

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Úloha oxidu dusnatého ve vývoji kořenů rostlin se
zaměřením na studium
enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Veronika Kraiczová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.

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

V Olomouci dne 22. 4. 2016

Veronika Kraiczová

Velmi chci poděkovat své školitelce paní doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za pomoc, odborné vedení, cenné rady, trpělivost, za poskytnutí potřebné literatury a čas věnovaný při zpracovávání teoretické části diplomové práce.

Dále chci moc poděkovat paní Mgr. Lucii Činčalové, Ph.D. a Mgr. Tereze Tiché za obětavou pomoc, trpělivost a rady při vypracování experimentální části diplomové práce. Kolektivu Katedry biochemie děkuji za vytvoření příjemné atmosféry a pomoc při vypracování mé práce.

Tímto bych chtěla také poděkovat své rodině, partnerovi a přátelům za jejich podporu a dodávání potřebné síly k úspěšnému dokončení práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Veronika Kraiczová
Název práce	Úloha oxidu dusnatého ve vývoji kořene rostlin se zaměřením na studium enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Diplomová práce je zaměřena na studium úlohy oxidu dusnatého v kořenech a nadzemních částech u dvou genotypů *Solanum* spp.. Důležitou zásobní a transportní formou oxidu dusnatého (NO) *in vivo* je nízkomolekulární S-nitrosothiol, tj. S-nitrosoglutathion (GSNO), který je metabolizován enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR). Tento enzym udržuje v rámci metabolismu GSNO homeostázu NO a dalších reaktivních forem dusíku. Oxid dusnatý je klíčová molekula ve fyziologických procesech i v reakcích na působení abiotických a biotických stresových faktorů. V experimentální části diplomové práce byl sledován vliv aplikace modulátorů NO (inhibitoru GSNOR, donoru a lapače NO a antioxidantu GSH) na vývoj rostlin za fyziologických podmínek a v případě salinitního stresu (zvýšená koncentrace NaCl). Pozitivní vliv na vývoj rostliny byl pozorován po aplikaci inhibitoru N6022 a donoru NO (GSNO), naopak aplikace lapače NO (PTIO) a redukovaného glutathionu významně inhibovala růst semenáčků. Na základě realizovaných experimentů zahrnujících detekci produkce reaktivních forem dusíku, stanovení intenzity S-nitrosylace, aktivity a případně exprese *GSNOR* byla prokázána významná role GSNOR v regulaci procesu S-nitrosylace a následně ve vývoji rostlin za fyziologických podmínek a v případě vystavení salinitnímu stresu.

Klíčová slova	Oxid dusnatý, peroxyinitrit, salinita, <i>Solanum</i> spp., S-nitrosylace, S-nitrosoglutathionreduktasa
Počet stran	94
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Veronika Kraiczová
Title	Role of nitric oxide in the development of plant root with a focus on studies study of the S-nitrosogluthathione reductase enzyme
Type of thesis	Master
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2016

Abstract

This thesis is focused to studies of the role of nitric oxide in the root and the aerial parta in two genotypes of *Solanum* spp.. A low molecular weight S-nitrosothiol, S-nitrosogluthathione, is an important storage and transport form of nitric oxide *in vivo*, which is metabolized by the enzyme S-nitrosogluthathione reductase. This enzyme maintains NO homeostasis within metabolism of GSNO and other reactive nitrogen species. Nitric oxide is a key molecule in physiological processes and responses to abiotic and biotic stress conditions. In the experimental part of thesis, effects of application of modulators of NO level (GSNOR inhibitor, NO donor and NO scavenger, GSH) were observed in plants under physiological conditions and in case of exposure to salinity stress. A positive influence on the development of the plants was observed after application of a GSNOR inhibitor N6022 and NO donor (GSNO), on the other side application of NO scavenger (PTIO) and reduced glutathione decrease significantly the growth of seedlings. On the basis of the realized experiments including the detection of production of reactive nitrogen species, determination of the S-nitrosylation level, the activity and expression of GSNOR, a significant role of GSNOR has been demonstrated in regulation of the process of S-nitrosylation and subsequently in the development of plants under physiological conditions and in case of exposure to salinity stress.

Keywords	Nitric oxide, peroxynitrite, salinity, <i>Solanum</i> spp., S-nitrosylation, S-nitrosogluthathione reductase
Number of pages	94
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Reaktivní formy dusíku.....	2
2.1.1 Mechanismy vzniku a odbourávání RNS.....	2
2.1.2 Oxidu dusnatý	5
2.1.3 Peroxynitrit	7
2.2 Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku	10
2.2.1 Nitrace proteinů.....	10
2.2.2 S-nitrosylace proteinů	11
2.3 S-nitrosoglutathionreduktasa	20
2.3.1 Mechanismus působení a vlastnosti GSNOR	21
2.3.2 Význam GSNOR u rostlin	26
2.3.2.1 Úloha GSNOR ve fyziologii rostlin.....	26
2.3.2.2 Úloha GSNOR při stresových podmínkách	27
2.3.2.2.1. Salinita	28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
3.1 Materiál a přístroje.....	34
3.1.1 Chemikálie	34
3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení.....	34
3.1.3 Rostlinný materiál	35
3.1.4 Příprava média	36
3.1.5 Příprava S-nitrosoglutathionu (GSNO).....	36
3.1.6 Vyhodnocení délky kořenů a nadzemní části.....	37
3.2 Metody	37
3.2.1 Histochemické stanovení produkce reaktivních forem dusíku	37
3.2.2 Extrakce	38
3.2.3 Stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy	38
3.2.4 Stanovení S-nitrosothiolů metodou Savillova.....	39
3.2.5 Stanovení proteinů Bradfordovou metodou	40
3.2.6 Expresa <i>GSNOR</i>	40
6. ZÁVĚR	43
7. LITERATURA	44
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	58

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo zpracování nových poznatků týkajících se úlohy reaktivních forem dusíku ve vývoji rostlin za fyziologických i stresových podmínek se zaměřením na studium úlohy S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) a současně zpracovat nově publikované poznatky týkající se procesu S-nitrosylace a nitrace proteinů.

V experimentální části bylo cílem studium úlohy S-nitrosoglutathionreduktasy a reaktivních forem dusíku v procesu vývoje kořene s využitím modulátorů aktivity GSNOR (inhibitor, donor a lapač oxidu dusnatého) za fyziologických podmínek i v případě vystavení rostliny salinitního stresu.

1. Stanovení fyziologických parametrů klíčích rostlin (délka a hmotnost kořenů a nadzemních částí)
2. Histochemická detekce produkce RNS v apikální části kořene
3. Stanovení aktivity GSNOR a exprese *GSNOR*
4. Sledování hladiny S-nitrosothiolů

1. ÚVOD

Klíčení je důležitý proces, při kterém dochází k obnovení metabolické aktivity semen. Významnými morfologickými změnami, které se dějí vlivem specifických podmínek (teplota, obsah kyslíku, intenzita světla), je umožněno nasávání vody, čímž je zahájen proces klíčení. Dochází k prodlužování buněk radikuly a hypokotylu embrya. Rostoucí embryo (klíčící rostlina) musí vyvinout mechanickou sílu na prorůstání radikuly a plumuly půdním substrátem.

Již od roku 1979, kdy byl oxid dusnatý (NO) detekován v rostlinných buňkách, je studován jeho významný účinek v rostlinných systémech za fyziologických i stresových podmínek. V mnoha studiích bylo prokázáno široké spektrum regulačních funkcí NO, který se podílí na regulaci klíčení semen, růstu rostliny, vývoji kořenového systému, pohybu svěřacích buněk a hraje důležitou roli v obranných reakcích aktivovaných různými stresovými faktory. Často pod kontrolou rostlinných hormonů působí oxid dusnatý jako druhý posel v souvislosti s řadou signálních reakcí v rostlině.

Oxid dusnatý jako velmi reaktivní molekula, reaguje s glutathionem za vzniku S-nitrosoglutathionu (GSNO), který je považován za hlavní rezervoár NO v buňce, schopný generovat S-nitrosylované proteiny. Buněčná úroveň tohoto nízkomolekulárního S-nitrosothiolu je řízena evolučně konzervativním, cytosolovým enzymem S-nitroglutathionreduktasou, který katalyzuje NADH-dependentní redukci GSNO. Tento enzym prostřednictvím přeměny GSNO významně ovlivňuje homeostázu oxidu dusnatého a hladinu dalších S-nitrosothiolů. Proto jsou v posledních letech intenzivně studovány dráhy oxidu dusnatého a reaktivních forem dusíku a dále S-nitrosylace proteinů v souvislosti s aktivitou GSNOR.

S-nitrosylace jako posttranslační modifikace poskytuje S-nitrosothioly (RSNO), proteiny na jejichž –SH skupiny cysteinů je napojen NO. RSNO se významným způsobem zapojují v regulaci signálních drah, jsou v biologických systémech považovány za donory NO a účastní se reakcí zabraňujících oxidativnímu stresu v rostlinách.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Reaktivní formy dusíku

Oxid dusnatý je velmi reaktivní malá molekula, od které jsou odvozené další biologicky aktivní molekuly, souhrnně označované jako reaktivní formy dusíku (RNS, reactive nitrogen species). Mezi RNS patří veškeré oxidy dusíku, peroxynitrit (ONOO^-) a S-nitrosothioly (RSNOs). Volný radikál NO také poskytuje NO^- nebo NO^+ ziskem či ztrátou elektronu. Reaktivní formy dusíku jsou přehledně shrnuty v tab. 1.

Tab. 1: Přehled reaktivních forem dusíku a jejich zdroje v buňkách (převzato a upraveno Hill *et al.*, 2010)

Název	Vzorec	Intracelulární zdroje
Oxid dusnatý	NO	sGC, CcOx, thiolový radikál ($\text{RS}\cdot$)
Nitroxyl	HNO nebo NO^-	Přechodné kovy, nukleofily (např. thioly)
Nitrosioniový iont	NO^+	Thiolátový aniont
Nitrit	NO_2^-	Hem
Nitrát	NO_3^-	
Oxid dusitý	N_2O_3	Thioly, aminy
Oxid dusný	N_2O	
Oxid dusičitý	NO_2 nebo NO_2	Thioly, fenoly (tyrosin)
Peroxynitrit	ONOO^- nebo ONOOH	Thioly, přechodné kovy
Peroxynitrát	O_2NOO^-	?
Nitrosoperoxokarbonát	ONOOCO_2	Převážně tyroxin
Hydroxylamin	NH_2OH	
Amoniak	NH_3	

Zvýšená produkce RNS může mít dva hlavní efekty v buňce: 1. zapojení v signalizačních procesech, pokud je produkce RNS pod buněčnou kontrolou; 2. nitrooxidativní poškození cílových molekul, v případě že RNS jsou produkovány v nadbytku, což může vést až k patologickým projevům (Corpas *et al.*, 2008a; Rubbo a Radi, 2008; Wang *et al.*, 2006; White *et al.*, 2010). Funkce RNS v rostlinných buňkách jsou velmi rozmanité a komplexní, protože se podílejí na mnoha různých fyziologických procesech.

