy jsou tak vystavovány stále vyšším teplotám. Velmi citlivé na změny teplot jsou právě rostliny. Ty dokážou rozlišit i tak nepatrné rozdíly jako je změna teploty o 1 °C [1]. Teplotní změny mohou ovlivnit metabolismus rostlin a jejich obranné mechanismy. Teplotní stres nepříznivě ovlivňuje mnohé procesy probíhající v rostlinné buňce. Vede ke ztrátě integrity membrán, destabilizaci RNA a bílkovin, změnám struktur cytoskeletu, tvorbě reaktivních forem kyslíku a metabolické nerovnováze [20]. Tyto změny často vedou k programované buněčné smrti [1]. Jednotlivé druhy rostlin reagují na abiotický stres odlišně a vždy se jedná o složitý komplex několika jevů [21].

Na abiotický stres, zejména stres teplotní, jsou citlivé některé významné enzymy jako například enzymy Calvinova cyklu. Systém asimilace uhlíku je tudíž silně inhibován i při mírných změnách teploty. Přestože Rubisco sám o sobě je enzym velmi termostabilní,

ovlivňuje zvýšení teploty poměr jeho karboxylasové a oxygenasové aktivity, což vede ke zvýšení fotorespirace a snížení účinnosti fotosyntézy [20]. Teplotní stres je spojen i s dalšími stresovými faktory, a to především se stresem způsobeným nedostatkem vody. Vysokým teplotám se rostliny brání zvýšenou transpirací, to je ale v suchých podmínkách velmi nevýhodné, protože rostlina otevřenými průduchy ztrácí vodu, které má už tak nedostatek [2]. Čím je teplota vyšší, tím více vody rostlina ztrácí. Při asimilaci oxidu uhličitého (kdy rostlina musí mít otevřené průduchy) se ztráta vody vlivem vysokých teplot stává vážným problémem.

1.2 Solný stres

Vysoká koncentrace solí vede k poklesu vodního potenciálu, a tím ke sníženému příjmu vody prostřednictvím kořenů, způsobuje pokles turgoru, uzavírání průduchů, čímž se snižuje dostupnost CO₂ pro Rubisco [22]. Solný stres způsobuje další významné změny na metabolické a transkripční úrovni, které mohou ve výsledku ovlivňovat růst a vývoj rostlin [23]. Vysoká salinita zvyšuje respiraci a produkci reaktivních forem kyslíku, a tím zvyšuje riziko oxidativního stresu. Vedle oxidativního stresu vyvolává solný stres také osmotický stres a způsobuje narušení iontové a redoxní rovnováhy uvnitř buňky. Rostlina se snaží osmotickému stresu bránit syntézou osmoticky aktivních látek (sacharidů, cukerných alkoholů, aminokyselin a polyaminů) nebo specifických proteinů, včetně Hsp [24].

1.3 Heat-shock proteiny

V odpovědi rostliny na stres je velmi důležitá funkce proteinů teplotního šoku (Hsp, *angl. heat-shock proteins*). V každé buňce je obvykle poměrně vysoká koncentrace proteinů, proto je důležité, aby nově syntetizované proteiny byly správně sbaleny. Naopak transport proteinů do příslušných buněčných kompartmentů vyžaduje, aby byl protein v nascentním, nesbaleném stavu. Všechny živé buňky si vyvinuly systém, který jim pomáhá při správném

sbalování a transportu proteinů syntetizovaných *de novo* [20]. Tyto systémy zahrnují molekulární chaperony, označované také jako proteiny teplotního šoku (Hsp). Tyto proteiny totiž byly poprvé identifikovány jako proteiny, jejichž koncentrace v rostlinné buňce výrazně roste vlivem zvýšených teplot [1, 25]. Zvýšená teplota způsobuje změny v prostorovém uspořádání proteinů a způsobuje tak jejich částečnou nebo úplnou denaturaci. Proto jsou za těchto podmínek nároky na množství molekulárních chaperonů vyšší [25], [20]. Zvýšená syntéza proteinů teplotního šoku je spojena i s dalšími typy stresu, jako je chlad, sucho, vysoká koncentrace solí, těžkých kovů, volných radikálů a vysoká intenzita UV záření [20, 26].

Rostlinné Hsp proteiny působí jako molekulární chaperony [1]. Asistují při opravách chybně sbalených a částečně denaturovaných proteinů a podílí se také na degradaci denaturovaných proteinů. Vážou se na nově syntetizované nascentní proteiny a chrání je tak před jejich předčasným sbalením nebo během transportu do příslušného buněčného kompartmentu [2]. Zmírňují tak nepříznivé účinky abiotického stresu a hrají důležitou roli při obnovení buněčné homeostázy [26, 27].

Exprese proteinů Hsp je regulována transkripčními faktory teplotního šoku (HSF, *angl. heat shock transcription factors*). Existují tři mechanismy, které vysvětlují, jakým způsobem regulace syntézy Hsp proteinů probíhá. Zaprvé mohou být Hsp zvýšenou teplotou aktivovány přímo. Druhý mechanismus předpokládá, že jako signál pro aktivaci syntézy Hsp působí denaturované proteiny, které vznikají působením zvýšené teploty. Třetí mechanismus vysvětluje aktivaci Hsp jako odpověď na rychlé, reverzibilní změny ve fluiditě membrán, které způsobuje zvýšená teplota [20].

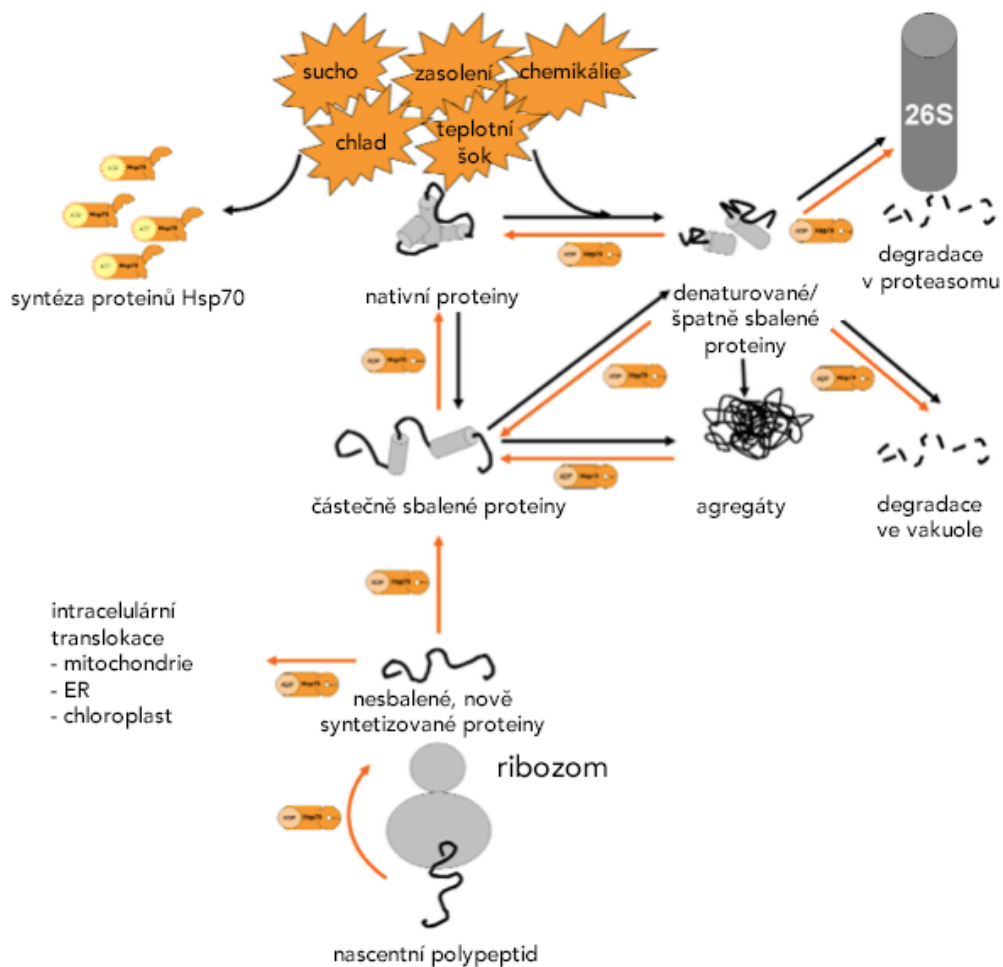
Hsp proteiny se dříve dělily do skupin na základě jejich relativní molekulové hmotnosti, dnes se dělí podle strukturní homologie. Rozlišujeme šest hlavních skupin proteinů teplotního šoku: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 (chaperoniny), Hsp40 a malé Hsp [26, 25]. Existují však i další proteiny, které mají funkci chaperonů, jako například disulfidisomerasa, kalnexin a kalretikulin, které asistují při sbalování proteinů v endoplasmatickém retikulu [27].

Proteiny Hsp se vyskytují jak v cytoplasmě, tak v buněčných organelách (v jádře, mitochondriích, chloroplastech a endoplasmatickém retikulu). Jednotlivé třídy proteinů Hsp mají různé funkce, zdá se však, že velmi důležitá je hlavně spolupráce mezi nimi. Nejlépe prostudované jsou skupiny Hsp70 a chaperoniny [27]. Tato práce se zabývá skupinou proteinů Hsp70.

1.3.1 Proteiny Hsp70

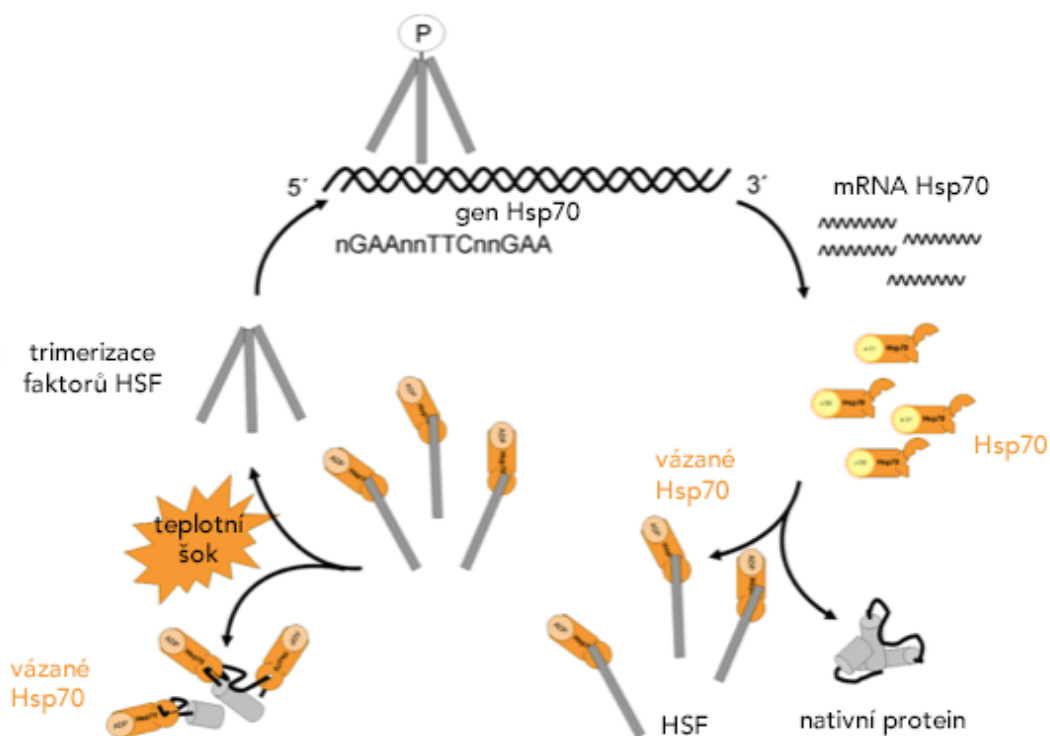
Proteiny Hsp70 jsou pravděpodobně jedny z nejvíce konzervovaných proteinů ve všech organismech od bakterií po rostliny a živočichy. Rostlinné Hsp70 jsou kódovány celou genovou rodinou a jsou přítomny ve většině buněčných kompartmentů [20]. Některé proteiny Hsp70 jsou exprimovány konstitutivně, jiné pouze je-li organismus vystaven působení stresu [28]. Jednotlivé Hsp70 mají různé funkce a ovlivňují růst a vývoj rostlinného organismu během normálních i stresových podmínek [20, 27].

Syntézu Hsp70 indukují především abiotické stresové faktory (např. sucho, chlad, vysoká koncentrace solí, zvýšená teplota nebo působení toxických látek), které současně zvyšují pravděpodobnost výskytu chybně sbalených, částečně nebo úplně denaturovaných proteinů (obr. 2, *str.* 14). Proteiny Hsp70 napomáhají sbalování nově syntetizovaných proteinů, účastní se opětovného sbalení chybně sbalených proteinů a brání agregaci proteinů [28]. Hsp70 chrání proteiny před nesprávným sbalením a agregací tím, že se vážou na jejich hydrofobní části, a tak zamezí interakci mezi nimi. Hsp70 také brání sbalování proteinů, které jsou určeny pro translokaci do konkrétního buněčného kompartmentu a musí tedy zůstat nesbalené, dokud nejsou přeneseny přes membránu [29]. Hsp70 se tedy podílí i na importu a translokaci proteinů do buněčných organel nebo ven z buňky [28]. Usnadňují také proteolytickou degradaci denaturovaných proteinů [25, 27] a hrají roli při pohybu proteinů a virů z buňky do buňky pomocí plasmodesmů [30]. Vazbě Hsp70 na protein a jeho následnému uvolnění napomáhají další proteiny (například Hsp40), tyto procesy navíc vyžadují dodání energie ve formě ATP [29].