2.1.1 Mechanismy vzniku a odbourávání RNS

Molekulární mechanismy odpovědné za syntézu NO v rostlinách jsou stále předmětem studia a diskuze. Hlavní produkce NO u savců je zprostředkována NADH dependentní oxidací L-argininu (Arg) na L-citrulin za pomoci enzymu NO synthasy (NOS, EC 1.14.13.39) (Alderton *et al.*, 2001). NO synthasy jsou hemoproteiny příbuzné s cytochromy P450. Syntéza NO pomocí NOS je závislá na dostupnosti prostetických

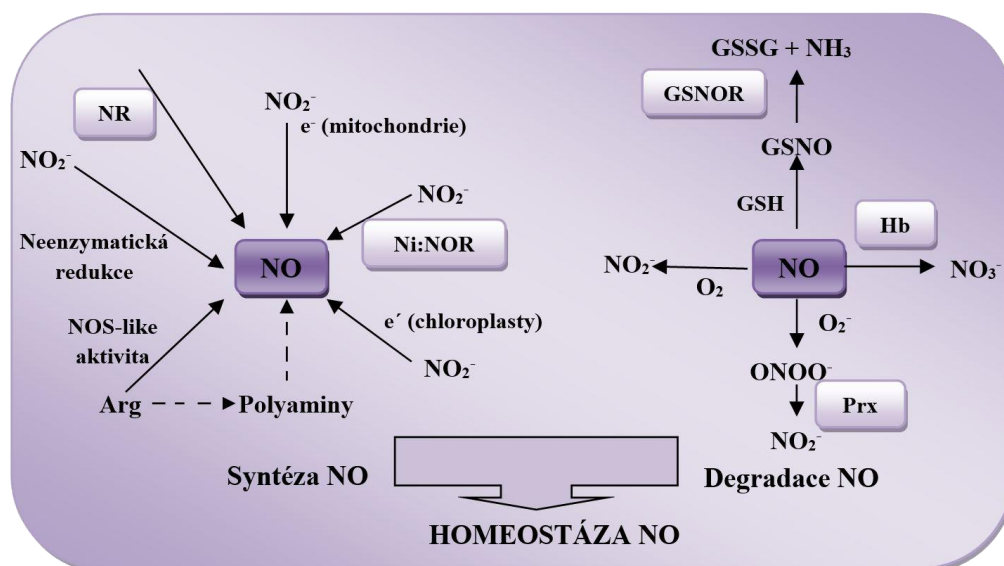
skupin, jako je kalmodulin a také čtyř dalších kofaktorů (hem, FAD, FMN a tetrahydropterin). V živočišných buňkách byly identifikovány tři odlišné izoformy tohoto enzymu. Patří sem endoteliální NOS (eNOS), neuronální NOS (nNOS) a inducibilní NOS (iNOS) (Kavya *et al.*, 2006, Kone *et al.*, 2003). Byla provedena řada studií s cílem potvrdit přítomnost NOS v rostlinách. Inhibitory savčích NOS byly úspěšně použity k blokování produkce NO v rostlinách a byla prokázána tvorba L-citrulinu z Arg (Del Río *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2011). Detekovaná NOS aktivita u rostlin je v odborných člancích uváděna jako NOS-like aktivita (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998; Besson-Bard *et al.*, 2008; Corpas *et al.*, 2009a). Přelomovou se stala studie Foresi *et al.* (2010) charakterizující NOS ze zelené řasy *Ostrococcus tauri* z třídy *Prasinophyceae*.

Za hlavní zdroj NO v rostlinách je považována redukce nitritů (NO_2^-), která může probíhat neenzymovými i enzymovými mechanismy. K neenzymové redukci nitritu dochází spontánně v apoplastu a probíhá v důsledku kyselých podmínek za přítomnosti kyseliny askorbové nebo fenolů (Bethke *et al.*, 2004). Redukce nitritu enzymovou cestou zahrnuje reakci katalyzovanou nitrit:NO reduktasou (Ni:NOR, EC 1.7.2.1) v plazmatické membráně (Stöhr *et al.*, 2001) a reakci katalyzovanou nitrátreduktasou (NR, EC 1.7.1.1) v cytosolu (Yamasaki *et al.*, 1999; Rockel *et al.*, 2002). Primární úlohou NR v rostlinách je asimilace dusíku přes NAD(P)H dependentní redukci nitritu, který je následně redukován na amonné ionty nitrit reduktasou (NIR, EC 1.7.1.4). NR také může katalyzovat přeměnu nitritu na NO. Účinnost NR v produkci NO je však nízká a lze předpokládat, že není relevantní za fyziologických podmínek (Yamasaki *et al.*, 1999; Rockel *et al.*, 2002). Hlavní role NR v syntéze NO je produkce nitritu, který je následně redukován na NO s využitím elektronů z mitochondriálního respiračního řetězce (Modolo *et al.*, 2005).

Snížení mitochondriální aktivity nitritu bylo detekováno v různých druzích rostlin, v řase *Chlorella sorokiniana*, v suspenzi buněk tabáku a v mitochondriích izolovaných z kvasinek a živočišných buněk (Castello *et al.*, 2006; Modolo *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2005). Tyto výsledky naznačují existenci společného Arg-nezávislého mechanismu pro produkci NO v živých organismech. Kromě mitochondriálního řetězce je redukce nitritu na NO umožněna pomocí elektronových transportérů chloroplastů (Jasid *et al.*, 2006).

V poslední době byla prokázána úloha polyaminů v produkci NO v rostlinách (Tun *et al.*, 2006). Arginin jako biosyntetický prekurzor polyaminů může nepřímo ovlivňovat tvorbu NO nezávisle na NOS aktivitě, jak bylo zjištěno studiem *Arabidopsis*

mutantů postrádajících arginasovou aktivitu (EC 3.5.3.1) (Flores *et al.*, 2008). Další navrhovaný mechanismus pro rostlinnou biosyntézu NO zahrnuje hydroxylaminu (Rumer *et al.*, 2009). Exogenní dodávky hydroxylaminu ke kulturám tabákových buněk vedou k uvolňování NO. Fyziologický význam tohoto účinku zůstává nejasný, protože přirozený výskyt hydroxylaminu v rostlinách nebyl dosud jednoznačně prokázán (Gupta *et al.*, 2011).



Obr. 1: Produkce a degradace oxidu dusnatého (převzato ze Salgado *et al.*, 2013)

NO může reagovat neenzymově se superoxidovým aniontem za vzniku peroxynitritu, jedná se o významnou reakci v signalizaci, homeostázi NO a tím i v mechanismu degradace NO (Radi *et al.*, 2002). Nedávné studie ukázaly, že vnější NAD(P)H dehydrogenasy (EC 1.6.99.1) z rostlinných mitochondrií jsou důležitým zdrojem tvorby superoxidu, který může reagovat s přítomným NO, což vede k mitochondriální degradaci NO (de Oliveira *et al.*, 2008; Wulff *et al.*, 2009). ONOO⁻ je následně enzymově degradován na dusitan pomocí peroxiredoxinu (Prx, EC 1.11.1.15). Ve studii Romero-Puertas *et al.* (2007) byla prokázána inhibice Prx II E aktivity S-nitrosylací, což vede k inhibici degradace ONOO⁻, tzn. S-nitrosylace reguluje hladinu intracelulárního ONOO⁻.

Oxid dusnatý reaguje s redukováným glutathionem (GSH), kdy dochází ke vzniku S-nitrosogluthionu (GSNO), významného nízkomolekulárního S-nitrosothiolu. GSNO je hlavní zásobárna NO a donorem NO v buňkách (Lindermayer *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2001). Intracelulární hladina GSNO je regulována enzymem S-nitrosogluthionreduktasou (GSNOR, EC 1.1.1.1).

Oxid dusnatý se může vázat na hemové skupiny rostlinných hemoglobinů. Bylo prokázáno, že okysličené třídy 1 nesymbiotických hemoglobinů (Hb) katalyzují přeměnu NO na dusičnany (Igamberdiev *et al.*, 2005). Tyto hemoglobiny hrají důležitou roli v degradaci NO zejména za hypoxických podmínek.

Tab. 2: Lokalizace produkce NO v rostlinných buňkách (zpracováno podle Fröhlich a Durner 2011).

Lokalizace produkce NO	Typ produkce NO
Buněčná stěna	Neenzymová produkce
Plazmatická membrána	Nitrit:NO reduktasa, vázaná na PM
Apoplast	Polyaminoxidasa
Cytosol	Nitrátreduktasa NADPH:nitrátreduktasa Hemoproteiny/proteiny obsahující molybden jako kofaktor/Fe-S klastry
Mitochondrie	Arginin-dependentní tvorba NO GSNO GSNOR Elektronový transportní řetězec
Chloroplasty	Arginin-dependentní tvorba NO GSNO GSNOR
Peroxisomy	Arginin-dependentní tvorba NO GSNO GSNOR Hemoproteiny/proteiny obsahující molybden jako kofaktor/Fe-S klastry Katalasa Xanthinoxidoreduktasa
Endoplazmatické retikulum	Hemoproteiny/proteiny obsahující molybden jako kofaktor/Fe-S klastry

2.1.2 Oxidu dusnatý

Oxid dusnatý je neutrální molekula malých rozměrů vyskytující se v živočišných i rostlinných buňkách. Jedná se o reaktivní volný radikál s nepárovým elektronem, který je stabilizován dvěma mechanismy: 1. reakcí s partnery obsahující také nepárové elektrony nebo 2. interakcí s d-orbitaly přechodných kovů, nejčastěji železa (Thomas *et al.*, 2003).

NO je molekula s velmi krátkou dobou života, která je dobře rozpustná v hydrofobním prostředí. Tato vlastnost umožňuje jeho volnou difúzi přes biologickou membránu z jednoho prostoru do druhého (Lancaster, 1997). Poprvé byla přítomnost a funkce NO popsána u savců, kde se účastní důležitých procesů, např. vasorelaxace, neurotransmise, cytotoxicity a regulace imunitního systému. Přítomnost NO

v rostlinných buňkách, kde hraje významnou roli ve fyziologických i patologických procesech, byla poprvé zaznamenána v roce 1979 (Klepper, 1979).

Oxid dusnatý jako redoxně aktivní molekula hraje klíčovou roli v širokém spektru fyziologických a vývojových procesů, jako je kontrola klíčení semen, růst listů, rozvoj adventních kořenů, vývoj květu, uzavírání průduchů a reakce na biotické a abiotické stresové podmínky (Neill *et al.*, 2002; Pagnussat *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2008; Leitner *et al.*, 2009). Jako klíčový regulátor také zprostředkovává senescenci listů a buněčnou smrt u vyšších rostlin (Guo a Crawford, 2005; Zago *et al.*, 2006). Bylo prokázáno, že NO reguluje řadu fyziologických dějů několika způsoby, buď přímo ovlivněním transkripce genů (Huang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Polverari *et al.*, 2003; Parani *et al.*, 2004; Shoulars *et al.*, 2008) nebo prostřednictvím interakce s dalšími malými biomolekulami. Příkladem je reakce NO s peroxidem vodíku (H₂O₂) nebo dalšími reaktivními formami kyslíku (ROS, reactive oxygen species) (Beligni *et al.*, 2002; Guo a Crawford, 2005). Ve studii Delledonne *et al.* (2001) bylo zjištěno, že NO v kombinaci s H₂O₂ umožňuje po rozpoznání patogenu spuštění buněčné smrti ve spojení s hypersenzitivní reakcí (HR).

Tab. 3: Funkce oxidu dusnatého v rostlinném systému (podle Piterkové *et al.*, 2008)

Funkce	
<i>Fyziologické pochody</i>	růst a vývoj klíčení vývoj kořenové systému pohyb svěřacích buněk průduchů senescence a programovaná buněčná smrt lignifikace buněčné stěny metabolismus buněčných organel
<i>Funkce v buněčných organech</i>	
Chloroplasty	biosyntéza chlorofylu, fotofosforylace
Mitochondrie	regulace cytochromu <i>c</i> oxidasy
Peroxisomy	regulace katalasy a askorbátperoxidasy
Cytosol	regulace akonitasy
<i>Biotický stres</i>	programovaná buněčná smrt hypersenzitivní reakce systémová odezva
<i>Abiotický stres</i>	poranění sanilita vysoká teplota sucho těžké kovy

Jako jeden z nejmenších diatomických molekul vykazuje NO dobrou rychlost difúze přes hydrofobní a hydrofilní prostředí, které usnadňuje jeho interakce s biomolekulami a jinými sloučeninami v okolních buňkách (Stämmler *et al.*, 1992). NO a jeho deriváty mohou reagovat s thioley, tyrosinovými zbytky, kovovými centry a reaktivními formami kyslíku (Stämmler *et al.*, 2001; Radi *et al.*, 2013). Reakce se superoxidovým aniontem za vzniku peroxynitritu je jedna z nejvýznamnějších biologických reakcí (Ferrer-Sueta a Radi, 2009). V aerobním prostředí NO reaguje s molekulárním kyslíkem, kdy dochází k jeho pomalé oxidaci za vzniku oxidu dusičitého (NO₂) (Hill *et al.*, 2010).

2.1.3 Peroxynitrit

Peroxynitrit (ONOO⁻) je nitrační sloučenina a silný oxidant, který vzniká neenzymovou reakcí mezi dvěma volnými radikály – superoxidovým aniontem a oxidem dusnatým – ve stereochemii 1:1. Tato reakce je jedna z nejrychlejších reakcí známá v biologii s rychlostní konstantou $4 - 16 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Ferrer-Sueta a Radi, 2009). ONOO⁻ je reaktivní forma dusíku s relativně krátkou dobou života ve fyziologickém rozmezí pH a teploty. Tato sloučenina snadno migruje přes biologické membrány a interaguje s cílovými molekulami a jejich okolím v okruhu jedné nebo dvou buněk (Szabó *et al.*, 2007).

Přestože byla tvorba ONOO⁻ prokázána *in vivo* v rostlinných buňkách, jeho úloha v průběhu fyziologických reakcí rostlin není stále plně objasněna (Saito *et al.*, 2006; Corpas *et al.*, 2009b). Detekce tyrosin-protein nitračních procesů však umožňuje předpoklad, že peroxynitrit vzniká při různých stresových reakcích rostlin ve spojení s patofyziologickými mechanismy. Ve studii Altug *et al.* (1999) realizované *in vitro* byla prokázána cytotoxicita peroxynitritu. V porovnání s rostlinnými buňkami byla detekována v živočišných buňkách významně výraznější toxicita ONOO⁻, která má důležitou roli např. v procesu patogeneze u řady lidských onemocnění.

Zvýšená tvorba peroxynitritu přispívá k oxidativním a nitrosativním stresům v různých biologických systémech (Arasimowicz – Jelonek *et al.*, 2011). Ze stále více studií vyplývá, že peroxynitrit nemůže být považován pouze za mediátor buněčné dysfunkce, ale chová se také jako silný modulátor redoxní regulace v různých signálních transdukčních drahách buňky (Liaudet *et al.*, 2009).

Přítomnost peroxynitritu může mít vliv na cílové molekuly buď přímo, prostřednictvím jedno- či dvouelektronové oxidační reakce nebo nepřímo prostřednictvím tvorby vysoce reaktivních radikálů. Velmi rychlá reakce peroxynitritu

je s oxidem uhličitým za vzniku uhličitanových (CO_3^{2-}) a dusičnanových (NO_3^-) radikálů. Peroxynitritový anion je v pH-dependentní protonové rovnováze s kyselinovou peroxynitritovou (ONOOH) a dále prostřednictvím hemolytického štěpení poskytuje radikál oxidu dusičitého a hydroxylový radikál (Virag *et al.*, 2003). V biologických systémech může být reakce relevantní zejména v hydrofobní fázi, kdy dochází k iniciaci peroxidace lipidů a nitračních procesů (Radi *et al.*, 1991, Szabó *et al.*, 2007). Tímto způsobem může peroxynitrit a od něj odvozené sloučeniny zacílit mnoho buněčných molekul jako jsou zbytky tyrosinu, thioly, DNA molekuly i fosfolipidové mastné kyseliny.

Již v pilotních studiích byla prokázána interakce NO s reaktivními kyslíkovými radikály vedoucí k tvorbě peroxynitritu v průběhu různých stresových reakcí i u rostlin (Durner a Klessig, 1999; Bolwell, 1999). Možná úloha peroxynitritu v reakci na stres způsobený rostlinným patogenem byla studována v práci Alamillo a Garcia-Olmedo (2001). Tato studie dokumentuje buněčnou smrt buněk *Arabidopsis* způsobenou peroxynitritem v oblasti listu naočkovaného avirulentní *Pseudomonas syringae* pv. Phaseolicola. Ve studii Saito *et al.* 2006 byl detekován vznikající intracelulární ONOO⁻ v tabákových buňkách BY-2 ošetřených INF1 elicitem pomocí aminofenylfluoresceinu (APF). Gaupels *et al.* (2011) sledoval přítomnost ONOO⁻ u *Arabidopsis* po infekci avirulentním *P. syringae*. Dále byla produkce peroxynitritu prokázána např. v kořenech *Arabidopsis* vystavených salinitnímu stresu (Corpas *et al.*, 2009a).

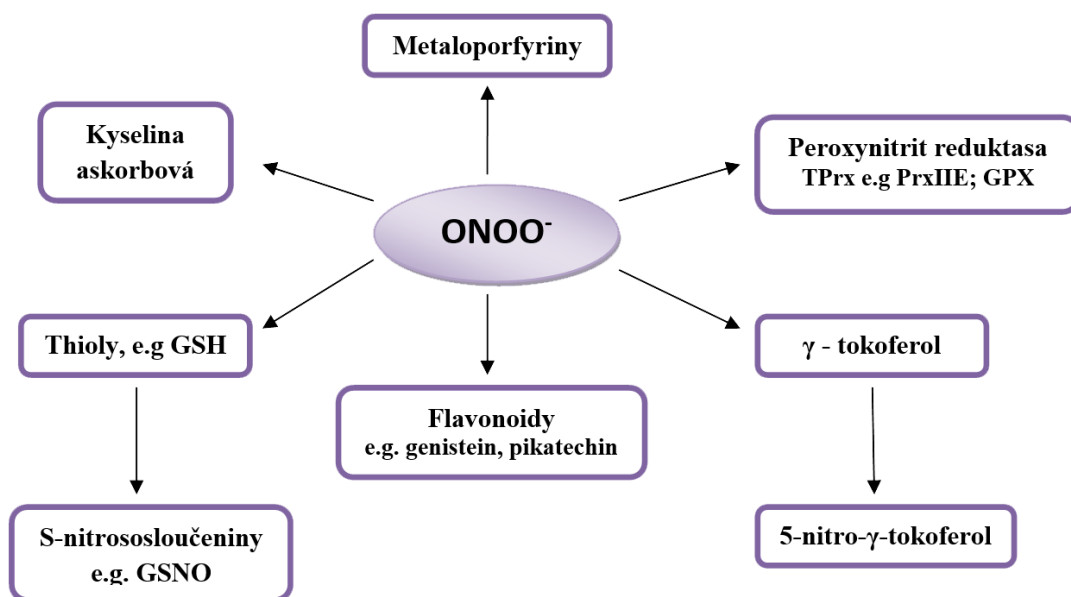
Peroxynitrit je toxičtější než NO nebo superoxidové molekuly (Szabó, 2003). Potenciální dráhy odbourání nadbytečného peroxynitritu v rostlině jsou shrnuty na obr. 2. V živočišných buňkách hrají důležitou roli v inaktivaci ONOO⁻ askorbáty (Arteel *et al.*, 1999). V rostlinných buňkách je kyselina askorbová (AsA) kvantitativně dominantní antioxidant (Smirnoff, 2000), a i zde se podílí na rozkladu ONOO⁻. Další hojně zastoupenou skupinou sloučenin, které jsou zapojeny v ochraně rostlinné buňky před toxickým účinkem peroxynitritu, jsou flavonoidy. Bylo pozorováno pomocí *in vitro* experimentů, že katecholová skupina v B kruhu a hydroxylová skupina v poloze 3 kaempferolu a galantinu jsou silnými lapači ONOO⁻ (Heijnen *et al.*, 2001).

Také vitamin E, složený z α -, β - a γ - tokoferolu, hraje důležitou roli při ochraně biologických membrán před oxidativním stresem indukovaným peroxynitritem (Ducrocq *et al.*, 1999). Další potenciální detoxikační dráha může spočívat v reakci peroxynitritu s GSH za vzniku S-nitrosothiolů (Moro *et al.*, 1994). Mechanismus tvorby

GSNO pravděpodobně zahrnuje homolytické štěpení ONOO^- při neutrální hodnotě pH, čímž se získá NO_2 , který nitrosyluje thioly (Moro *et al.*, 1994). Podobný mechanismus rozkladu reaktivních forem dusíku byl sledován u rostlin slunečnice napadených *Plasmopara halstedii*, kdy byl proces tyrosinové nitrace doprovázen zvýšením hladiny S-nitrosothiolů nezávislých na enzymově zvýšené produkci NO (Chaki *et al.*, 2009a).

Biologicky účinnou detoxikační drahou peroxynitritu *in vivo* je reakce GPx s ONOO^- , kdy GPx soutěží s thioly o reakci s ONOO^- (Arteel *et al.*, 1999). V mechanismu inaktivace ONOO^- , může být zapojen i selenocystein ve struktuře glutathion-peroxidasy (GPx, EC 1.11.1.9.) (Sies *et al.*, 1997).

Dlouhodobé vystavení buněk stresovým faktorům vede k postupné a trvalé nadprodukcí ONOO^- , což vyvolává škodlivé účinky v rostlinných buňkách. Jasid *et al.* (2006) pokázal, že peroxynitrit kromě oxidace chloroplastových proteinů a lipidů, snižuje také vývoj kyslíku fluorescenční výtěžek fotosystému II (PSII). Dále bylo zjištěno, že specifická místa pro inhibici peroxynitritem v PSII jsou v plastochinonu Qa Fe^{2+} na akceptorové straně PSII (Gonzalez-Perez, 2008).



Obr. 2: Možné dráhy zpracování nadbytečného peroxynitritu (převzato z Arasimowicz – Jelonek *et al.*, 2011)

2.2 Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku

Je známo, že kovalentní posttranslační modifikace ovlivňují a kontrolují funkci, strukturu, buněčnou lokalizaci a odbourávání proteinů. Nejlépe prostudovanými modifikacemi proteinů jsou N- a O-glykosylace, fosforylace a methylace lysinu. V posledních letech se studium posttranslačních modifikací zaměřuje na další kovalentní modifikace jako je acetylace, isoprenylace, sulfatace, ubikvitinace, sumolyace, glutathionylace, citrulinace a polyglutamylace, které mohou mít významnou úlohu v kontrole a funkci proteinů (Jensen, 2006; Hoffman *et al.*, 2008). Mezi nejvíce prozkoumané nitrační a nitrosační modifikace *in vivo* patří nitrace tyrosinu za vzniku 3-nitrotyrosinu a nitrosylace thiolových skupin cysteinů na S-nitrosocystein. Dříve byly tyto modifikace považovány za vedlejší produkt nadměrné a nekontrolované produkce RNS při určitých patologických procesech buněk. Aktuální znalosti však prokazují, že za normálních podmínek je nitrace bílkovin v biologických systémech regulována jako selektivní proces, kdy dochází ke kontrolované modifikaci malé skupiny proteinů pouze na jednom nebo omezeném počtu proteinových tyrosinu (Rubbo *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2008).

2.2.1 Nitrace proteinů

Nitrace je reakce, kdy dochází k vnesení nitroskupiny do *ortho*-polohy vůči hydroxylu na benzenové (aromatické) jádro. Často po navázání nitroskupiny na benzenové jádro tyrosinu dochází ke změně konformace modifikovaných proteinů a tím k ovlivnění jejich biologické aktivity. Touto modifikací dochází k významnému snížení jiného typu modifikace – fosforylace proteinů, čímž dochází k ovlivnění rychlosti přenosu informace v mnoha signálních drahách závislých na regulaci proteinů reverzibilní fosforylací. Se zvýšenou nitrací proteinů je spojena celá řada patologických procesů, kdy dochází ke zvýšené produkci RNS (Turko a Murad, 2002; Danielson a Andersen, 2008).

Při nitraci tyrosinu reagují s aminokyselinovými rezidui nitrační činidla. Nejvýznamnějšími nitračními činidly jsou oxid dusnatý, oxid dusičitý, peroxyinitrit a látky odvozené od dusitanu. Následně tyto sloučeniny reagují s tyrosinem za vzniku nitrotyrosinu (nitroTyr).

Tab. 4: Přehled nejvýznamnější nitračních činidel *in vivo* (podle Hnízdová *et al.*, 2009)

Název	Vzorec	Mechanismus nitrace tyrosinu	Příklad nitrovaného proteinu
Oxid dusnatý	NO	Radikálový	prostaglandinsynthasa
Oxid dusičitý	NO ₂	Radikálový	sérový albumin
Peroxyinitrit	ONOO ⁻	Radikálový elektrofilní substituce	cytochrom c
Kyselina dusitá	HNO ₂	Radikálový	sérový albumin
Nitrylchlorid	NO ₂ Cl	Radikálový	sérový albumin

Je známo, že nitrace proteinů je selektivní modifikace, která je ovlivňována třemi faktory: 1. lokalizace proteinů vzhledem k místu tvorby nitračních činidel, 2. množství proteinu a tyrosinových residuí, 3. primární sekvence v okolí tyrosinu (Ischiropoulos, 2003).