Obr. 2: Úloha Hsp70 ve sbalování, opravě a degradaci proteinů během působení stresu. Černé šipky naznačují, jaký vliv mají různé abiotické stresové faktory na proteiny. Dráhy, kterých se účastní Hsp70, jsou označeny oranžovými šipkami. Proteiny Hsp70 pomáhají při sbalování nově syntetizovaných proteinů, při jejich intracelulárním transportu a účastní se oprav chybně sbalených proteinů. Pokud není možné poškozené proteiny opravit, směřují je Hsp70 do proteasomu nebo vakuoly k degradaci. Převzato a upraveno dle [20].

Obr. 3 (str. 15) zobrazuje mechanismus regulace exprese proteinů Hsp70. Na Hsp70 jsou za normálních okolností vázány faktory HSF. Objeví-li se v buňce denaturované proteiny, Hsp70 od faktorů HSF disociují a pomáhají denaturované proteiny degradovat. Volné faktory HSF pak trimerizují, jsou fosforylovány a vážou se na DNA. Tato vazba způsobí přepis genů do mRNA Hsp70 a její překlad do proteinu. Nové Hsp70 se vážou na faktory HSF, a tím brání jejich další trimerizaci [20].



Obr. 3: Schéma aktivace exprese proteinů Hsp70. Pokud rostlina není vystavena teplotnímu šoku, jsou faktory HSF (znázorněny šedě) vázány na Hsp70 (znázorněny oranžově). Po působení teplotního šoku jsou Hsp70 odváděny k denaturovaným proteinům a volné faktory HSF mohou trimerizovat. Následuje fosforylace a vazba na specifické místo v DNA kódující proteiny Hsp70. Nově vzniklé Hsp70 se opět vážou na faktory HSF, což vede k negativní zpětnovazebné regulaci aktivity faktorů HSF. Převzato a upraveno dle [20].

Přesný mechanismus, jakým jsou proteiny Hsp70 regulovány při působení stresových podmínek, není dosud úplně znám [1]. Celá řada abiotických i biotických stresových faktorů (např. zvýšená teplota, nedostatek nebo přebytek vody, vysoká koncentrace iontů, osmolytů nebo toxických látek) vyvolává expresi Hsp70. Působení těchto proteinů vede ke zvýšené odolnosti vůči solnému a teplotnímu stresu a stresu způsobenému nedostatkem vody [1, 27, 28, 31].

1.3.2 Interakce proteinů Hsp70 s rostlinnými viry

Cílem této práce bylo zjistit, jak ovlivňuje teplotní šok rozvoj virové infekce. Teplotní šok je jednoznačně spojen se zvýšenou syntézou proteinu Hsp70 a zdá se, že tento protein má vliv na infekci způsobenou rostlinnými viry. Nedávno provedené studie dokazují, že proteiny Hsp70 asistují při skládání virové částice a šíření virů z buňky do buňky [32]. V tabulce III jsou uvedeny příklady studií, které dokazují, že interakce rostlinných virů s Hsp70 vede k lepšímu šíření viru v rostlině, a tím rychlejšímu rozvoji virové infekce. Z výsledků jiných studií však vyplývá, že virová infekce vede k poklesu množství Hsp70 [33]. Stále tedy není jasné, zda Hsp70 přispívají k rozvoji virové infekce, nebo pomáhají rostlině se této infekci bránit.

TABULKA III

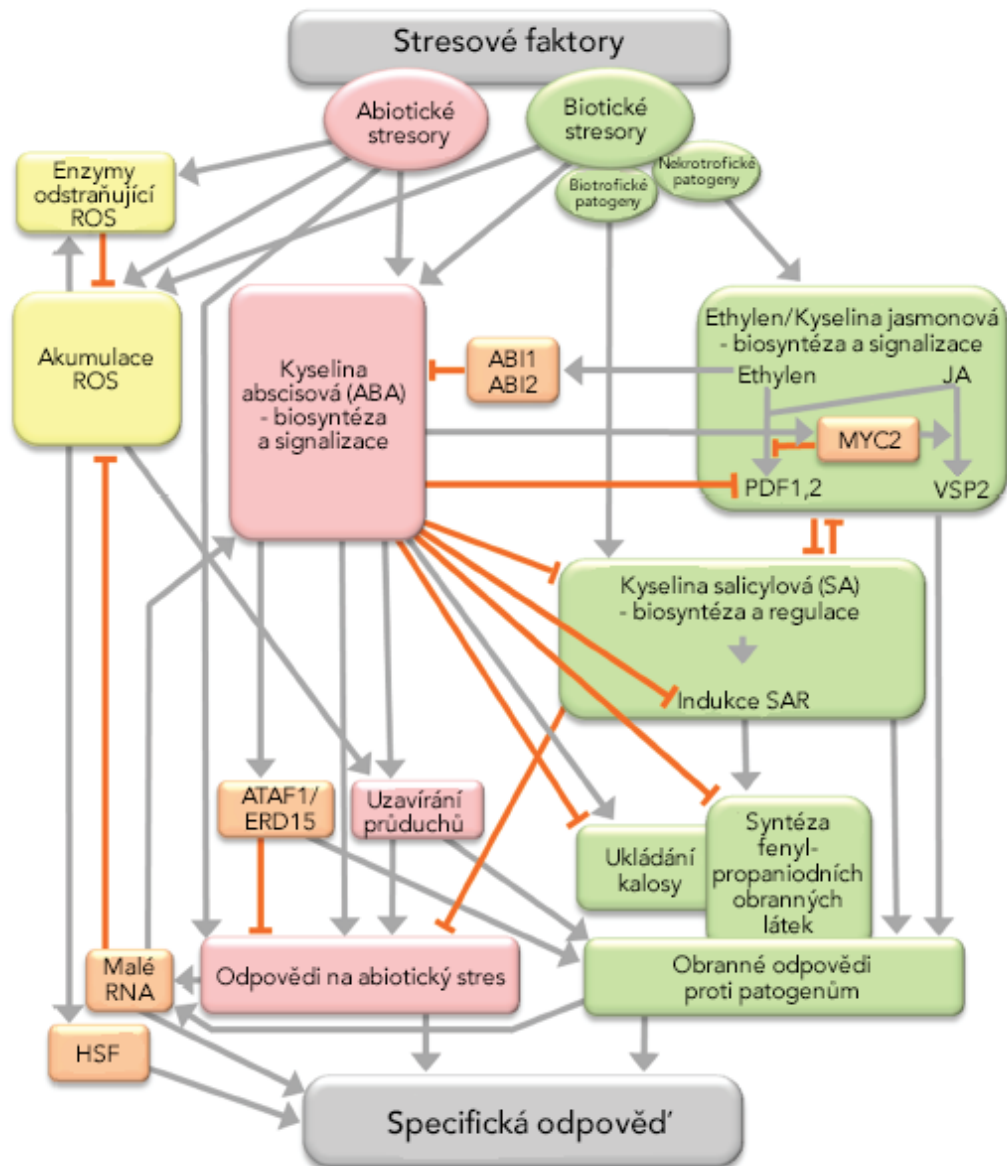
Příklady rostlinných virů, u kterých byla zjištěna interakce s Hsp70 napomáhající replikaci a šíření virových částic v rostlině.

Virus	Rostlina	Reference
Virus tabákové mozaiky (TMV) <i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	[28]
X virus bramboru (PVX) <i>Potato virus X</i>		
Virus mozaiky okurky (CMV) <i>Cucumber mosaic virus</i>		
Virus mozaiky melounu (WMV) <i>Watermelon mosaic virus</i>		
Virus keříčkovitosti rajčete (TBSV) <i>Tomato bushy stunt virus</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	[34]
A virus bramboru (PVA) <i>Potato virus A</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	[35]
Virus tabákové mozaiky (TMV) <i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Nicotiana tabacum L.</i>	[36]
Y virus bramboru (PVY) <i>Potato virus Y</i>	<i>Nicotiana tabacum L.</i>	[32]
Virus mozaiky vodnice (TMV) <i>Turnip mosaic virus</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	[37]

1.4 Metabolická odpověď rostlin na stres

Rostliny, jako sesilní organismy, neschopné aktivního pohybu, nemohou nepříznivým podmínkám uniknout. Musely si proto vyvinout složitý systém adaptace na stres a obranné mechanismy, které jim pomáhají zmírnit poškození vlivem těchto stresových podmínek [1]. Jedním ze způsobů, jakými rostliny čelí stresovým podmínkám, jsou změny v jejich metabolismu [38]. Některé metabolické procesy jsou vlivem stresu potlačeny (např. fotosyntetická produkce ATP, Calvinův cyklus, asimilace dusíku), některé dráhy jsou naopak působením stresových podmínek zintenzivněny (např. respirace, antioxidační systém) [16]. Stres ovlivňuje mnoho metabolických drah. Typická a často zmiňovaná v souvislosti se stresem je tvorba reaktivních forem kyslíku, zajímavá je také syntéza oxidu dusnatého. Mnoho dalších látek se podílí na odpovědi rostlin na stres. Specifita odpovědi vůči vícečetnému stresu je řízena celou řadou molekulárních mechanismů vytvářejících komplexní regulační síť [2]. Obr. 4 (*str. 18*) znázorňuje schéma regulačních drah při současném působení biotického a abiotického stresu. Tato komplexní síť interakcí umožňuje rostlinám reagovat velmi specificky na konkrétní kombinaci stresů, kterým jsou vystaveny.

Syntéza reaktivních forem kyslíku (ROS, z *angl. Reactive Oxygen Species*) je dobře známý způsob obrany proti patogenům u živočišných buněk. Dochází k aktivaci membránově vázaného enzymu, NADPH oxidasy (EC 1.6.3.1), která katalyzuje syntézu superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$) a dalších ROS. K podobnému jevu dochází i u rostlin [39]. U rostlinných buněk je produkce reaktivních forem kyslíku jednou z prvních reakcí při napadení patogenem. ROS mohou omezit šíření viru tím, že zesilují buněčnou stěnu, a navíc jsou pro patogeny přímo toxické. Jsou však toxické i pro rostlinné buňky a musí být proto z buňky odstraňovány [5]. ROS velmi rychlými a nespecifickými reakcemi poškozují nejrůznější biomolekuly. Způsobují například peroxidaci lipidů, inaktivaci enzymů a dalších funkčních proteinů [39].



Obr. 4: Role rostlinných hormonů v regulaci interakce mezi biotickým a abiotickým stresem. Šedé šipky naznačují indukci nebo pozitivní regulaci, oranžové úsečky znázorňují inhibici nebo represi. Růžové rámečky představují reakce rostlin typické pro abiotický stres, zatímco odpovědi charakteristické pro stres biotický jsou znázorněny zeleně. Transkripční faktory a další regulační molekuly jsou v tomto schématu zobrazeny oranžově. ROS, reaktivní formy kyslíku; ABA, kyselina abscisová; JA, kyselina jasmonová; SA, kyselina salicylová; SAR, systémově získaná rezistence; HSF, faktory teplotního šoku; ABI1, ABI2, negativní regulátory kyseliny abscisové; PDF1,2, ERD15, obranné geny; ATAF1, MYC2, transkripční faktory; VSP2, obranný protein proti hmyzu. Převzato a upraveno [2].

Během studia mechanismu signalizačních drah při napadení rostliny patogenem bylo zjištěno, že oxid dusnatý (NO), který se účastní imunitních reakcí živočichů, zprostředkovává i obranné reakce rostlin proti patogenům [40]. NO se podílí na obranných reakcích rostliny tím, že zvyšuje účinky aktivních forem kyslíku. Může také reagovat se superoxidovým radiálem ($O_2^{\cdot-}$) a tvořit tak peroxynitrit ($ONOO^-$), který poškozuje lipidy, proteiny a DNA. Předpokládá se, že tato regulace produkce ROS pomocí NO ovlivňuje rozvoj hypersenzitivní reakce [41]. NO také inhibuje aktivitu katalasy a askorbátperoxidasy [42]. Schopnost NO a peroxynitritu inhibovat dva hlavní enzymy, které odstraňují z rostlinné buňky H_2O_2 , naznačuje, že se NO podílí při aktivaci obranných reakcí při napadení patogenem.