Jedním z nejvýznamnějších nitračních činidel je peroxyinitrit, který přenáší NO₂ skupinu na aromatický kruh zbytku Tyr (Radi *et al.*, 2013). Nedávné studie naznačují, že nitrace zbytků Tyr může být relevantní regulační mechanismus při odpovědi na abiotické a biotické stresové faktory v rostlinách. Zvýšené hladiny nitrace tyrosinu byly popsány např. v důsledku vystavení rostlin salinitnímu stresu, změnám ve světelných podmínkách u hrachu, olivových listů a suspenzní kultuře *Taxus cuspidate* (Corpas *et al.*, 2008b; Valderrama *et al.*, 2007; Gong a Yuan, 2005). Zvýšená nitrace byla prokázána během progresu hypersenzitivní odpovědi u *Arabidopsis thaliana* a v suspenzích tabákových buněk BY-2 ošetřených houbovým elicitem (Morot-Gaudry-Talarmain *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2006).

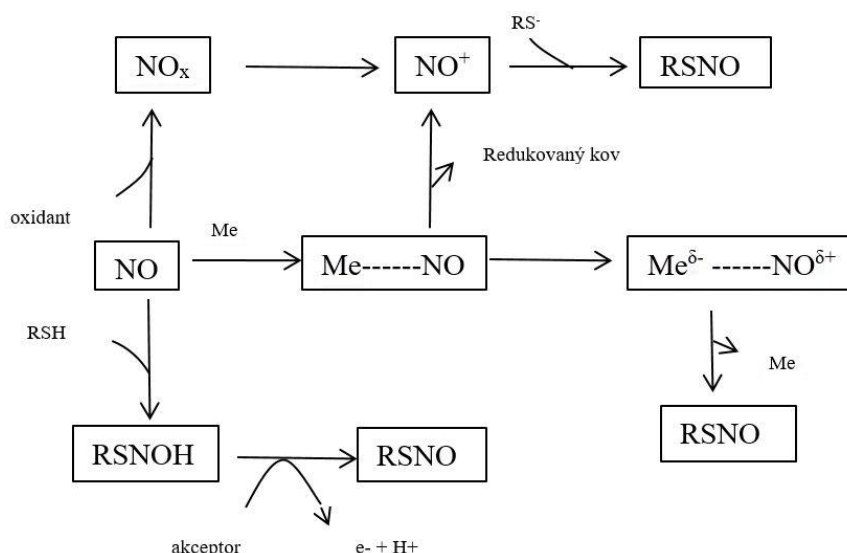
Nitrací tyrosinu jsou dobře prozkoumány ve zvířecích systémech, ale je stále málo poznatků o účincích v případě rostlin. Ve studii Melo *et al.* (2011) bylo prokázáno, že klíčový enzym glutaminsyntetasa (GS, EC 6.3.1.2) pro asimilaci dusíku v kořenových hlízách je regulována právě nitrací tyrosinu. Substrátem pro GS je glutamát (Glu), který je také prekurzorem pro syntézu GSH. Jelikož NO produkovaný v kořenových hlízách inhibuje GS, glutamát může být použit pro syntézu GSH, který hraje hlavní roli jako antioxidant v kořenových nodulech (Melo *et al.*, 2011).

2.2.2 S-nitrosylace proteinů

S-nitrosylace proteinů je kovalentní a reverzibilní připojení NO na thiolové postranní řetězce cysteinů (Stämmler *et al.*, 1992). První zmínka o tomto procesu byla ve studii Stämmler *et al.* (1992), kde byla popsána u sérového albuminu. Tato modifikace je stejně

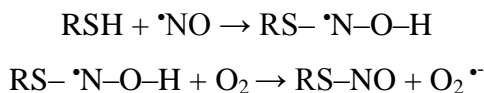
jako fosforylace místně specifická, ale je více labilní než fosforylace (Hess a Stämmler, 2011). S-nitrosylace probíhá bez enzymové katalýzy a je klíčovou reakcí při regulaci funkce proteinů působením RNS nezávisle na cyklickém guanosinmonofosfátu (cGMP). Vznikající sloučeninou jsou vedle S-nitrosylovaných proteinů, také nízkomolekulární S-nitrosothioly. Nejvýznamějším nízkomolekulárním S-nitrosothiolem je S-nitrosoglutathion, který je zásobní a transportní formou NO *in vivo* (Carver *et al.*, 2005). S-nitrosylace cysteinových thiolů je schopna modifikovat aktivitu enzymu, např. zvyšovat, jak je tomu v případě thioredoxinu (Haendeler *et al.*, 2002), nebo inhibovat, příkladem jsou isoformy kaspas (Kim *et al.*, 1997).

Mechanismů S-nitrosylace proteinů je celá řada, stále však se vedou diskuse o tom, který z nich převládá *in vivo*. Jedním z mechanismů je reakce nitrosoniového kationtu (NO^+) s thiolem. Dalším možným vznikem RSNO je prostřednictvím např. N_2O_3 a N_2O_4 (dimer NO_2). Reakcí peroxynitritu s thiolem dochází ke vzniku S-nitrosothiolů *in vivo*.

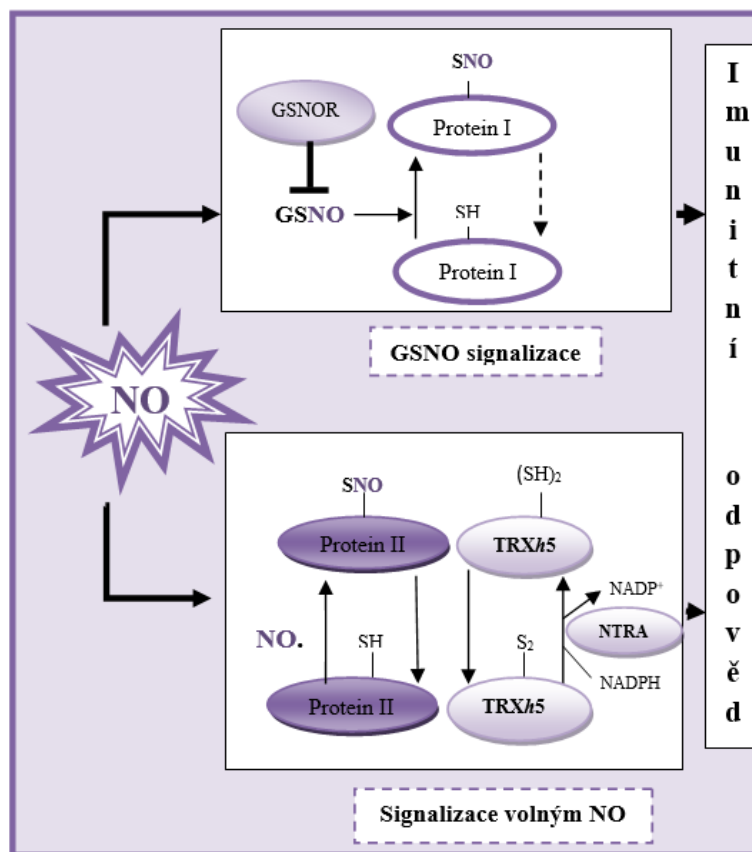


Obr. 3: Mechanismy vzniku S-nitrosothiolů: Reakce NO s oxidanty (O_2 , O_2^-) vedou k vyšším oxidům dusíku, které reagují s redukovanými thioley (RSH) za vzniku radikálového meziprojektu RSNOH na S-nitrosothioly (RSNO). Přechodné kovy (Me) mohou působit jako katalyzátory S-nitrosylace nebo vést k tvorbě nitrosylačního činidla NO^+ (upraveno podle Gow *et al.*, 2004).

Přímou reakcí oxidu dusnatého s thiolem dochází ke vzniku radikálového meziprojektu, který může být v přítomnosti akceptoru elektronů přeměněn na RSNO (Gow *et al.*, 1997). Tento mechanismus probíhá i v anaerobních podmínkách za účasti např. NAD^+ .



V současné době se předpokládá, že S-nitrosylace určitého proteinu je odrazem intracelulárních hladin GSNO (Stämmler *et al.*, 1992; Lindermayr *et al.*, 2005). S-nitrosoglutathion může přenášet část NO přímo na jiné thiolové skupiny. Tento proces se nazývá transnitrosylace (Liu *et al.*, 2001).

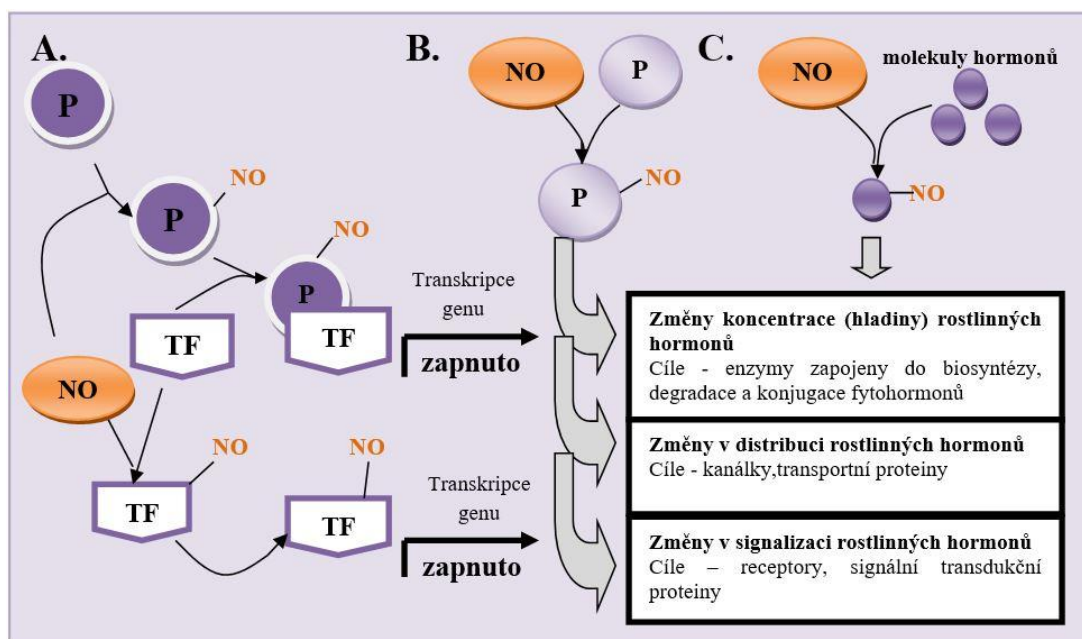


Obr. 4. S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) a thioredoxin-*h5* (TRX*h5*) regulují S-nitrosylaci proteinů v rámci imunitní signalizace u rostlin (převzato z Kneeshaw *et al.*, 2014). Jsou zobrazeny 2 třídy proteinů. Proteiny první třídy jsou S-nitrosylovány pomocí GSNO, jehož koncentrace je regulována GSNOR. Proteiny řazené do druhé třídy jsou S-nitrosylovány pomocí volného oxidu dusnatého a denitrosylace se účastní TRX*h5*/NTRA systém. Obě dráhy přispívají SA-dependenční genové expresi a imunitě.

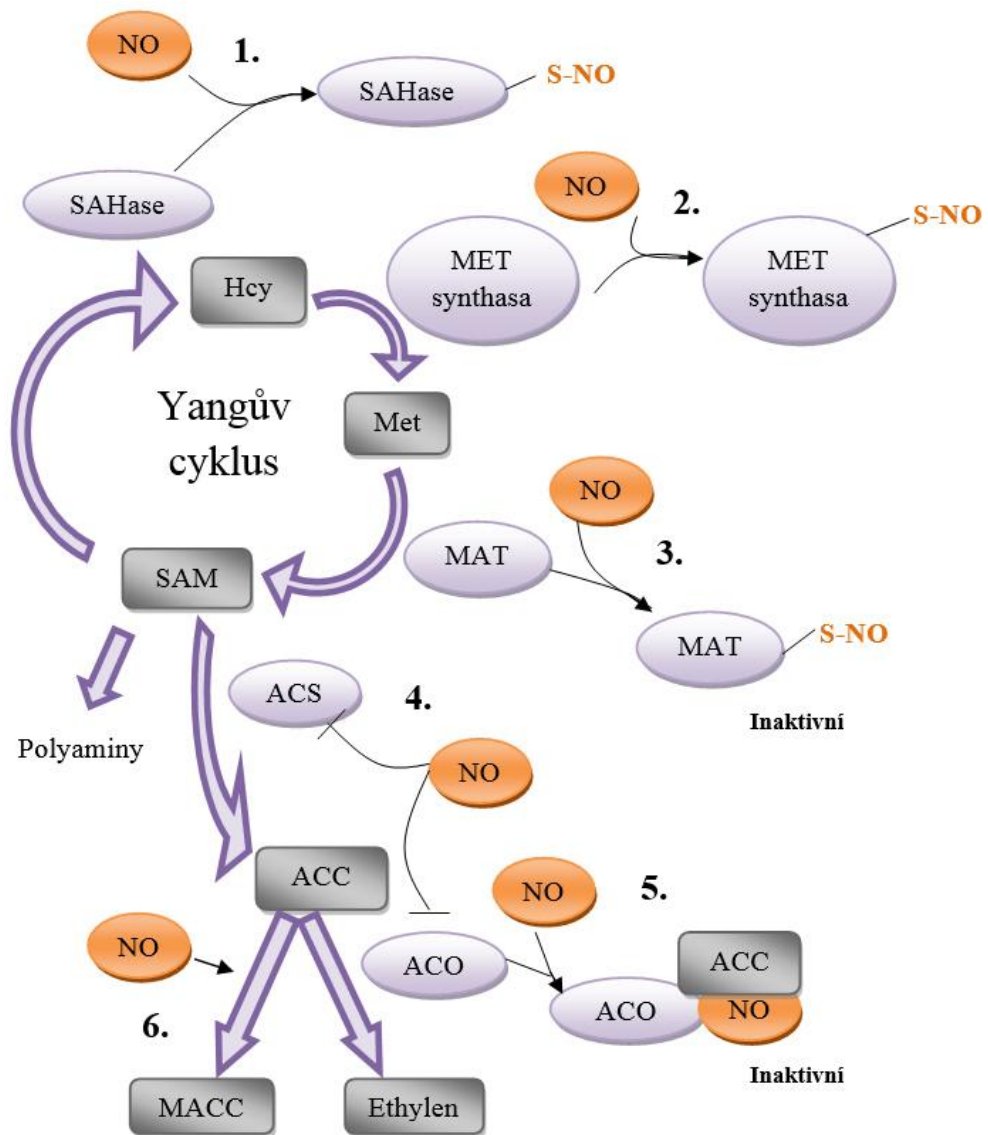
Proteomická analýza odhalila existenci řady proteinových kandidátů podléhajících S-nitrosylaci v rostlinách (Lindermayr *et al.*, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2008; Terrile *et al.*, 2012; Kneeshaw *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014; Begara-Morales *et al.*, 2015). V posledních letech se S-nitrosylace ukázala jako prototyp posttranslačních reakcí na bázi redoxních reakcí, potřebných pro imunitu rostliny (Spoel a Loake, 2011). Byla prokázána S-nitrosylace klíčových proteinů, které se podílejí na indukci programované buněčné smrti a na transkripčním přeprogramování hostitelských buněk vedoucí ke změně odolnosti rostlin. Jako cíle pro S-nitrosylaci v rostlinách byly identifikovány např. glyceraldehyd-3-fosfát a metakaspasa 9 z cytosolu *Arabidopsis*.

Významná role S-nitrosylace methioninadenosyltransferasy 1 (enzym zapojený do biosyntézy etylenu) byla prokázána v regulaci produkce etylenu (Leitner *et al.*, 2009). Dalšími známými proteiny, u kterých byla detekována S-nitrosylace, jsou Rubisco a peroxiredoxin II E (PrxIIIE) (Lindermayr *et al.*, 2006). Inhibice PrxIIIE, klíčového proteinu v detoxifikaci peroxynitritu, v důsledku S-nitrosylace vede ke zvýšení hladiny peroxynitritu (Sakamoto *et al.*, 2003). Peroxynitrit následně modifikuje tyrosinová residua v proteinech, které jsou důležitými modulátory signalizace v obranných reakcích rostlin (Gaupels *et al.*, 2012).

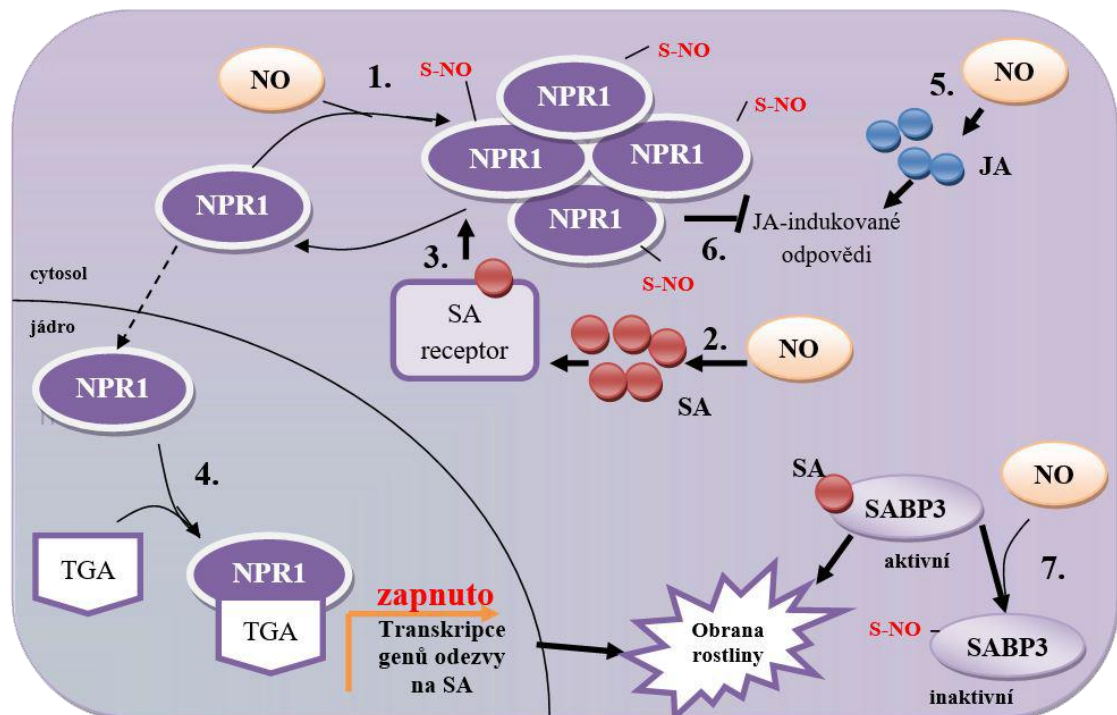
V současné době nově získané poznatky poukazují na vliv změny endogenní hladiny NO na biosyntézu, katabolismus/konjugaci a produkci řady fytohormonů jako jsou auxiny, gibbereliny, cytokininy, kyselina abscisová, etylen, salicylová a jasmonová kyselina, brasinosteroidy. Možným klíčovým mechanismem v regulaci odpovědi rostlin, jak ukazují nejnovější poznatky, je právě S-nitrosylace jako posttranslační modifikace proteinů (enzymů, receptorů) v biosyntetických drahách jednotlivých fytohormonů (Obr. 5) (Freschi *et al.*, 2013). Příklady možné regulace produkce fytohormonů oxidem dusnatým jsou uvedeny na obrázku 6, 7 a 8.



Obr. 5. Přehled možných mechanismů interakcí: NO-fytohormon (převzato z Freschi *et al.*, 2013). (A) Chemickou modifikací transkripčních faktorů (TF) a dalších proteinů (P) může NO ovlivnit úroveň transkripce genů podílejících se na metabolismu fytohormonů, transportu nebo signální transdukci. (B) NO může posttranslačně modifikovat proteiny (P) přímo zapojené do biosyntézy, distribuce nebo signalizace rostlinných hormonů. (C) NO nebo reaktivní formy dusíku mohou také chemicky reagovat s určitými typy rostlinných hormonů, za vzniku produktů se změněnou biologickou aktivitou.

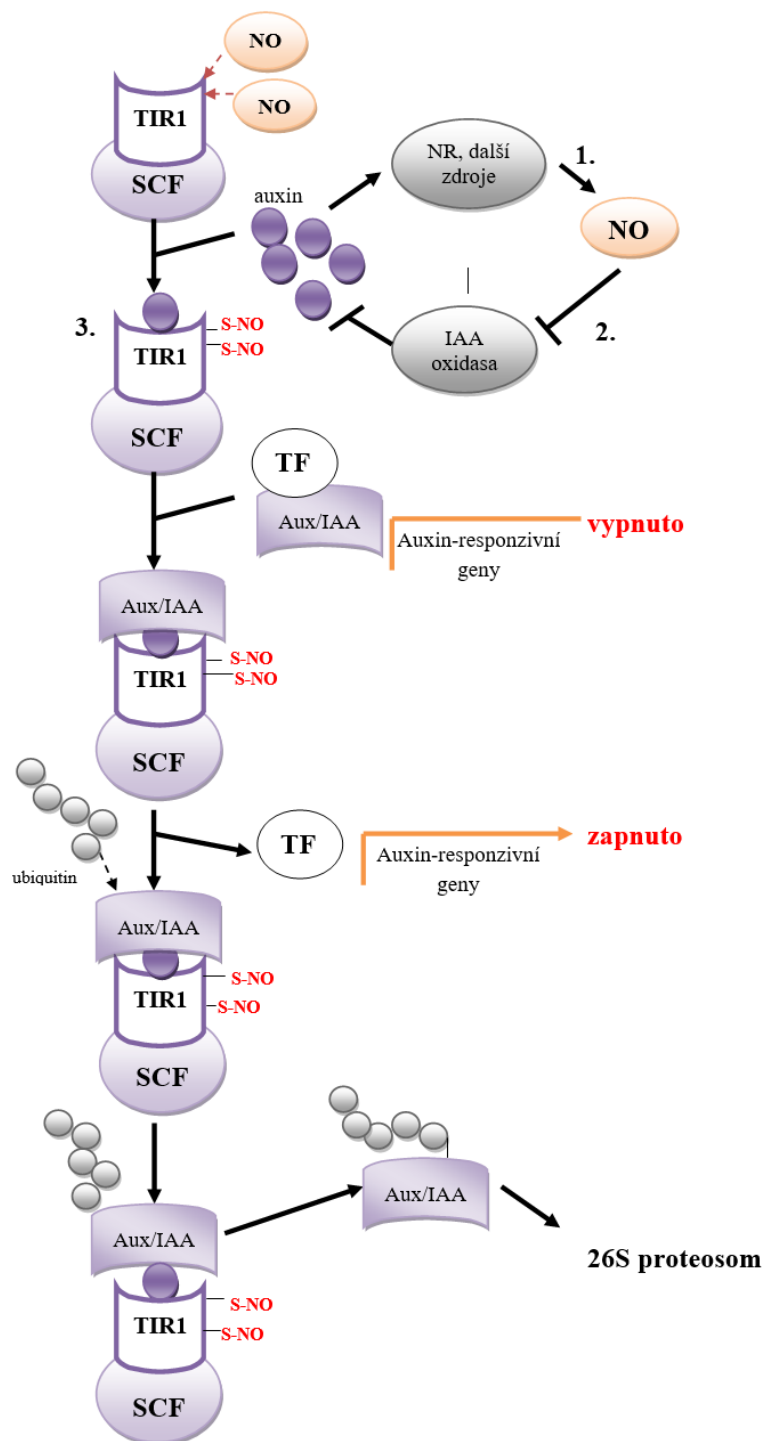


Obr. 6. Schematické znázornění antagonistických interakcí NO – ethylen (převzato z Freschi *et al.*, 2013). Methylmethioninový cyklus enzymů adenosylhomocysteinasy (SAHase) (1) a methioninsynthasy (METsynthasa) (2), jejichž aktivity jsou zodpovědné za produkci homocysteinu (Hcy) a methioninu (Met), mohou v uvedeném pořadí pohlédnout S-nitrosylaci. (3) Dále může být aktivita methioninadenosyltransferasy 1 (MAT1) z *Arabidopsis* potlačena pomocí S-nitrosylace, čímž se potlačuje konverze Met na S-adenosylmethionin (SAM). (4) Při zrání plodů, bylo prokázáno, že NO inhibuje hladinu transkriptu 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny (ACC), syntasy (ACS) a / nebo ACC oxidasy (ACO). (5) NO může také inhibovat ACO aktivitu přímo vazbou na tento enzym, což má za následek vytvoření ACO-NO binárního komplexu, který s ACC vytváří stabilní komplex ACO-NO-ACC. (6) Bylo popsáno NO-řízené hromadění netěkavých ACC metabolitů: 1-malonyl aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny (MACC).