Ve všech živých buňkách je velmi důležitá regulace aktivity enzymů a zvláště během působení stresových podmínek je enzymová regulace klíčovým faktorem pro přežití rostliny. Příkladem enzymů, jejichž aktivita roste vlivem stresových podmínek, jsou enzymy Hatchova-Slackova cyklu. Bylo provedeno mnoho studií, které dokazují zvýšení aktivity těchto enzymů působením stresu [5, 16, 17, 43, 44]. Hatchova-Slackova cyklu, známého také jako C_4 fotosyntéza, se účastní následující enzymy: fosfoenolpyruvátkarboxylasa (PEPC, EC 4.1.1.31), NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) (NADP-ME, EC 1.1.1.40) a pyruvát, fosfátdikinas (PPDK, EC 2.7.9.1) [43, 44]. Fotosyntetická funkce enzymů Hatchova-Slackova cyklu v C_4 a CAM rostlinách je dobře známá. Všechny tyto enzymy se ale vyskytují i v C_3 rostlinách a nefotosyntetických tkáních všech rostlin a hrají důležitou roli při přizpůsobení rostlinného metabolismu stresovým podmínkám [43, 44]. Jednou z funkcí těchto enzymů je produkce redukčního ekvivalentu NADPH. Ve stresovaných buňkách jsou nároky na NADPH obecně vyšší než v buňkách nestresovaných. NADPH je třeba zejména pro anabolické procesy, jako je biosyntéza lipidů a syntéza specifických obranných látek, např. fytoalexinů [5]. Bylo zjištěno, že aktivita těchto enzymů roste vlivem stresových faktorů, jako je sucho, vysoká koncentrace solí, nedostatek fosfátu a železa a přítomnost těžkých kovů v půdě. Aktivity všech těchto enzymů jsou zvýšeny také v rostlinách vystavených biotickému stresu způsobeném virovou infekcí [16].

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

1. zjistit, zda teplotní šok ovlivní rozvoj infekce PVY^{NTN} v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1).
2. porovnat množství proteinu Hsp70 v rostlinách tabáku vystavených samostatnému působení stresu (biotickému stresu způsobeného PVY^{NTN} a teplotnímu šoku) s množstvím Hsp70 v rostlinách vystavených kombinaci obou těchto stresových faktorů.
3. sledovat množství proteinu Hsp70 v rostlinách okurky (*Cucumis sativa* L., convar. Jogger F1) vystavených abiotickému stresu v podobě 100mM NaCl.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Použité přístroje

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

Centrifuga Universal 32R, *Hettich Zentrifugen*, Německo

Čtečka absorbancí destiček Sunrise, *Tecan*, Švýcarsko

Elektroforetická souprava, *Biometra*, Německo

Inkubátor IR 1500 Automatic CO₂, *Flow laboratories*, Velká Británie

Souprava pro přenos proteinů z gelu na membránu, *Biometra*, Německo

Termoblok Elite Dry Bart, *Major Science*, USA

Ultrabasic Benchtop pH/mV metr UB-10, *Denver Instrument Company*, USA

Vortex V-1 plus, *Biosan*, Litva

3.2 Chemikálie

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

akrylamid, *Sigma*, USA

azid sodný, *Fluka*, Velká Británie

bisakrylamid, *Sigma*, USA

bromfenolová modř, *Sigma*, USA

hovězí sérový albumin, *Sevac*, ČR

Coomassie Brilliant Blue G-250, *Sigma*, USA

Coomassie Brilliant Blue R-250, *Sigma*, USA

dihydrogenfosforečnan draselný, *Penta*, ČR

dithiothreitol, *Sigma*, USA

dodecylsulfát sodný, *Serva*, Německo

EDTA, *Sigma*, USA

ethanol, *Lachema*, ČR
Folinovo fenolové činidlo, *Dr. Kulich Pharma*, ČR
glycerol, *Penta*, ČR
glycin, *Degussa*, ČR
hydrogenfosforečnan sodný, *Penta*, ČR
hydrogenuhličitan sodný, *Sigma*, USA
hydroxid sodný, *Lachema*, ČR
chlorid draselný, *Lachema*, ČR
chlorid hořečnatý, *Sigma*, USA
chlorid sodný, *Lachema*, ČR
kyselina chlorovodíková, *Penta*, ČR
kyselina octová, *Penta*, ČR
methanol, *Penta*, ČR
Nitroblue tetrazolium chlorid, *Sigma*, USA
N,N,N',N' - tetramethylethylendiamin, *Serva*, Německo
peroxodisíran amonný, *Lachema*, ČR
p-nitrofenylfosfát sodný, *Fluka*, Velká Británie
polyvinylpyrrolidon, *Sigma*, USA
síran měďnatý, *Lachema*, ČR
tris(hydroxymethyl)aminomethan, *Sigma*, USA
Tween 20, *Sigma*, USA
uhličitan sodný, *Lachema*, ČR
vinan sodný, *Lachema*, ČR

3.3 Rostlinný materiál

Pro studium vlivu teplotního šoku a virové infekce byly použity rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1), pěstované v kultivačních boxech Ústavu experimentální botaniky Akademie věd s laskavým svolením doc. RNDr. Noemi Čeřovské, CSc. Pro sledování vlivu solného stresu byly použity rostliny okurky seté (*Cucumis sativa* L., convar. Jogger F1), pěstované v laboratoři Chemického ústavu Univerzity Karlovy.

3.4 Protilátky a infekční materiál

V této práci byly použity monoklonální králičí protilátky třídy IgG připravené proti PVY^{NTN} (2 mg/ml) laskavě poskytnuté doc. Čeřovskou (Ústav experimentální botaniky AV ČR), dále pak polyklonální protilátky připravené proti králičím protilátkám konjugované s alkalickou fosfátasou (*Sigma*, USA) a polyklonální králičí protilátky připravené proti Hsp70 (*Thermoscientific*, Německo). Pro inokulaci rostlin byl použit extrakt z rostlin infikovaných virem PVY^{NTN}, rovněž poskytnutých doc. Čeřovskou.

3.5 Experimentální metody

3.5.1 Pěstování experimentálních rostlin, provedení pokusu a odběr vzorků

3.5.1.1 Pěstování rostlin tabáku pro studium vlivu biotického a teplotního stresu

V této práci byly použity rostliny tabáku *Nicotiana tabacum* L., které byly po měsíci od vysetí rozsazeny do 0,5l samostatných nádob. Za konstantních podmínek (teplota 20°C, relativní vlhkost 75 %, osvětlení 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, režim 16 hodin světlo / 8 hodin tma) byly ve směsi substrátu a písku (3:1) rostliny pěstovány po dobu dalších 4 týdnů.

Vliv teplotního šoku a virové infekce byl sledován na čtyřech skupinách rostlin. První skupinu tvořily rostliny kontrolní, které nebyly infikovány ani vystaveny teplotnímu šoku (skupina K₂₀). Druhou skupinu představovaly rostliny pouze vystavené hodinovému teplotnímu šoku při 42°C (K₄₀). Třetí skupina obsahovala rostliny, které byly pouze infikované virem PVY^{NTN} (Y₂₀) a čtvrtou skupinu tvořily rostliny nejprve infikované virem PVY^{NTN}, a poté vystavené teplotnímu šoku (Y₄₀).

Experimentálních rostlin (skupiny Y₂₀ a Y₄₀) byly infikovány Y virem bramboru, kmenem NTN. Pro inokulaci rostlin byl použit extrakt z rostlin infikovaných virem PVY^{NTN}, který byl připraven homogenizací rostlinného materiálu s desetinásobkem 0,057M fosfátového pufru, pH 8,0. Do extraktu byl přidán karborundový prášek a poté byl extrakt nanesen na spodní list rostliny. Karborundový prášek způsobí mechanické poškození listu, které je nezbytné pro vniknutí viru do rostliny. Jednu hodinu po inokulaci byla část experimentálních rostlin (skupiny K₄₀ a Y₄₀) vystavena teplotnímu šoku. Teplotní šok byl proveden v kultivačním boxu, ve kterém byly rostliny vystaveny teplotě 42°C po dobu jedné hodiny.

Byly provedeny dva pokusy vystavení rostlin teplotnímu šoku a virové infekci. V prvním experimentu byly vzorky odebírány 1, 2 a 3 hodiny po vystavení rostlin virové infekci a teplotnímu šoku. Další vzorky byly odebírány v intervalu 3-4 dnů po dobu jednoho měsíce. V druhém pokusu byly vzorky odebírány 1 hodinu, 1 den, 7 dní, 14 dní, 21 dní a 28 dní po vystavení rostlin virové infekci a teplotnímu šoku. Vzorky byly připravovány z prvních plně vyvinutých vrchních listů. Listy byly nastříhány na kousky a z nich byly vytvořeny směsné vzorky. Při každém odběru byly odebrány vzorky asi ze tří rostlin každé skupiny. Směsné vzorky byly váženy asi po 0,5 g, mraženy tekutým dusíkem a následně uchovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C.

3.5.1.2 Pěstování rostlin okurky seté pro studium vlivu solného stresu

Pro studium vlivu solného stresu byly použity rostliny okurky seté *Cucumis sativa* L. Po dvou týdnech od vysetí byly rostliny rozsazeny do 0,5l samostatných nádob se substrátem a pěstovány po dobu dalších 5 týdnů.

Rostliny byly vyjmuty z půdy a jejich kořeny byly omyty destilovanou vodou. Část rostlin pak byla umístěna do 1l kádinek naplněných 100mM roztokem NaCl. Kontrolní skupinu tvořily rostliny vložené po vyjmutí z půdy do 1l kádinek s destilovanou vodou. Vzorky byly odebírány 3 hodiny, 1 den, 2 dny a 3 dny po aplikaci solného stresu. Vzorky byly připravovány z vrchních listů a z kořenů rostlin. Listy byly nastříhány na kousky a z nich byly připraveny směsné vzorky. Směsné vzorky byly váženy asi po 0,5 g a poté použity pro přípravu rostlinného extraktu. Kořeny byly omyty destilovanou vodou, osušeny, nastříhány, zváženy a následně použity pro přípravu rostlinného extraktu.

3.5.2 Příprava rostlinného extraktu

Listy a kořeny rostlin byly homogenizovány ve třecí misce s trojnásobným množstvím extrakčního pufru, který obsahoval 100mM Tris-HCl, pH 7,8; 1mM DTT; 1mM EDTA; 5mM MgCl₂ a 5% (v/v) glycerol. Homogenát byl převeden do mikrozkušavky, bylo přidáno přibližně 0,02 g PVP na 1 ml homogenátu. Následovala centrifugace po dobu 15 minut při 4°C a 15 000 × g. Supernatant byl použit ke stanovení množství proteinů.

3.5.3 Elektroforetické metody

Vzorky byly analyzovány pomocí elektroforetické separace v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS [45]. SDS, dodecylsulfát sodný, je ionogenní detergent, který denaturuje proteiny a uděluje všem proteinům jednotný záporný náboj. Jednotlivé proteiny se pak působením externího elektrického pole rozdělí na základě své molekulové hmotnosti. Po přenosu proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu metodou elektropřenosu byla k identifikaci proteinu Hsp70 použita imunochemická detekce (*viz kapitola 3.5.4.2*).

3.5.3.1 Příprava vzorků pro SDS elektroforézu

Pro elektroforetickou separaci v prostředí SDS byly použity rostlinné extrakty připravené výše uvedeným postupem (*kapitola 3.5.2*). Extrakty byly smíseny se vzorkovým pufrem v poměru 1:1. Vzorkový pufr byl připraven smísením 2,6 ml 0,5M Tris-HCl pufru o pH 6,8; 2 ml 10% (w/v) SDS; 2 ml glycerolu; 0,1542 g DTT; 0,5 ml 0,1% (w/v) bromfenolové modři a 2,9 ml destilované vody. Před aplikací vzorků na gel byla směs vzorkového pufru s rostlinnými extrakty zahřívána po dobu 10 minut při teplotě 100°C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla směs použita k elektroforetické separaci.

3.5.3.2 Provedení SDS elektroforézy

Pro elektroforetickou separaci byl použit 10% separační malopórový gel a 5% zaostřovací velkopórový gel. 10% separační gel byl připraven smísením 5,0 ml 30% (w/v) akrylamidu/bisakrylamidu; 3,8 ml 1,5M Tris-HCl pufru o pH 8,8; 6 μ l TEMED; 0,15 ml 10% (w/v) SDS; 5,9 ml destilované vody a 0,15 ml 10% (w/v) peroxodisíranu amonného. 5% zaostřovací gel byl připraven smísením 0,83 ml 30% (w/v) akrylamidu/bisakrylamidu; 0,63 ml 1M Tris-HCl pufru o pH 6,8; 5 μ l TEMED; 0,05 ml 10% (w/v) SDS; 3,4 ml destilované vody a 0,05 ml 10% (w/v) peroxodisíranu amonného.

Byla sestavena elektroforetická aparatura. Elektrodotový pufr obsahoval 18,8 g glycinu; 3 g Tris a 1 g SDS v 1 l destilované vody. Do jamek gelu bylo pipetováno vždy stejné množství proteinů. Množství rozpustných proteinů v jednotlivých vzorcích bylo určeno Lowryho metodou stanovení bílkovin. Současně byly elektroforeticky separovány standardní proteiny. V prvním pokusu byl jako standard použit ProSieve® Color Protein Markers obsahující proteiny o molekulové hmotnosti 10, 14, 20, 27, 42, 52, 80, 127 a 187 kDa. V druhém pokusu byl použit standard SigmaMarker™, High Range obsahující proteiny o molekulové hmotnosti 36, 45, 55, 66, 84, 97, 116 a 205 kDa. Počáteční hodnota napětí pro elektroforézu byla nastavena na 70 V a po doputování bromfenolové modři na rozhraní gelů bylo napětí zvýšeno na 140 V. Takto byly připraveny vždy dva gely.