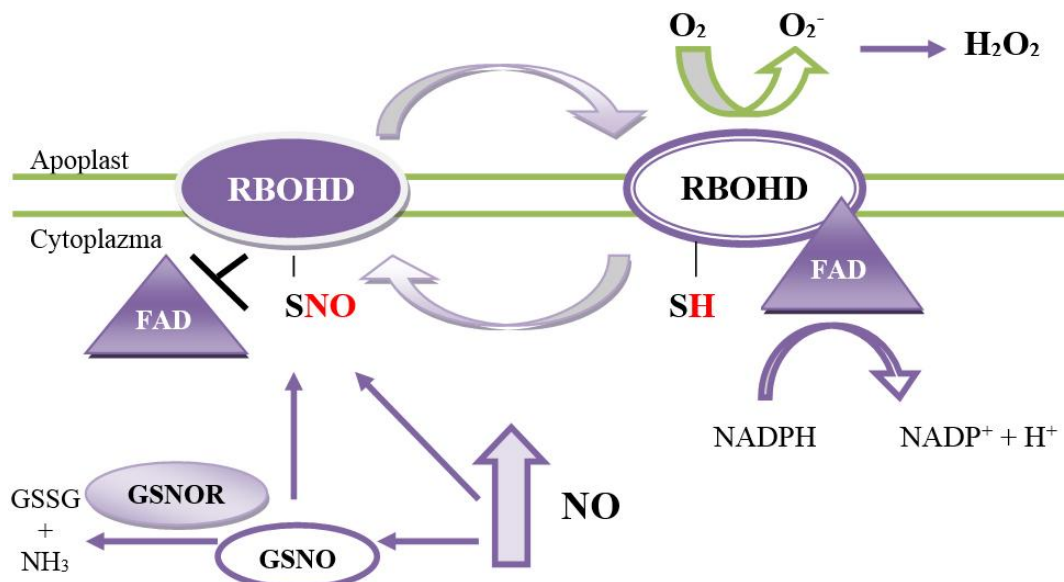
Obr. 7. Zjednodušené schematické znázornění interakcí mezi NO, kyselinou salicylovou (SA) a kyselinou jasmonovou (JA) při odpovědi rostlin na biotické stresové podmínky (převzato z Freschi *et al.*, 2013). (1) S-nitrosylace „NON-EXRESSER OF PATHOGENESIS-RELATED GENE 1“ (NPR1) na Cys 156 podporuje jeho oligomerizaci a stálost v cytosolu. (2) NO stimuluje biosyntézu SA. (3) Receptor SA po vazbě SA aktivuje denitrosylaci oligomerního NPR1 za vzniku monomerního NPR1. (4) Monomerní NPR1 je přemístěn do jádra, kde se váže na TGA transkripční faktory, které následně aktivují promotory SA-responzivních genů. (5) NO také stimuluje biosyntézu JA. (6) Cytosolová, oligomerní NPR1 potlačuje JA-aktivované reakce. (7) V pozdních stádiích bakteriální infekce, S-nitrosylace SA-vazebného proteinu 3 (SABP3) na Cys280 potlačuje jeho schopnost vázat SA. Pouze SABP3 po vazbě SA aktivně ovlivňuje obranné reakce.

V důsledku S-nitrosylace jednoho z hlavních intracelulárních receptorů auxinu TiR1 (transport inhibitor response 1) dochází k ovlivnění auxinové signalizační dráhy (Terrile *et al.*, 2012, Freschi *et al.*, 2013).



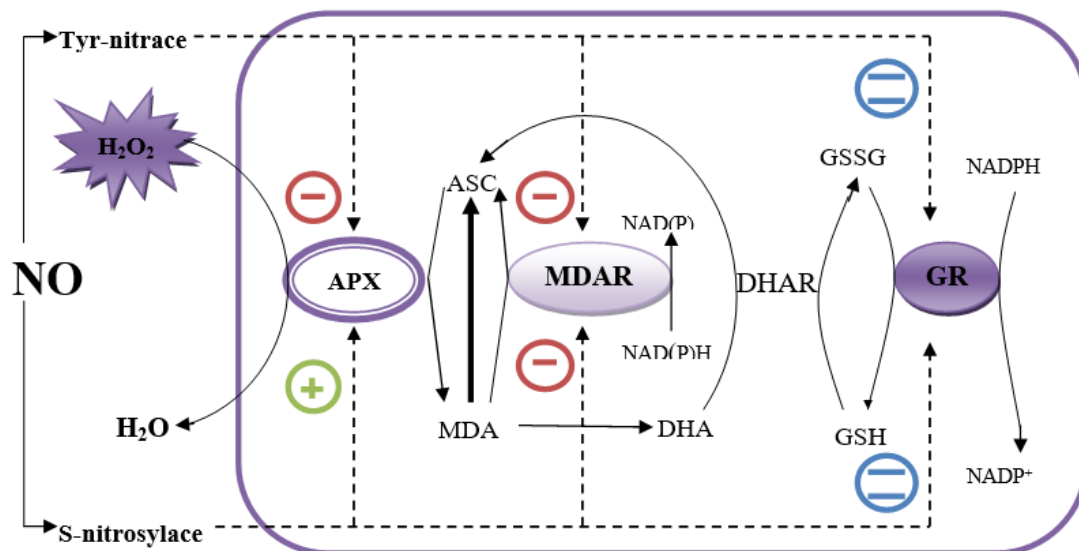
Obr. 8. Schematické znázornění synergických reakcí NO - auxinu (převzato z Freschi *et al.*, 2013). (1) Auxiny mohou stimulovat produkci NO. Ve většině případů, je nitrátreduktasa (NR) hlavním zdrojem produkce NO indukované auxinem. (2) V kořenech *M. truncatula* podporuje NO akumulaci auxinu potlačením jeho degradace pomocí IAA-oxidasy. (3) V *Arabidopsis* může NO pozitivně ovlivnit auxinovou signální dráhu S-nitrosylací proteinu „TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1“ (TiR1), na který se následně váže auxin a „AUXIN/INDOL-3-OCTOVÁ KYSELINA“ (AUX/IAA) protein s navázaným transkripčním faktorem (TF). Dochází k uvolnění TF a aktivaci transkripce genů v odpovědi na auxin. Následně dochází k označení AUX/IAA proteinů ubiquitinem a degradací proteinu 26S proteasomem.

Ve studiích Correa-Aragunde *et al.* (2013) a Begara Moreles *et al.* (2014, 2015) bylo popsáno ovlivnění hladiny ROS S-nitrosylací specifických cílových proteinů. Ve studii Yun *et al.* (2011) byl prokázán vliv NO na hladinu ROS na základě regulace aktivity NADPH oxidasy (EC 1.6.3.1), která je významným zdrojem ROS (obr. 9).



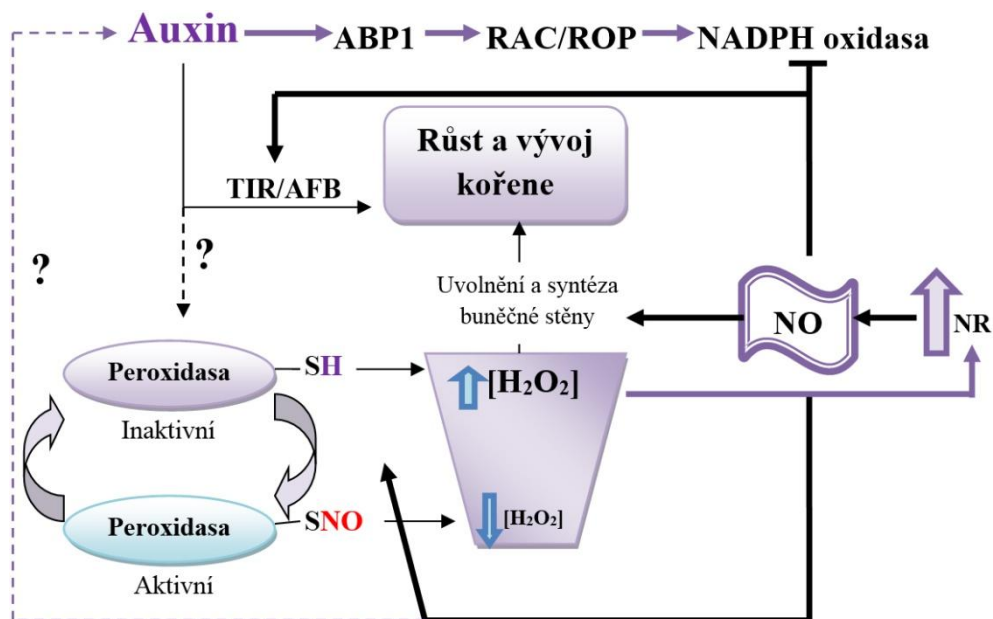
Obr. 9. Regulace aktivity NADPH oxidasy pomocí S-nitrosylace (převzato z Yu *et al.*, 2014). Protein RBOHD (Respiratory burst oxidase homolog D) se podílí na aktivaci oxidativního vzplanutí v důsledku napadení rostliny patogenem. Tvorba S-nitrosothiolů na Cys890 RBOHD brání navázání esenciálního kofaktoru flavinadenindinukleotidu (FAD). Enzym RBOHD je neaktivní. S-nitrosylace RBOHD je nepřímou řízena S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR) (Yun *et al.*, 2011).

Cílem S-nitrosylace případně tyrozinové nitrace, jak bylo prokázáno ve studii Begara-Morales *et al.* (2014, 2015) jsou také antioxidační enzymy askorbátperoxidasa (APX1, EC 1.11.1.11) a monodehydroaskorbátreduktasa (MDAR, EC 1.6.5.4), podílející se na regulaci hladiny ROS (obr. 10).



Obr. 10. Regulace askorbát-glutathionového cyklu oxidem dusnatým (převzato z Begara-Morales *et al.*, 2015). NO moduluje askorbát-glutathionový komplex pomocí posttranslačních modifikací jako je nitrace tyrosinu či S-nitrosylace proteinu askorbátperoxidasy (APX) nebo monodehydroaskorbátreduktasy (MDAR). MDAR aktivita je redukována v důsledku nitrace i S-nitrosylace MDAR proteinu. V případě APX S-nitrosylace aktivuje enzym a naopak nitrace redukuje jeho aktivitu. Glutathionreduktasová aktivita (GR) není nitrací ani S-nitrosylací ovlivněna.

Byla prokázána úzká souvislost mezi mechanismem působení auxinu a hladinou ROS/RNS. Auxin vystupuje jako iniciátor produkce ROS: 1) aktivací auxin-vázajícího proteinu 1 (ABP1) přes Rho GTPasu (RAC/ROPs) dochází k indukci aktivity NADPH oxidasy (Duan *et al.*, 2010; Shi a Yang, 2011), 2) potlačení aktivity peroxidasy (Iglesias *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011; Correa-Aragunde *et al.*, 2013) (obr. 11). V důsledku zvýšené koncentrace ROS dochází následně k aktivaci NR (Wang *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012) vedoucí ke zvýšení hladiny NO, který může opět regulovat aktivitu NADPH oxidasy. Bylo prokázáno, že S-nitrosylace NADPH oxidasy vede ke snížení syntézy ROS (Yun *et al.*, 2011). Jak bylo nedávno prokázáno, zvýšená produkce NO může aktivovat askorbátperoxidasu (Correa-Aragunde *et al.*, 2013). Lze předpokládat, že souhrnně by mohly tyto reakce sloužit jako složky negativní zpětné vazby vedoucí ke snížení koncentrace ROS (Yu *et al.*, 2014).