3.5.3.3 Stanovení množství rozpustných proteinů Lowryho metodou

Lowryho metoda využívá Folinovo fenolové reagens, které poskytuje s tyrosylovými zbytky bílkovin modrofialové zabarvení, jehož intenzita se měří spektrofotometricky při 500 nm [46]. Před použitím metody byl sestaven kalibrační graf pro roztok čistého BSA o známé koncentraci, a to 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mg ml⁻¹. K 200 μ l roztoku bílkoviny byl přidán 1 ml roztoku C, který byl připraven smísením 50 ml 2% (w/v) Na₂CO₃ v 0,1M NaOH a 1 ml 0,5% (w/v) CuSO₄ v 1% (w/v) vinanu sodném. Po desetiminutové inkubaci za laboratorní teploty bylo přidáno 100 μ l 2 \times ředěného fenolového činidla a následovala

inkubace přesně 30 minut. Poté byla měřena absorbance při 500 nm proti slepému vzorku. Rostlinné extrakty byly před stanovením množství bílkovin 10× ředěny destilovanou vodou.

3.5.3.4 Detekce bílkovin po SDS elektroforéze

Po skončení elektroforetické separace byl jeden z gelů vložen do barvicí lázně, ve které byl ponechán přes noc. Lázeň obsahovala 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250; 0,25 g Coomassie Brilliant Blue G-250; 212,5 ml ethanolu; 25 ml methanolu; 50 ml kyseliny octové a 212,5 ml destilované vody. Po obarvení byl gel vložen do odbarvovací lázně, která byla připravena smísením 650 ml destilované vody, 250 ml ethanolu a 100 ml kyseliny octové. Druhý gel byl použit pro imunochemickou detekci proteinu Hsp70.

3.5.4 Imunochemické metody

3.5.4.1 ELISA

Pro stanovení obsahu PVY^{NTN} viru v rostlinných vzorcích byla použita metoda ELISA (*z angl. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). Antigen (obalový protein viru PVY^{NTN}) je adsorbován na povrch mikrotitrační destičky, poté je na něj navázána specifická primární protilátka a na tento komplex primární protilátky s antigenem se váže specifická sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase. Alkalická fosfatasa je enzym, který katalyzuje přeměnu substrátu (*p*-nitrofenylfosfátu), který je přidán do reakční směsi, na produkt *p*-nitrofenol, který je v alkalickém pH barevný a je stanoven spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 405 nm [47].

Rostlinný materiál byl homogenizován v třecí misce s desetinásobkem potahovacího pufru. Potahovací pufr o pH 9,6 obsahoval 15mM Na₂CO₃; 35mM NaHCO₃ a 3mM NaN₃. Extrakt byl poté přefiltrován přes gázu a do každé jamky bylo nanášeno 100 µl vzorku. Takto připravené mikrotitrační destičky byly ponechány přes noc při teplotě 4°C, aby došlo k navázání antigenu na povrch destičky.

Jamky destičky byly poté 4× promyty 200 µl promývacího pufru. Promývací pufr obsahoval PBS pufr o pH 7,4 a 0,05% (v/v) detergent Tween 20. PBS pufr obsahoval 137mM NaCl; 8mM Na₂HPO₄; 15mM KH₂PO₄; 3,7mM KCl; 3mM NaN₃. Byla připravena primární králičí protilátka proti PVY^{NTN} ředěním v poměru 1 : 100 konjugačním pufrem o pH 7,4, který obsahoval 2% (w/v) PVP a 0,2% (w/v) BSA v PBS pufru s 0,05 % (v/v) Tween 20. Do každé jamky bylo nanášeno 100 µl králičí protilátky proti PVY^{NTN}. Destička byla vložena do inkubátoru o teplotě 37 °C.

Po třech hodinách inkubace byla destička opět 4× promyta promývacím pufrem. Byla připravena sekundární kozí protilátka proti králičí protilátce konjugovaná s alkalickou fosfatou. Tato protilátka byla ředěna v poměru 1 : 30 000 v konjugačním pufru. Do každé jamky pak bylo nanášeno 100 µl sekundární kozí protilátky. Destička byla ponechána v inkubátoru po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C. Po inkubaci byla destička 4× promyta promývacím pufrem a do každé jamky bylo pak nanášeno 100 µl substrátu pro alkalickou fosfatou. Substrátem byl 0,1% (w/v) *p*-nitrofenylfosfát, který byl připraven rozpuštěním pevného *p*-nitrofenylfosfátu v substrátovém pufru. Substrátový pufr obsahoval 28mM NaHCO₃; 22mM Na₂CO₃ a 1mM MgCl₂. Destička s nanášeným substrátem byla ponechána v inkubátoru při teplotě 37°C po dobu 1 hodiny, nebo přes noc v lednici při 4°C. V jamkách, ve kterých byl přítomen virus PVY^{NTN}, došlo k vytvoření žlutého *p*-nitrofenolu. Intenzita zbarvení byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 405 nm pomocí automatické čtečky destiček.

3.5.4.2 Imunochemická detekce proteinu Hsp70 na nitrocelulosové membráně

Vzorky rozdělené elektroforetickou separací v denaturujícím prostředí SDS (viz kapitola 3.5.3) byly z gelu přeneseny na nitrocelulosovou membránu a na membráně pak byla imunochemicky detekována přítomnost Hsp70 pomocí specifické protilátky [48].

Metoda tzv. přenosu proteinů z elektroforetických gelů na nitrocelulosové membrány se nazývá Western blot (*z angl. „blotting“*). V dalším textu se používá výrazu Přenos. Do soupravy pro přenos proteinů Biometra bylo umístěno 5 vrstev filtračního papíru, nitrocelulosová membrána, na ni byl umístěn polyakrylamidový gel a dalších 5 vrstev filtračního papíru. Filtrační papíry, membrána i gel byly předtím smočeny v transferového pufru o pH 8,3. Transferový pufr obsahoval 10% (v/v) methanol; 25mM Tris-HCl; 150mM glycin. Po nasazení krytu na soupravu byl nastaven proud v mA odpovídající pětinasobku obsahu membrány v cm². Čas přenosu proteinů na membránu byl 35 minut.

Princip imunochemické detekce proteinu Hsp70 je podobný principu metody ELISA (viz kapitola 3.5.4.1). Primární králičí protilátka připravená proti proteinu Hsp70 se na nitrocelulosové membráně na Hsp70 specificky váže. Na primární protilátku se potom naváže sekundární kozí protilátka zaměřená proti králičí protilátce konjugovaná s alkalickou fosfatase. Alkalická fosfatasa je enzym, který katalyzuje odštěpení fosfátu z 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfátu (BCIP). Volný fosfát pak v alkalickém prostředí reaguje s Nitroblue tetrazolium chloridem (NBT) za vzniku fialovohnědého zbarvení.

Po přenosu proteinů z gelu na membránu je nutné na membráně blokovat další vazná místa nacházející se na jejím povrchu. Membrána byla po elektropřenosu blokována po dobu jedné hodiny 1% (w/v) BSA v PBS pufru o pH 7,4. PBS pufr obsahoval 137mM NaCl; 8mM Na₂HPO₄; 15mM KH₂PO₄; 3,7mM KCl a 3mM NaN₃. Poté byla membrána 3× po pěti minutách promyta puftrem PBS+T (PBS pufr + 0,05% Tween 20).

Byl připraven roztok králičí protilátky proti Hsp70 ředěním 1 : 3000 konjugačním pufrem o pH 7,4, který obsahoval 2% (w/v) PVP a 0,2% (w/v) BSA v PBS pufru s 0,05% (v/v) roztokem Tween 20. Membrána byla inkubována s primární králičí protilátkou přes noc při 4°C.

Po navázání primární protilátky byla membrána opět 3× po pěti minutách promyta pufrem PBS+T a inkubována se sekundární kozí protilátkou proti králičí protilátce konjugovanou s alkalickou fosfatasou po dobu tří hodin při 37 °C. Kozí protilátka byla před aplikací na membránu ředěna konjugačním pufrem v poměru 1 : 30 000. Po posledním promývání membrány v pufru PBS+T byla membrána ponechána v roztoku BCIP/NBT (0,2 mg BCIP, 0,3 mg NBT v 10 ml substrátového pufru o pH 9) až do objevení barevných proužků v místě, kde se nachází Hsp70. Intenzita proužků byla hodnocena denzitometricky pomocí programu ImageJ.

4. VÝSLEDKY

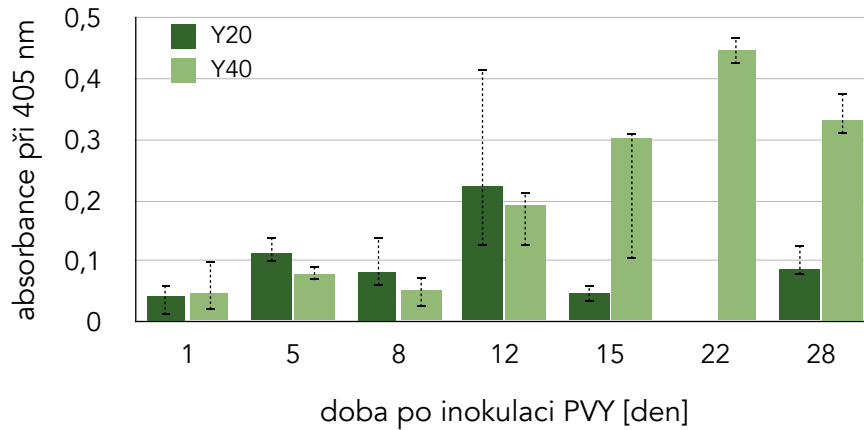
4.1 Teplotní stres a virová infekce v rostlinách tabáku

V první části experimentů byl sledován vliv teplotního stresu, vliv stresu biotického a společný vliv kombinovaného stresu na množství proteinů v listech tabáku. Část rostlin byla vystavena teplotnímu šoku v podobě působení teploty 42°C po dobu 1 hodiny. Část rostlin byla infikována Y virem bramboru, kmenem NTN. Pro studium vlivu kombinovaného stresu byly experimentální rostliny nejprve infikovány virem PVY^{NTN}, a poté vystaveny hodinovému teplotnímu šoku.

4.1.1 Vliv teplotního stresu a virové infekce na množství PVY^{NTN}

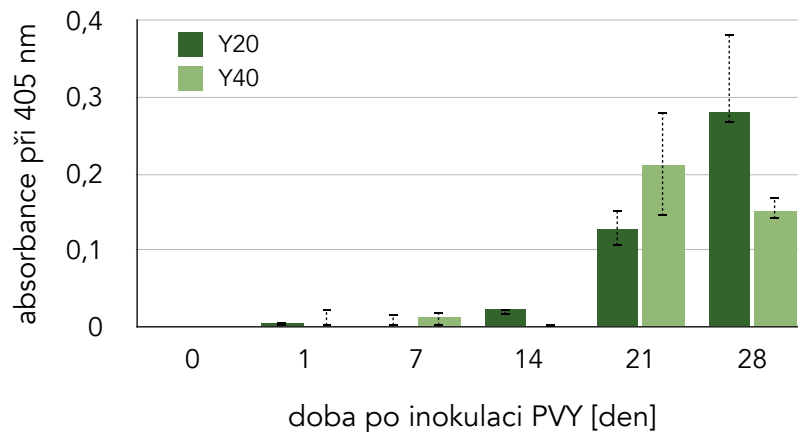
Jedním z cílů této práce bylo zjistit, jak teplotní stres ovlivňuje rozvoj virové infekce. Průběh virové infekce v listech tabáku byl sledován imunochemickou detekcí obalového proteinu viru PVY^{NTN} metodou ELISA. Pro toto stanovení byly použity vzorky ze dvou skupin experimentálních rostlin: rostlin pouze infikovaných PVY^{NTN} (Y₂₀) a rostlin vystavených po inokulaci PVY^{NTN} teplotnímu šoku (Y₄₀).

V prvním pokusu bylo zjištěno (obr. 5, *str.* 33), že u rostlin, které nebyly vystaveny teplotnímu šoku (Y₂₀) dosáhla infekce maxima 12. den po inokulaci. U rostlin vystavených kombinovanému stresu (Y₄₀) dosáhla infekce maxima až 22. den po inokulaci, kdy infekce u skupiny rostlin Y₂₀ pomalu odeznívala. V rostlinách vystavených teplotnímu šoku po inokulaci je patrný vyšší relativní obsah obalového proteinu viru PVY^{NTN} než v rostlinách, které působení teplotního šoku vystaveny nebyly.



Obr. 5: Imunochemická detekce množství obalového proteinu viru PVY^{NTN} v listech tabáku metodou ELISA v průběhu prvního pokusu. Absorbance při 405 nm odpovídá množství obalového proteinu viru PVY^{NTN}. Y₂₀ - rostliny infikované virem PVY^{NTN} bez působení teplotního šoku, Y₄₀ - rostliny infikované a poté vystavené teplotnímu šoku.

I v druhém pokusu bylo imunochemicky detekováno množství obalového proteinu viru PVY^{NTN} metodou ELISA (obr. 6). U rostlin, které byly pouze infikovány a nebyly vystaveny teplotnímu šoku (Y₂₀) dosáhla infekce maxima 28. den po inokulaci. U rostlin, které byly po inokulaci vystaveny působení vyšší teploty (Y₄₀), dosáhla infekce maxima o něco dříve, a to 21. den po inokulaci.

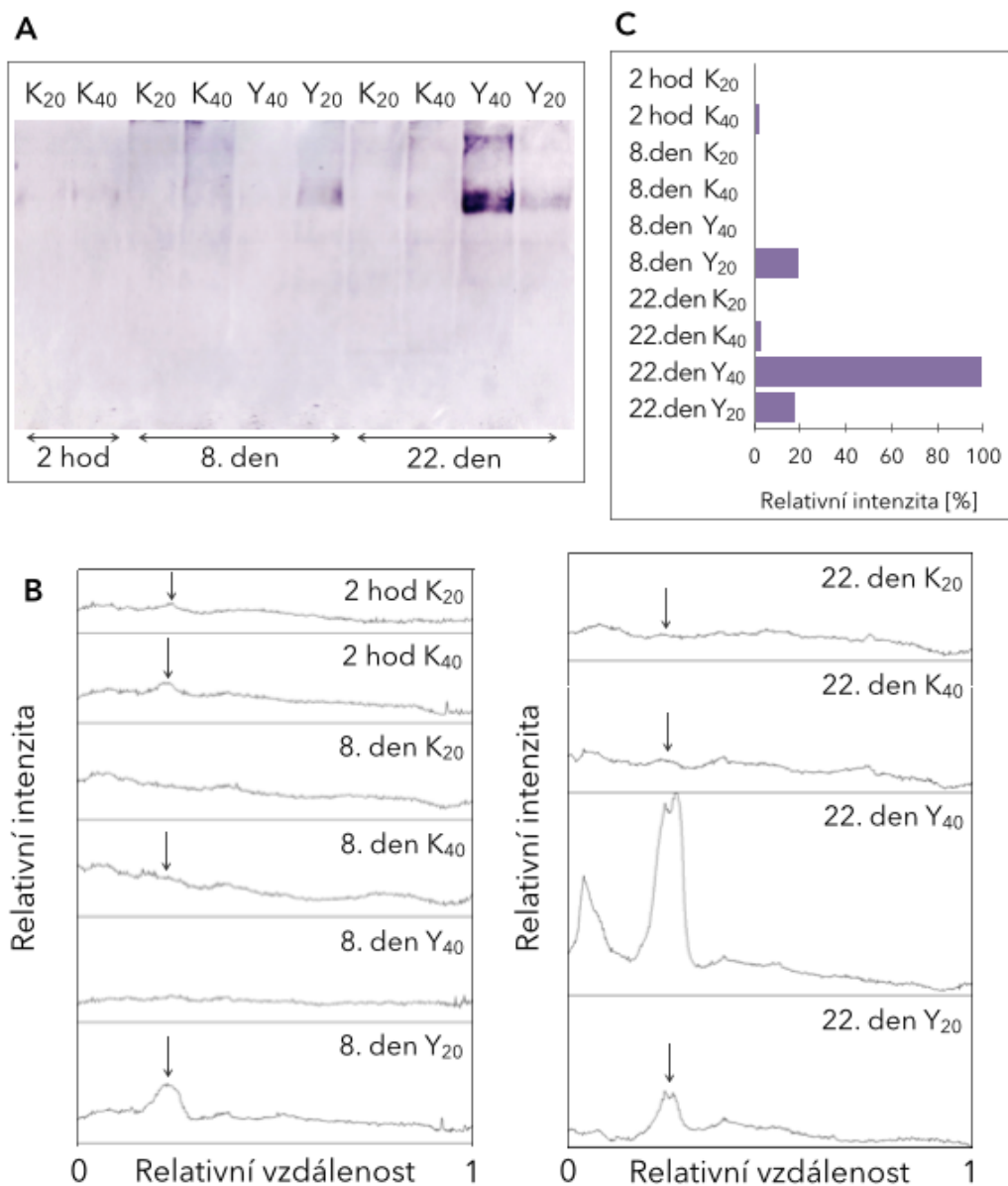


Obr. 6: Imunochemická detekce množství obalového proteinu viru PVY^{NTN} v listech tabáku metodou ELISA v průběhu druhého pokusu. Absorbance při 405 nm odpovídá množství obalového proteinu viru PVY^{NTN}. Y₂₀ - rostliny infikované virem PVY^{NTN} bez působení teplotního šoku, Y₄₀ - rostliny infikované a poté vystavené teplotnímu šoku.

4.1.2 Vliv teplotního stresu a virové infekce na množství proteinu Hsp70

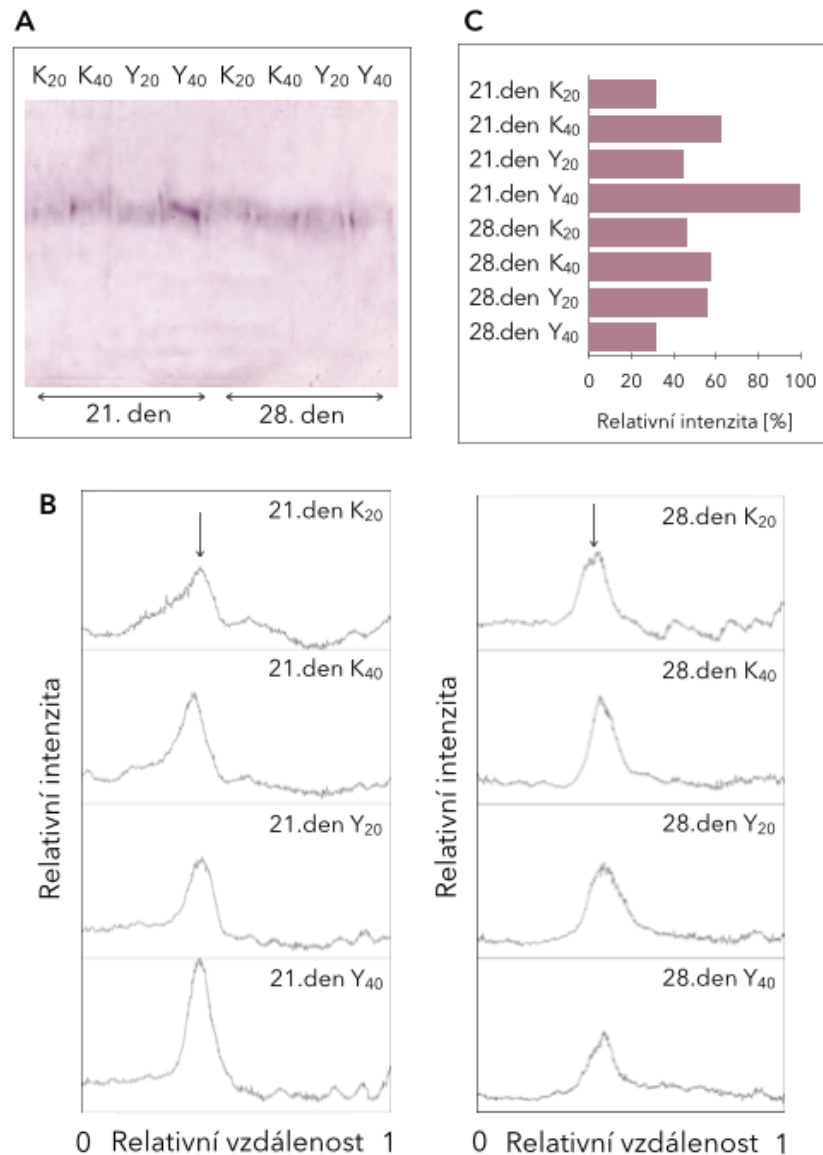
Teplotní stres má jednoznačně vliv na množství proteinu Hsp70, stále diskutován je však vliv virové infekce na množství tohoto proteinu. V této práci byl sledován vliv virové infekce kombinované s teplotním šokem. Rozpustné proteiny v rostlinných extraktech byly elektroforeticky separovány v denaturujícím prostředí SDS. Přítomnost proteinu Hsp70 v rostlinách tabáku byla po přenosu proteinů z elektroforetického gelu na nitrocelulosovou membránu detekována imunochemicky specifickou protilátkou proti Hsp70.

Obr. 7 (*str.* 35) zobrazuje nitrocelulosovou membránu po imunochemické detekci proteinu Hsp70 provedené v prvním pokusu (A) a její denzitometrické vyhodnocení (B,C). Nejintenzivnější proužek (100% relativní intenzity) se nachází u skupiny rostlin Y₄₀ 22. den po inokulaci PVY^{NTN}. Imunochemickou detekcí viru metodou ELISA (*obr.* 5, *str.* 33) bylo zjištěno, že v tento den dosáhla virová infekce v těchto rostlinách svého maxima. Slabší proužky (18 % a 19 % relativní intenzity) jsou patrné u skupiny Y₂₀, a to jak 8. tak 22. den po vystavení rostlin stresu. Srovnáme-li opět množství proteinu Hsp70 s množstvím obalového proteinu viru PVY^{NTN} detekovaným metodou ELISA (*obr.* 6, *str.* 33), zjistíme, že větší množství viru skutečně odpovídá zvýšené koncentraci Hsp70. Osmý den po inokulaci bylo množství viru v rostlinách pouze infikovaných (Y₂₀) vyšší než v rostlinách vystavených kombinovanému stresu (Y₄₀). Ve druhé a třetí dráze na *obr.* 7, kde se nachází vzorky rostlin kontrolních (K₂₀) a rostlin pouze vystavených hodinovému teplotnímu šoku (K₄₀) odebrané 2 hodiny po působení zvýšené teploty, jsou patrné slabé proužky odpovídající Hsp70 (1 % a 2 % relativní intenzity). U skupiny K₄₀ je proužek o něco intenzivnější.



Obr. 7: Imunochemická detekce proteinů Hsp70 separovaných SDS elektroforézou v prvním pokusu (A), densitometrické vyhodnocení intenzity proužků programem ImageJ (B) a jeho grafické znázornění (C). K₂₀ - kontrolní rostliny, neinfikované, nevystavené teplotnímu šoku; K₄₀ - rostliny vystavené pouze teplotnímu šoku; Y₄₀ - rostliny nejprve infikované, poté vystavené teplotnímu šoku; Y₂₀ - rostliny pouze infikované. 100% odpovídá nejintenzivnějšímu proužku.

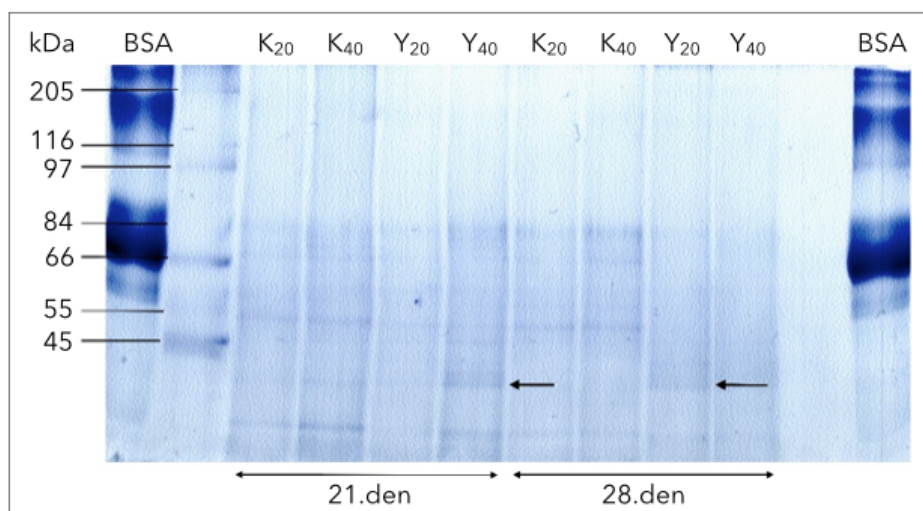
Obr. 8 zobrazuje nitrocelulosoovou membránu po imunochemické detekci proteinu Hsp70 provedené v druhém pokusu. Množství Hsp70 bylo sledováno ve vzorcích odebraných 21. a 28. den po působení stresu na rostliny. Nejintenzivnější proužek (100% relativní intenzity) se nachází u skupiny Y₄₀ 21. den po vystavení rostlin stresu, u ostatních skupin rostlin jsou proužky přibližně stejně intenzivní.



Obr. 8: Imunochemická detekce proteinů Hsp70 separovaných SDS elektroforézou v druhém pokusu (A), denzitometrické vyhodnocení intenzity proužků programem ImageJ (B) a jeho grafické znázornění (C). K₂₀ - kontrolní rostliny, neinfikované, nevystavené teplotnímu šoku; K₄₀ - rostliny vystavené pouze teplotnímu šoku; Y₄₀ - rostliny nejprve infikované, poté vystavené teplotnímu šoku; Y₂₀ - rostliny pouze infikované. 100% odpovídá nejintenzivnějšímu proužku.