Obr. 11. Vzájemné regulace mezi auxinem, oxidem dusnatým (NO) a reaktivními formami kyslíku (ROS) (Yu *et al.*, 2014). Auxin indukuje produkci reaktivních kyslíkových meziproduktů (ROS) prostřednictvím aktivace NADPH oxidasy, která je zprostředkována vazbou auxinu na auxinu vázající protein 1 (ABP1) a aktivací Rho GTPasy (RAC/ROP) (Duan *et al.*, 2010; Shi a Yang, 2011). Zvýšení NADPH oxidasy a generace ROS vede k: 1) aktivaci nitrátoreduktasy (NR) a produkci NO, což může vést k redukcí aktivity NADPH oxidasy pomocí S-nitrosylace (Yun *et al.*, 2011); 2) tvorbě OH radikálu za katalýzy apoplastické peroxidasy (Mueller *et al.*, 2009); 3) regulaci S-nitrosylace na auxinovém receptoru reakcí transportního inhibitoru 1 (TiR1) (Terrile *et al.*, 2012). Paralelně také auxin indukuje částečnou inhibici peroxidasy prostřednictvím denitrosylace, což přispívá ke zvýšení hladiny ROS. Funkce peroxidasy lze znovu aktivovat S-nitrosylací v důsledku zvýšené produkce NO. Kolísající koncentrace NO může modulovat aktivitu celulosasyntasy a biosyntézu buněčné stěny.

2.3 S-nitrosoglutathionreduktasa

S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) je vysoce konzervovaný a všudypřítomný enzym, který patří mezi zinek-dependentní alkoholdehydrogenasy III třídy (ADH3, EC 1.1.1.1) (Martínez *et al.*, 1996). GSNOR je také označována jako S-(hydroxymethyl) glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284) a dříve jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH, EC 1.2.1.1). Nejčastěji používaným názvem enzymu v současné vědecké literatuře je S-nitrosoglutathionreduktasa, avšak tento název zatím nebyl názvoslovnou komisí IUBMB schválen.

Aktivita GSNOR byla prokázána u bakterií, kvasinek a savců (Díaz *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2002). V posledních desetiletích se studie zaměřily na studium aktivity GSNOR také v rostlinách, kde byla detekována v huseníčku, hrášku (Shafqat *et al.*, 1996; Barroso *et al.*, 2006), kukuřici (Fliegmann a Sandermann, 1997), rýži (Dolferus *et al.*, 1997.), slunečnici (Chaki *et al.*, 2009b), pepři (Airaki *et al.*, 2012) a rajčeti (Kubienová *et al.*, 2013a).

S-nitrosoglutationreduktasa je zapojena do mechanismů reakce a obrany rostlin v rámci různých typů biotických a abiotických stresových faktorů. GSNOR hraje významnou roli při vývoji rostlin (Lee *et al.*, 2008), v mechanismu obranných reakcí při patogenezí (Feechan *et al.*, 2005), reguluje buněčnou smrt (Chen *et al.*, 2009), podílí se na buněčné ochraně při nitrosativním stresu (Lamotte *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2002; Valderrama *et al.*, 2007).

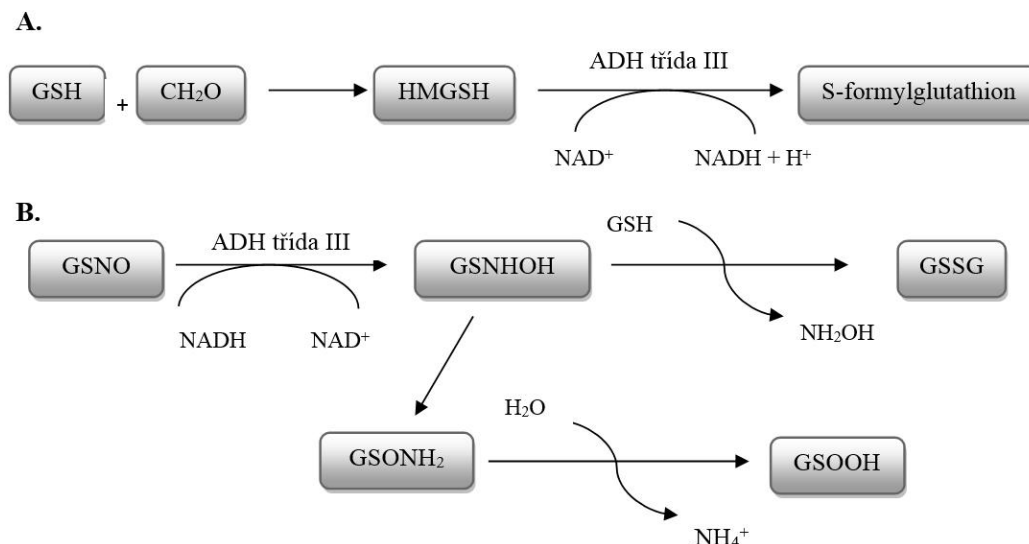
2.3.1 Mechanismus působení a vlastnosti GSNOR

2.3.1.1 Mechanismus působení GSNOR

ADH3 je známá jako hlavní enzym katalyzující reverzibilní NAD⁺-dependentní oxidaci S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGS), který vzniká spontánní reakcí mezi formaldehydem a glutathionem. Tato reakce představuje důležitý krok při detoxifikaci exogenního i endogenního formaldehydu, kdy oxidací HMGS vzniká S-formylglutathion. Ten je dále hydrolyzován S-formylglutathionhydrolasou (EC 3.1.2.12) (Espunya *et al.*, 2006) (Obr. 4A).

GSNOR má klíčovou funkci v regulaci intracelulární hladiny S-nitrosoglutationu (GSNO) a ostatních S-nitrosothiolů (Benhar *et al.*, 2009). Fyziologicky významnější reakcí, kterou GSNOR katalyzuje je nevratná NADH-dependentní redukce GSNO za vzniku různých produktů v závislosti na reakčních podmínkách (Jensen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001; Hedberg *et al.*, 2003).

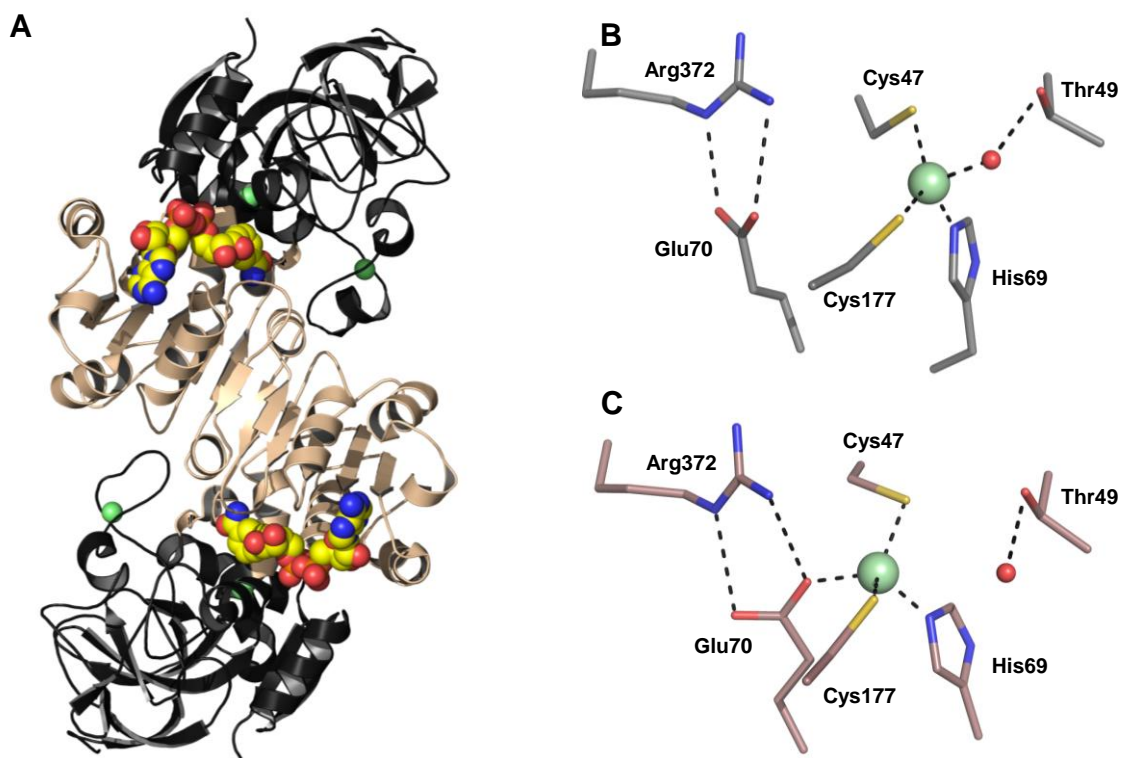
Na obr. 12 je schéma reakce katalyzované GSNOR. Redukce GSNO je ovlivňována několika faktory, které mají vliv na chod reakce. Jedním z těchto faktorů je buněčný redoxní potenciál. Dalším důležitým faktorem je buněčná dostupnost NADH koenzymu. V cytoplazmě je vysoký poměr NAD⁺/NADH, na rozdíl od poměru pro koenzym NADP⁺/NADPH, který je nízký. Tento nízký poměr umožňuje redukované formě fungovat jako reduktant v biosyntetických drahách. NADPH není významně využíván jako kofaktor GSNOR (Jensen *et al.*, 1998; Hedberg *et al.*, 2003). Samotnou redukcí GSNO dochází ke vzniku N-hydroxylsulfonamid (GSNHOH), který je nestabilní a má tendenci se v závislosti na hladině GSH přeměňovat na konečné produkty. V nadbytku GSH dochází k nukleofilnímu ataku GSH a uvolnění hydroxylaminu (NH₂OH) a vzniku glutathiondisulfidu (GSSG, oxidovaný glutathion). Při nízké koncentraci GSH dochází spontánním přeskupením GSNHOH ke vzniku glutathionsulfidamidu (GSONH₂). Ten je dále v kyselém prostředí hydrolyzován na kyselinu glutathionsulfonovou (GSO₂H) a amoniak (Jensen *et al.*, 1998).



Obr. 12: Reakce katalyzované GSNOR (alkoholdehydrogenasou třídy III) (převzato z Kubienová *et al.*, 2013a).

2.3.1.2 Struktura GSNOR

S-nitrosoglutathionreduktasa je homodimerní enzym, který ve své struktuře obsahuje dva atomy zinku. Každá ze dvou podjednotek o velikosti 40 kDa se skládá z velké katalytické domény a z menší domény s vazebným místem pro koenzym (Engeland *et al.*, 1993; Sanghani *et al.*, 2003). První identifikovanou rostlinnou strukturou GSNOR je krystalová struktura enzymu ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur (SIGSNOR). Jedná se o homodimer o velikosti 81 085 Da se dvěma zinečnatými ionty ve své struktuře. Oba zinečnaté ionty, které jsou navázány v katalytické doméně, kdy pouze jeden je zapojen v katalýze a druhý má strukturální funkci. Každý monomer má vlastní aktivní místo umístěné ve štěrbině mezi katalytickou doménou a doménou vázající koenzym. Katalytická doména obsahuje rezidua 1-177 a 327-379, menší NAD^+ -vázající Rossmannův záhyb residua 178-326 a tvoří hlavní část plochy monomeru. Vstupy do obou aktivních míst enzymu jsou umístěny na jedné straně, zatímco místa vázající koenzym jsou na opačných stranách dimeru. Katalytický zinek působící jako Lewisova kyselina je vázán v podjednotce (tetrahedrální konfigurace) k Cys47, Cys177 a His69 ve vzdálenosti 4,8 Å od Glu70. Monomerní jednotky, které tvoří základ pro dimer, jsou spojeny pomocí dvanácti beta-listů tvořících většinu vazebné domény pro koenzym. Zinek zajišťující strukturální funkci je vázán přes 4 atomy síry na cysteinové zbytky Cys99, Cys102, Cys105 a Cys113. V porovnání s již známou strukturou ADH třídy I je vidět, že Glu70 reziduum neinteraguje s katalytickým iontem zinku tak jako v případě s ADH třídy III (Kubienová *et al.*, 2013a).