4.1.3 Vliv teplotního stresu a virové infekce na množství proteinů detekovaných CBB v gelu po SDS-PAGE

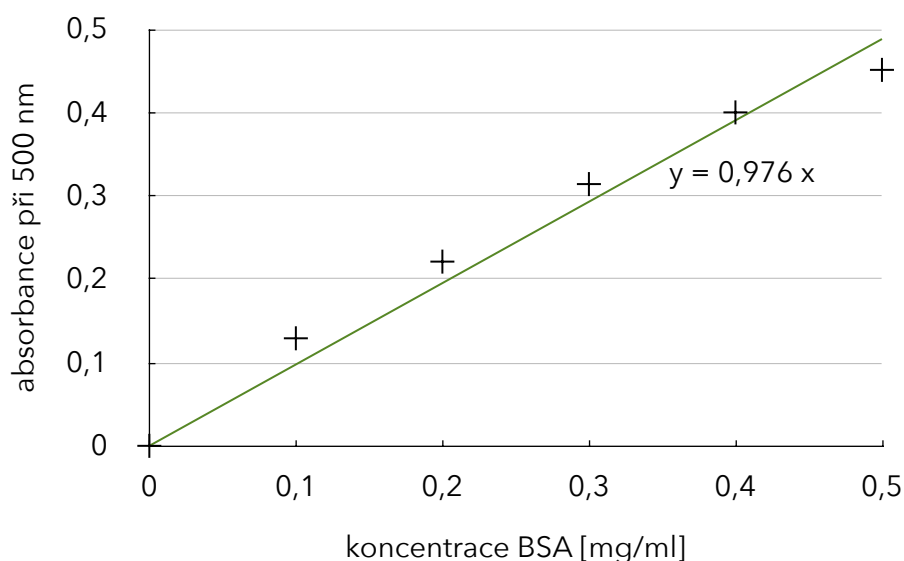
Velmi důležitým enzymem pro rostliny je Rubisco. Množství tohoto enzymu bylo detekováno v polyakrylamidovém gelu po elektroforetické separaci v prostředí SDS. Molekulová hmotnost Rubisco (resp. jeho velké podjednotky) je 55 kDa. Na obr. 9, který zobrazuje elektroforeticky separované rozpustné proteiny, je patrné, že vlivem virové infekce dochází ke snížení množství enzymu Rubisco. V drahách s extrakty kontrolních rostlin (K₂₀ a K₄₀) jsou viditelné proužky v oblasti okolo 55 kDa, zatímco v drahách rostlin infikovaných (Y₂₀ a Y₄₀) jsou proužky odpovídající Rubisco téměř neznatelné. V dráze č. 6 (Y₄₀, 21. den infekce) a v dráze č. 9 (Y₂₀, 28. den infekce) se objevily proužky, na obr. 9 vyznačené šipkami, které pravděpodobně odpovídají obalovému proteinu viru. Molekulová hmotnost obalového proteinu PVY^{NTN} se pohybuje okolo 30 kDa. V dané dny došlo také k maximálnímu rozvoji virové infekce (obr. 6, *str.* 33). Jednotlivé proužky nebyly vzhledem k jejich nízké intenzitě dále vyhodnocovány denzitometricky.



Obr. 9: Detekce rozpustných bílkovin v gelu po SDS elektroforéze v listech experimentálních rostlin tabáku v průběhu druhého pokusu. K₂₀ - kontrolní rostliny, neinfikované, nevystavené teplotnímu šoku; K₄₀ - rostliny vystavené pouze teplotnímu šoku; Y₂₀ - rostliny pouze infikované; Y₄₀ - rostliny nejprve infikované, poté vystavené teplotnímu šoku. Proužky okolo 55 kDa odpovídají pravděpodobně velké podjednotce enzymu Rubisco. Šipkami je vyznačen pravděpodobný výskyt obalového proteinu viru PVY (30 kDa). Dráha označená BSA obsahuje BSA s molekulovou hmotností 66,5 kDa. Do jamek gelu bylo nanášeno stejné množství proteinů (40 µg).

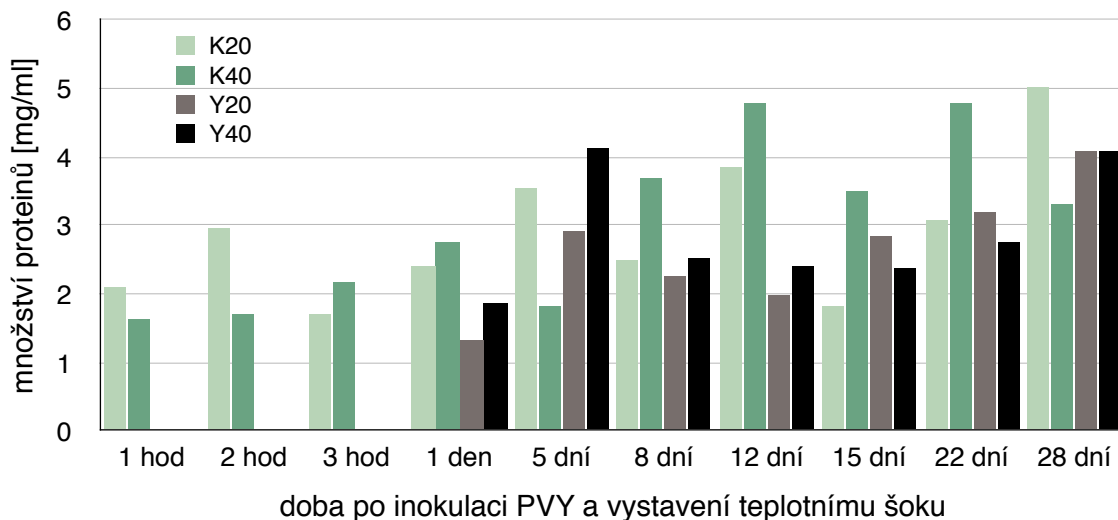
4.1.4 Vliv teplotního stresu a virové infekce na množství rozpustných proteinů

Množství rozpustných proteinů v rostlinných extraktech bylo stanoveno Lowryho metodou stanovení bílkovin. Byla sestrojena kalibrační přímka (obr. 10) pro roztok BSA o známé koncentraci. Rovnice kalibrační přímky byla použita k výpočtu koncentrace bílkovin v extraktech z listů tabáku.



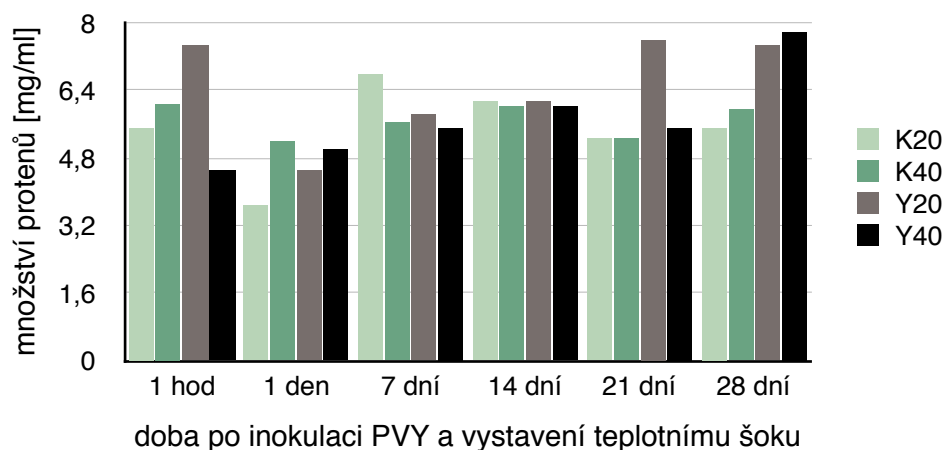
Obr. 10: Kalibrační přímka pro stanovení množství bílkovin v rostlinných extraktech. Graf vyjadřuje závislost absorbance při 500 nm na koncentraci BSA ve vzorku.

V prvním pokusu (obr. 11, *str.* 39) byl celkově obsah proteinů vyšší v kontrolních rostlinách K₂₀ a K₄₀, až na 5. den po vystavení rostlin stresu, kdy bylo množství proteinů vyšší v rostlinách infikovaných (Y₂₀ a Y₄₀). Porovnáme-li množství proteinů ve skupinách rostlin vystavených kombinovanému stresu (Y₄₀) a rostlin kontrolních, pouze infikovaných (Y₂₀), byl první dny průběhu experimentu obsah proteinů vyšší v rostlinách Y₄₀, 15. a 22. den byl naopak vyšší v rostlinách Y₂₀.



Obr. 11: Množství rozpustných proteinů v rostlinných extraktech v prvním pokusu. K₂₀ - kontrolní rostliny, K₄₀ - rostliny pouze vystavené hodinovému teplotnímu šoku, Y₂₀ - rostliny infikované virem PVY^{NTN} bez působení teplotního šoku, Y₄₀ - rostliny infikované a poté vystavené teplotnímu šoku.

V druhém pokusu (obr. 12) bylo množství proteinů ve vzorcích ve všech odběrových dnech přibližně stejné. Z obr. 12 je však patrné, že došlo k nárůstu množství proteinů ve skupině Y₂₀ 1 hodinu, 21 dní a 28 dní po vystavení stresu. Ve skupině Y₄₀ vzrostl obsah proteinů až 28. den pokusu.



Obr. 12: Množství rozpustných proteinů v rostlinných extraktech ve druhém pokusu. K₂₀ - kontrolní rostliny, K₄₀ - rostliny pouze vystavené hodinovému teplotnímu šoku, Y₂₀ - rostliny infikované virem PVY^{NTN} bez působení teplotního šoku, Y₄₀ - rostliny infikované a poté vystavené teplotnímu šoku.

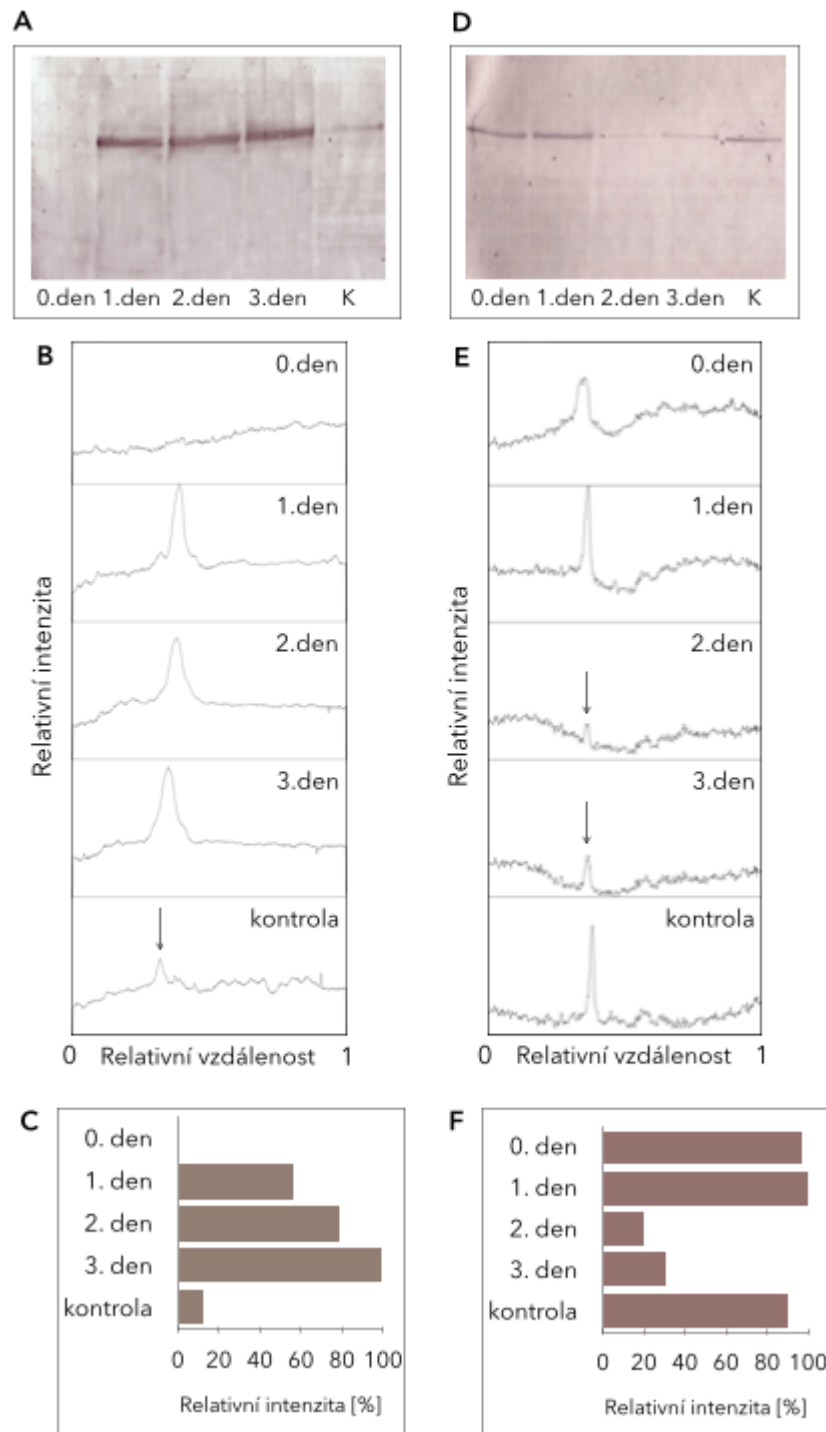
4.2 Solný stres v rostlinách okurky

Dalším cílem této práce bylo sledovat působení stresu solného. Tento typ abiotického stresu by sledován v rostlinách okurky, které byly po 5 týdnech růstu vyjmuty z půdy a vloženy do 100mM roztoku NaCl. Vzorčky byly odebrány po dobu čtyř dnů. Kontrolní skupiny tvořily rostliny vložené po 5 týdnech růstu do destilované vody. Vliv solného stresu byl sledován jednak v listech a jednak v kořenech rostlin okurky.

4.2.1 Vliv solného stresu na množství proteinu Hsp70

Abiotický stres, včetně stresu solného, vyvolává v rostlinách obranné reakce v podobě zvýšeného množství proteinu Hsp70. Přítomnost proteinu Hsp70 v experimentálních rostlinách byla detekována imunochemicky na nitrocelulosové membráně po separaci bílkovin v rostlinných vzorcích pomocí SDS-PAGE (obr. 13, *str.* 41), intenzita proužků byla vyhodnocena denzitometrickou analýzou v programu ImageJ.

Přítomnost proteinu Hsp70 byla detekována v listech a kořenech stresovaných rostlin ve všech čtyřech odběrových dnech (0. - 4. den). Z výsledků je patrné, že množství Hsp70 v listech stresovaných rostlin (obr. 13A, *str.* 41) bylo 0. den nižší v porovnání s kontrolním odběrem. V dalších dnech došlo k výraznému nárůstu Hsp70 ve stresovaných rostlinách. První den došlo k nárůstu o 57 %, druhý den o dalších 22 % a den třetí o dalších 21 %. V kořenech stresovaných rostlin bylo dosaženo odlišných výsledků (obr. 13D, *str.* 41). Množství Hsp70 v kořenech stresovaných rostlin 0. a 1. den bylo stejné jako množství Hsp70 v kontrolních rostlinách. Druhý a třetí došlo dokonce ke snížení množství Hsp70 (o 80 % a 69 %) v kořenech rostlin vystavených solnému stresu.

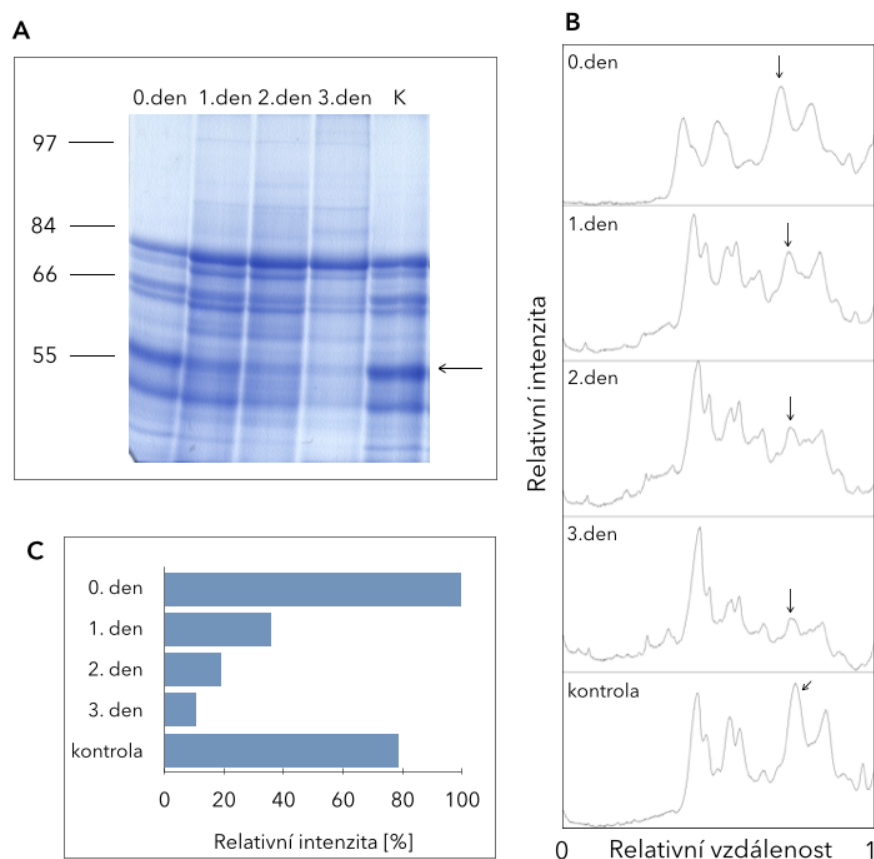


Obr. 13: Imunochemická detekce proteinů Hsp70 separovaných SDS elektroforézou v listech (A,B,C) a kořenech (D,E,F) rostlin okurky vystavených působení solného stresu v podobě 100mM NaCl, densitometrické vyhodnocení intenzity proužků programem ImageJ (B,E) a jeho grafické znázornění (C,F). K - kontrolní rostliny. 100% odpovídá nejintenzivnějšímu proužku v dané skupině (listy/kořeny).

4.2.2 Vliv solného stresu na množství proteinů detekovaných CBB v gelu po SDS-PAGE

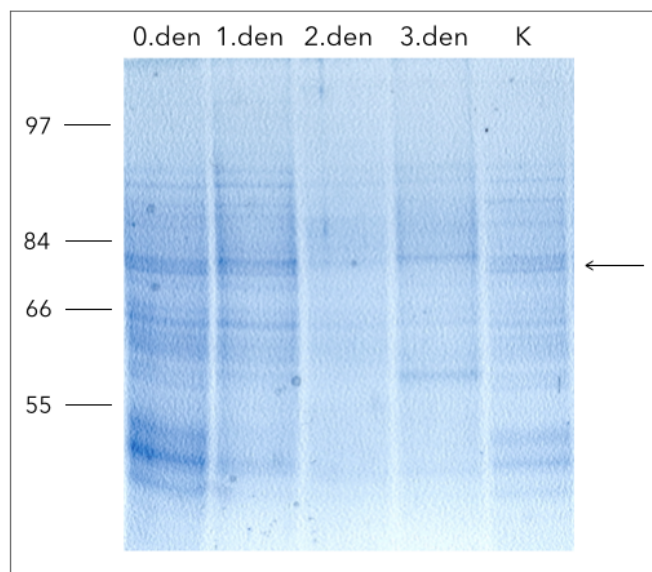
Po elektroforetické separaci proteinů v polyakrylamidovém gelu byly proteiny detekovány barvivem CBB. Bylo sledováno především množství enzymu Rubisco a množství proteinu Hsp70. Na obr. 14 (*str.* 43) je znázorněn gel po elektroforetické separaci proteinů obsažených v listech rostlin okurky vystavených solnému stresu. Nejsilnější proužek při srovnání s membránou po detekci Hsp70 pravděpodobně odpovídá tomuto proteinu. Z obrázku je patrné, že nejnižší množství tohoto proteinu ve stresovaných bylo 0. den, tj. 3 hodiny po aplikaci solného stresu. Další dny jeho obsah v experimentálních rostlinách vzrostl.

Na obr. 14 (*str.* 43) je šipkou označeno místo, kde se pravděpodobně nachází enzym Rubisco (resp. jeho velká podjednotka o molekulové hmotnosti 55 kDa). Množství tohoto enzymu ve stresovaných rostlinách značně klesal s dobou působení solného stresu. První den kleslo množství enzymu Rubisco ve stresovaných rostlinách o 64 %, druhý den o dalších 17 % a třetí den o dalších 8 %.



Obr. 14: Detekce rozpustných bílkovin v gelu po SDS elektroforéze pomocí CBB v listech rostlin okurky vystavených působení solného stresu v podobě 100mM NaCl (A), densitometrické vyhodnocení intenzity proužků programem ImageJ (B) a jeho grafické znázornění (C). Nejintenzivnější proužky odpovídají pravděpodobně proteinu Hsp70. Šipka označuje pravděpodobný výskyt velké podjednotky enzymu Rubisco (55 kDa). 100% odpovídá nejintenzivnějšímu proužku. Do jamek gelu bylo nanášeno stejné množství proteinů (50 µg).

Obsah proteinů byl sledován i v kořenech experimentálních rostlin (obr 15, *str.* 44). V kořenech rostlin je množství enzymu Rubisco velmi nízké, proto v oblasti okolo 55 kDa nejsou patrné žádné proužky. Šipkou je na obr. 15 (*str.* 44) označeno místo, kde se pravděpodobně nachází protein Hsp70. Množství proteinu Hsp70 v rostlinách vystavených solnému stresu bylo 0. a 1. den přibližně stejné jako v rostlinách kontrolních. Druhý a třetí den došlo ke značnému poklesu Hsp70. Tyto výsledky odpovídají výsledkům získaným imunochemickou detekcí Hsp70 na nitrocelulosové membráně (obr. 13D, *str.* 41). Jednotlivé proužky detekované CBB po SDS-PAGE nebyly vzhledem k jejich nízké intenzitě dále vyhodnocovány densitometricky.

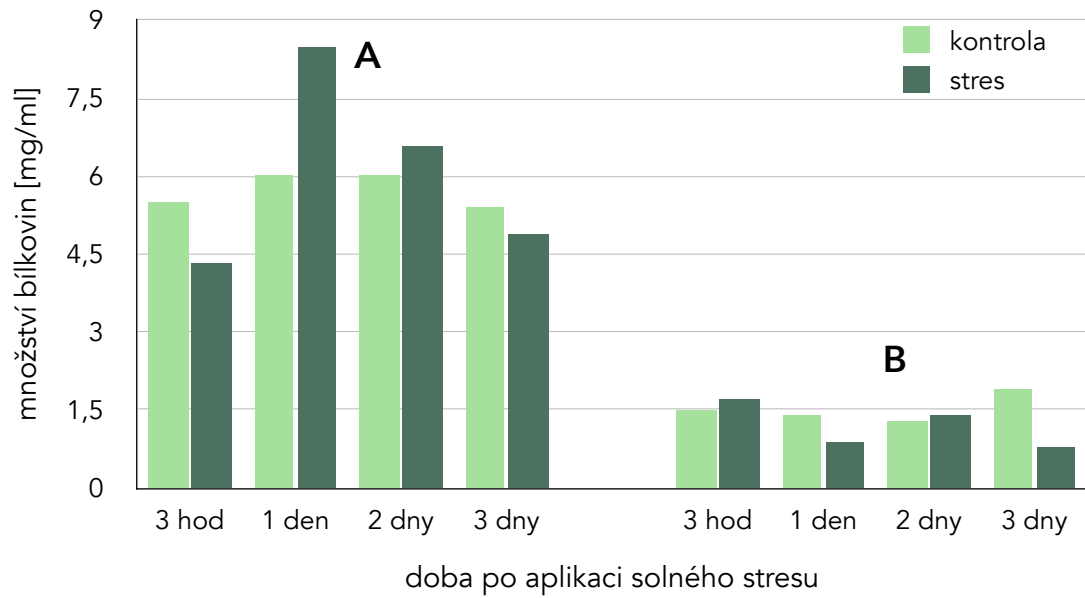


Obr. 15: Detekce rozpustných bílkovin v gelu po SDS elektroforéze pomocí CBB v kořenech rostlin okurky vystavených působení solného stresu v podobě 100mM NaCl. Šipka označuje pravděpodobný výskyt proteinu Hsp70. Do jamek gelu bylo nanášeno stejné množství proteinů (10 µg).

4.2.3 Vliv solného stresu na množství rozpustných proteinů

Množství rozpustných proteinů v listech a v kořenech rostlin okurky bylo stanoveno Lowryho metodou stanovení bílkovin. Byla sestrojena kalibrační přímka (obr. 10, *str.* 38) pro roztok BSA o známé koncentraci a rovnice kalibrační přímky byla použita k výpočtu koncentrace bílkovin v rostlinných extraktech.

V listech stresovaných rostlin (obr. 16A, *str.* 45) došlo k výraznému nárůstu množství proteinů 1. den po aplikaci solného stresu, další dny obsah rozpustných proteinů klesal. V kořenech rostlin (obr. 16B, *str.* 45) byl obsah proteinů srovnatelný s obsahem proteinů v kořenech rostlin kontrolních po celou dobu působení solného stresu.



Obr. 16: Množství rozpustných proteinů v listech (A) a kořenech (B) rostlin okurky. kontrola - kontrolní rostliny vložené po vyjmutí z půdy do destilované vody; stres - rostliny vystavené působení solného stresu v podobě 100mM NaCl.

5. DISKUZE

Rostliny odpovídají na vícečetné typy stresu jiným způsobem, než jakým by odpovídaly na jednotlivé stresové faktory, dochází k indukci specifické odpovědi. Tato odpověď zahrnuje změny jak na úrovni transkripce, tak změny buněčné a fyziologické. Specifita odpovědi vůči kombinovanému stresu je řízena celou řadou molekulárních mechanismů vytvářející komplexní regulační síť [2]. V některých případech dva stesy působí závažnější poškození než působení jednotlivých stresů, na druhou stranu jsou známy i případy, kdy mírnější působení jednoho stresoru indukuje rezistenci vůči dalším stresům [49]. V této práci byl studován specifický případ: působení virové infekce a teplotního šoku. Teplotní šok je spojen se syntézou Hsp proteinů, z nichž především Hsp70 má mnoho vlastností, které jsou důležité ve stresových podmínkách. Napomáhá opětovnému sbalení poškozených proteinů, účastní se syntézy proteinů *de novo*, podílí se na transportu proteinů do buněčných kompartmentů a na transportu proteinů určených k degradaci do proteasomu [27, 28]. Působení proteinů Hsp70 v průběhu virové infekce však není jednoznačné. Z některých studií vyplývá, že se Hsp70 podílí na replikaci viru a napomáhají jejich multiplikaci a šíření v rostlině [28, 32, 34-37], jiné studie naopak naznačují, že interakce proteinů Hsp70 s virovými částicemi může směřovat k jejich degradaci v proteasomu a je tak obranou reakcí rostliny na napadení patogenem [50].

V této práci byl v prvním pokusu imunochemickou metodou zjištěn vyšší obsah viru PVY^{NTN} v rostlinách tabáku vystavených teplotnímu šoku než v rostlinách pouze infikovaných (obr. 5, str. 33), což by odpovídalo úloze Hsp70 v multiplikaci viru. Na druhou stranu k maximu infekce došlo v rostlinách vystavených po inokulaci PVY^{NTN} jednohodinovému teplotnímu šoku při 42°C (rostlinách Y₄₀) později (až 22. den infekce) než v rostlinách pouze infikovaných (rostlinách Y₂₀), kde k maximu obsahu viru došlo již 12. den. Obsah viru odpovídal množství proteinu Hsp70 detekovaného imunochemicky pomocí specifické protilátky. Nejvyšší obsah Hsp70 v tomto pokusu byl zjištěn 22. den u rostlin skupiny Y₄₀ (obr. 7, str. 35). Z literatury je známo, že zvýšená syntéza Hsp70 během infekce Potyviry je pravděpodobně způsobena odpovědí na nesbalené proteiny přítomné

v cytoplasmě včetně nesbalených virových částic (tzv. odpovědí UPR, unfolded protein response) [35]. Aktivace genu pro Hsp70 začíná trimerizací faktorů těchto proteinů HSF v cytoplasmě a pokračuje vstupem HSF do jádra a jejich navázání na DNA. Faktory HSF jsou patrně první molekuly vnímající stres a odpovídající na něj. Exprese těchto faktorů je patrně negativně regulovaná Hsp70. Jsou-li proteiny Hsp ve stresových podmínkách zapotřebí k interakci s poškozenými proteiny, jejich množství klesá a exprese faktorů HSF se zvyšuje (obr. 3, *str.* 15) [20, 25]. Některé rostlinné viry kódují vlastní homolog Hsp70, který spolu s obalovým proteinem usnadňuje transport plasmodesmy, a tím umožňuje šíření viru z buňky do buňky [50].

V druhém pokusu byl imunochemicky zjištěn jak obsah viru, tak množství Hsp70 až v pozdní fázi působení stresu (v obou případech až 21. a 28. den infekce) (obr. 8, *str.* 36). Obvykle dochází k nejvyššímu nárůstu obsahu viru mezi 10. a 17. dnem infekce [12, 17, 48]. Průběh virové infekce ovlivňuje celá řada faktorů. Velkou roli hrají podmínky, za kterých jsou rostliny pěstovány, tedy teplota, světelné záření, relativní vlhkost vzduchu, dostupnost živin apod. Přestože oba pokusy byly provedeny v klimatizovaném boxu za konstantně nastavených podmínek (teplota 20°C, osvětlení 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, relativní vlhkost 75 %, režim 16 hodin světlo / 8 hodin tma, stáří rostlin 8 týdnů), obsah virového obalového proteinu se liší. Úlohu má pravděpodobně i způsob aplikace viru na rostliny experimentátorem a rozsah poškození listů rostlin při inokulaci. Množství proteinu Hsp70 v druhém pokusu je však opět nejvyšší ve skupině Y₄₀ a odpovídá maximu obsahu obalového proteinu viru PVY^{NTN} detekovaného v této skupině, a to 21. den infekce (obr. 6, *str.* 33).

Studium teplotního šoku se současným působením virové infekce je tedy pravděpodobně komplexním procesem, který závisí nejen na vhodném načasování působení teplotního šoku, ale také na charakteru a závažnosti virové infekce. Z toho důvodu byl současně sledován obecný případ indukce proteinů Hsp70 solným stresem v rostlinách okurky [51, 52]. V předchozích pracích [52] bylo množství Na⁺ iontů v listech a kořenech stanoveno a potvrzeno metodou atomové emisní spektrometrie. V této práci bylo potvrzeno, že v průběhu působení solného stresu dochází v listech rostlin k postupnému

nárůstu množství proteinů Hsp70 (obr. 13A, str. 41). Tyto proteiny zde mohou napomáhat správnému sbalení proteinů poškozených solným stresem, případně jejich transportu a degradaci. V kořenech rostlin však vlivem stresu došlo ke snížení množství proteinů Hsp70 (obr. 13D, str. 41). Tento pokles je pravděpodobně způsoben přímým vystavením kořenů působení stresu, což má za následek výrazné poškození a neschopnost již syntetizovat proteiny *de novo*.

Množství celkových rozpustných proteinů se vlivem kombinovaného stresu i jednotlivých stresů mění (obr. 11 a 12, str. 39; obr. 16, str. 45). Tendence této změny však není jednoznačná vzhledem k tomu, že množství některých proteinů (jako Hsp70, obalového proteinu viru PVY^{NTN}, proteinů spojených s patogenezí apod.) roste, zatímco obsah ostatních proteinů typu Rubisco klesá (obr. 9, str. 37; obr. 14, str. 43). Přestože je studium působení vícečetných stresových faktorů složitější než studium působení izolovaných stresorů, jedná se o důležitou problematiku a výsledky studií zabývajících se kombinovaným stresem působícím na rostliny mají nesporný praktický význam.

6. ZÁVĚR

1. V rostlinách tabáku množství obalového proteinu PVY^{NTN} odpovídalo množství proteinu Hsp70.
2. Ve skupině rostlin nejprve infikovaných PVY^{NTN} a poté vystavených teplotnímu šoku bylo množství proteinu Hsp70 vyšší než v rostlinách pouze infikovaných.
3. Abiotický stres způsobený 100mM NaCl indukoval Hsp70 v listech rostlin okurky, zatímco v kořenech rostlin došlo k poklesu množství Hsp70.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Lee, J.-H., Yun, H.S., Kwon, C.: Mol. Cells 34, 109-116 (2012)
- [2] Atkinson, N.J., Urwin, P.E.: J. Exp. Bot. 63, 3523-3544 (2012)
- [3] Jäger, K., Fábrián, A., Barnabás, B.: Acta Biol. Szeged. 52, 67-71 (2008)
- [4] Mittler, R.: Trends Plants Sci. 11, 15-19 (2006)
- [5] Doubnerová, V., Janošková, M., Synková, H., Šubr, Z., Čerovská, N., Ryšlavá, H.: Gen. Appl. Plant Physiol. 33, 123-140 (2007)
- [6] Wang, Y., Bao, Z., Zhu, Y., and Hua, J.: Mol. Plant Microbe In. 22, 498-506 (2009)
- [7] Mayek-Pérez, N., García-Espinosa, R., López-Castañeda, C., Acosta-Gallegos, J.A., Simpson, J.: Physiol. Mol. Plant Pathol. 60, 185-195 (2002)
- [8] Mohr, P.G., Cahill, D.M.: Funct. Plant Biol. 30, 461-469 (2003)
- [9] Wiese, J., Kranz, T., Schubert, S.: Plant Biol. 6, 529-536 (2004)
- [10] Achuo, E.A., Prinsen, E., Höfte, M.: Plant Pathol. 55, 178-186 (2006)
- [11] Hu, G.J., Hong, N., Wang, L.P., Hu, H.J., Wang, G.P.: Crop Prot. 37, 20-25 (2012)
- [12] Doubnerová, V.: *Studium regulace NADP-malátdehydrogenasy (dekarboxylační) a vliv stresu na tento enzym*: Kandidátská disertační práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, str. 19-23 (2008)
- [13] Lucas, W.J.: Virology 344, 169-184 (2006)
- [14] Schoelz, J.E., Harries, P.A., Nelson, R.S.: Mol. Plant 4, 813-831 (2011)
- [15] Dangl, J.L., Jones, J.D.G.: Nature 411, 826-833 (2001)
- [16] Doubnerová, V., Ryšlavá, H.: Plant Sci. 180, 575-583 (2011)
- [17] Doubnerová, V., Müller, K., Čerovská, N., Synková, H., Spoustová, P., Ryšlavá, H.: Int. J. Mol. Sci. 10, 3583-3598 (2009)
- [18] Mandadi, K.K., Scholthof, K.-B.G.: Plant Cell 25, 1489-1505 (2013)
- [19] Scholthof, K.-B.G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster, G.D.: Mol. Plant Pathol. 12, 938-954 (2011)

- [20] Doubnerová, V., Ryšlavá, H.: *Roles of Hsp70 in plant abiotic stress*, v knize *Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress* (Gaur, R.K., Sharma, P. eds.), CRC Press Taylor & Francis Group, str. 44-66 (2014)
- [21] Rodziewicz, P., Swarcewicz, B., Chmielewska, K., Wojakowska, A., Stobiecki, M.: *Acta Physiol. Plant.* 36, 1-19 (2014)
- [22] Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I.T., Renaut, J.: *J. Proteomics* 74, 1301-1322 (2011)
- [23] Pétriacq P, de Bont L., Tcherkez, G., Gakière, B.: *Plant Signal. Behav.* 8, 7-17 (2013)
- [24] Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., Zhu, J.K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6896-6901 (2000)
- [25] Jungkunz, I., Link, K., Vogel, F., Voll, L.M., Sonnewald, S., Sonnewald, U.: *Plant J.* 66, 983-995 (2011)
- [26] Gorovits, R., Czosnek, H.: *Plant Physiol. Bioch.* 46, 482-492 (2008)
- [27] Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A.: *Trends Plants Sci.* 9, 244-252 (2004)
- [28] Chen, Z.R., Zhou, T., Wu, X.H., Hong, Y.G., Fan, Z.F., Li, H.F.: *Mol. Plant Pathol.* 9, 809-817 (2008)
- [29] Nelson, D.L., Cox, M.M.: *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York (2004)
- [30] Aoki, K., Kragler, F., Xoconostle-Cázares, B., Lucas, W.J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10, 16342-16347 (2002)
- [31] Su, P.H., Li, H.M.: *Plant Physiol.* 146, 1231-1241 (2008)
- [32] Hofius, D., Maier, A.T., Dietrich, C., Jungkunz, I., Bornke, F., Maiss, E., Sonnewald, U.: *J. Virol.* 81, 11870-11880 (2007)
- [33] Shavrukov, Y.: *J. Exp. Bot.* 64, 119-127 (2013)
- [34] Wang, R.Y., Stork, J., Nagy, P.D.: *J. Virol.* 83, 3276-3287 (2009)
- [35] Hafrén, A., Hofius, D., Rönnholm, G., Sonnewald, U., Mäkinen, K.: *Plant Cell* 22, 523-535 (2008)
- [36] Jockusch, H., Wiegand, C., Mersch, B., and Rajes, D.: *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 914-917 (2001)
- [37] Dufresne P. J., Thivierge K., Cotton S., Beauchemin C., Ide C., Ubalijoro E., Laliberte J. F., Fortin M. G.: *Virology* 374, 217-227 (2008)

- [38] Doubnerová, V., Ryšlavá, H.: *Biochem. Anal. Biochem.* **2**, doi: 10.4172/2161-1009.1000e141 (2013)
- [39] Bartosz, G.: *Acta Physiol. Plant.* **19**, 47-64 (1997)
- [40] Durner, J., Klessig, D.F.: *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 369-374 (1999)
- [41] Scheler, C., Durner, J., Astier, J.: *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 534-539 (2013)
- [42] Clark, D., Durner, J., Navarre, D.A., Klessig, D.F.: *Mol. Plant Microbe In.* **13**, 1380-1384 (2000)
- [43] Ryšlavá, H., Doubnerová, V.: *Chem. Listy* **104**, 1175-1180 (2010)
- [44] Hýsková, V., Miedzińska, L., Dobrá, J., Vaňková, R., Ryšlavá, H.: *J. Plant Physiol.* **171**, 19-25 (2014)
- [45] Laemmli, U.K.: *Nature* **227**, 680-685 (1970)
- [46] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265-75 (1951)
- [47] Čerovská, N.: *Plant Pathol.* **47**, 505-509 (1998)
- [48] Kovařová, T.: *Vliv stresu na NADP-dependentní enzymy ve vyšších rostlinách*: diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, str. 36-53 (2012)
- [49] Sabehat, A., Weiss, D., Lurie, S.: *Physiol. Plant.* **103**, 437-441 (1998)
- [50] Götz, M., Popovski, S., Kollenberg, M., Gorovits, R., Brown, J.K., Cicero, J.M., Czosnek, H., Winter, S., Ghanim, M.: *J. Virol.* **86**, 13241-13252 (2012)
- [51] Ngara, R., Ndimba, R., Borch-Jensen, J., Jensen, O.N., Ndimba, B.: *J. Proteomics* **75**, 4139-4150 (2012)
- [52] Plisková, V.: *Vliv abiotického stresu na metabolismus rostlin okurky (Cucumis sativa, L.)*: diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, str. 40-42 (2013)