Obr. 13: Krystalová struktura rostlinné SIGSNOR (převzato z Kubienová *et al.*, 2013a). (A) Struktura SIGSNOR v přítomnosti koenzymu NAD^+ v rozlišení 1,9 Å. Barevně jsou značeny: katalytická doména (tmavě hnědá), vazebná doména pro koenzym (světle hnědá), koenzym NAD^+ (žlutá - atomy uhlíku, modrá - atomy dusíku, červená - atomy kyslíku) a atomy zinku (zeleně) jsou znázorněny kuličkami. (B) Rezidua vázající se na katalytický zinek, který funguje jako Lewisova kyselina (C) Rezidua vázající se na zinek, který má pouze strukturální funkci.

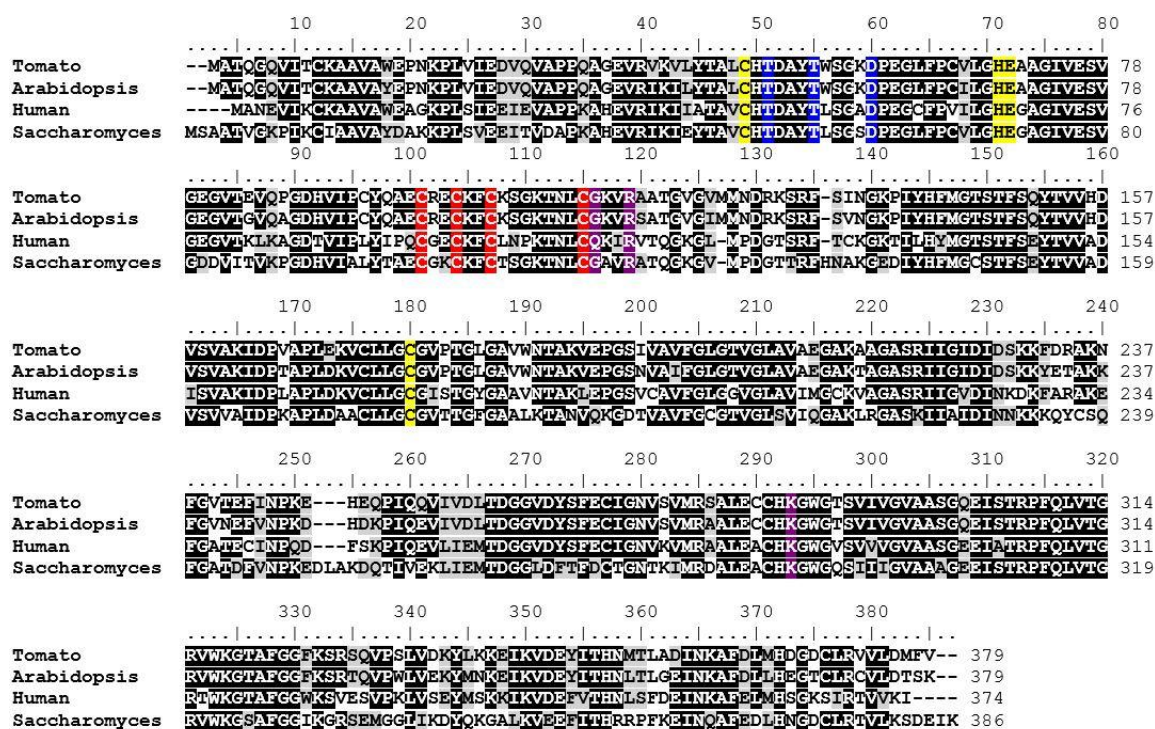
2.3.1.3 Sekvence GSNOR a molekulová hmotnost

U vyšších rostlin byla poprvé stanovena sekvence GSNOR u *A. thaliana*. Gen *AtGSNOR*, označující se jako *At5g43940*, kóduje glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasu (Letterie *et al.*, 2011). Ve studii Kubienová *et al.* (2013a) bylo srovnáním sekvencí *Solanum* spp. zjištěno, že GSNOR sekvence pro *S. habrochaites* a *S. lycopersicum* cv. Amateur jsou shodné. Sekvence GSNOR pro *S. chmielewskii* se liší pouze v šesti nukleotidových bazích. Naproti tomu změna na úrovni aminokyselin nebyla zaznamenána. Dále byly porovnávány proteinové sekvence BoGSNOR z *Brassica oleracea* a *AtGSNOR* z *A. thaliana*, které vykazovaly homologii 97%, jelikož obě rostliny pochází ze stejné rodiny *Brassicaceae*.

SIGSNOR vykazuje velmi blízkou podobnost v sekvenci s jinými rostlinnými GSNOR, a to z BoGSNOR a LsGSNOR (*Lactuca sativa*). Největší homologie v proteinových sekvencích zmiňovaných GSNOR byla zjištěna mezi SIGSNOR

a BoGSNOR (91%). Dále byla popsána vysoká homologie s lidskou GSNOR (hGSNOR, 67 %) a GSNOR ze *Saccharomyces cerevisiae* (61 %).

U purifikovaného enzymu GSNOR izolovaného z *A. thaliana* byla metodou Western blot stanovena molekulová hmotnost 44,6 kDa (Martínez *et al.*, 1996). Metodou SDS-PAGE byla určena MW podjednotky 45 kDa u AtGSNOR (Achkor *et al.*, 2003). Pomocí gelové permeační chromatografie byla potvrzena dimerní forma enzymu. Touto metodou byly zjištěny hodnoty MW pro kukuřičnou GSNOR - 82 kDa (Wipperman *et al.*, 1999), 82,3 kDa pro hrachovou GSNOR a 81,4 kDa pro lidskou GSNOR (Uotila a Koivusalo, 1979). Metodou MALDI-TOF byla u GSNOR z rajčete stanovena molekulová hmotnost 42,5 kDa, podjednotky BoGSNOR jako 41,5 kDa a pro LsGSNOR podjednotku jako 41,3 kDa (Kubienová *et al.*, 2013a,b).



Obr. 14: Srovnání aminokyselinových sekvencí GSNOR z rajčete (GU296438), *Arabidopsis* (CAA57973), člověka (M30471) a *S. cerevisiae* (NM_001180228) v programu MUSCLE v 3.8 (převzato z Kubienová *et al.*, 2013). Identické aminokyseliny jsou zvýrazněny černě, podobné (60% threshold) šedě. Čtyři cysteiny vázající katalytický atom zinku jsou zvýrazněny žlutě. Residua vázající substrát HMGSH jsou zvýrazněna modře. Residua tvořící tzv. anion-vazebnou kapsu jsou zvýrazněny fialově.

2.3.1.4 Substrátová specifita

ADH třídy III vykazují v porovnání s dalšími ADH třídami rozdílnou substrátovou specifitu. Na rozdíl od ADH I, které jako substrát preferují krátké alifatické alkoholy (etanol, propanol), není struktura ADH III uzpůsobena pro navázání těchto malých substrátů. Při sledování rozdílů mezi strukturami ADH I a SIGSNOR bylo zjištěno, že residua 53-59 a 113-120 SIGSNOR leží dále od aktivního místa, které se tím zvětší

a vytváří vstup pro větší substráty do vazebné domény (Kubienová *et al.*, 2013a). Mezi tyto substráty patří GSNO, HMGSH, alkoholy s delším řetězcem a ω -hydroxymáselná kyselina (Sanghani *et al.*, 2002). GSNOR přednostně oxiduje HMGSH, následně geraniol, cinnamylalkohol, ω -hydroxymáselná kyselina a alifatické alkoholy s dlouhým řetězcem (nonanol a oktanol) (22 nebo 28). Také byl prokázán retinol jako endogenní substrát pro GSNOR (Shafgat *et al.*, 1996). Řada publikací potvrzuje, že délka řetězce substrátu výrazně ovlivňuje substrátovou specifitu GSNOR (Sanghani *et al.*, 2000; Staab *et al.*, 2009; Kubienová *et al.*, 2013a).

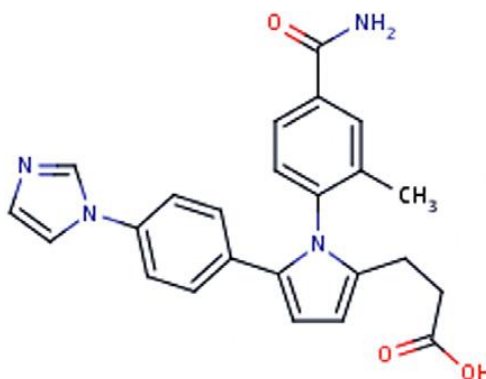
2.3.1.5 Inhibice GSNOR – inhibitor N6022

V poslední době jsou vyvíjeny nové a účinné inhibitory GSNOR na bázi pyrrolů, kam patří vícesložkový inhibitor N6022 (Sun *et al.*, 2011a). N6022 je sloučenina obsahující pyrrolové jádro s kvartérní strukturou (čtyřstěn). V jeho struktuře jsou zbytky kyseliny propionové orientovány směrem k aniontové kapse uvnitř aktivního místa GSNOR a tím dochází k propojení vodíku a solí interakcí s Gln111, Arg114 a Lys283. Imidazol, který je taktéž obsažen v N6022, směřuje ke katalytickému zinku a imidazolový dusík je součástí účinné tetrahedrální koordinace zinku spolu se zbytky Cys44, His66 a Cys173. V struktuře N6022 dochází ke stabilizaci imidazolového kruhu pomocí $\pi - \pi$ interakcí s nikotinamidovým kruhem NAD^+ . Další stabilizaci poskytují vodíkové vazby mezi benzamidem z N6022 a Gln117 (Green *et al.*, 2012).

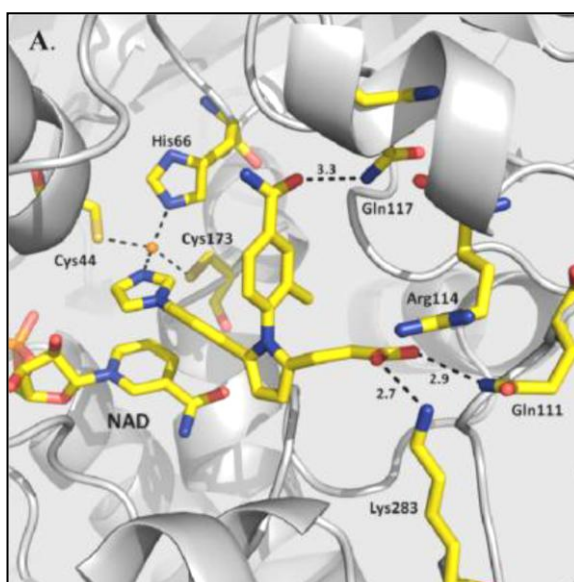
N6022 se řadí mezi nová léčiva první třídy se silnou inhibiční aktivitou proti hGSNOR. Inhibice GSNOR brání metabolismu GSNO a umožňuje jeho akumulaci. GSNO se chová jako iniciátor protizánětlivé signalizace (Gaston *et al.*, 1993; Fortenberry *et al.*, 1999; Reynaert *et al.*, 2004) a jeho zvýšená hladina vede k buněčné signalizaci proteinů S-nitrosylací a nejspíše také ovlivňuje hladinu NO a nitritu, které tvoří s glutathionem GSNO (Sanghani *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011a). Inhibitory GSNOR jsou vyvíjeny jako léčebná terapeutika na podmínky, při nichž je narušena homeostáza GSNO a NO (Sun *et al.*, 2011a; 2011b; 2011c; Colagiovanni *et al.*, 2012). Je známo, že inhibice GSNOR pomocí N6022 zajišťuje zmírnění účinku astmatu, chronické obstrukční nemoci plic a zánětlivých onemocnění střev (Sun *et al.*, 2011a). N6022 je v současné době v počáteční fázi klinického testování u lidí.

Ve studii Kubienová *et al.* (2013a) bylo zjištěno, že inhibitor N6022 je mnohem silnější inhibitor (IC_{50} 300 ± 18 nM) v porovnání s mastnými kyselinami. Mechanismus inhibice N6022 je nekompetitivní ke GSNO s hodnotou K_i 429 ± 30 nM. Inhibiční

konstanta pro rostlinou GSNOR je mnohem vyšší než u lidského enzymu, kdy její hodnota pro N6022 je 2,5 nM (Sun *et al.*, 2011a; Staab *et al.*, 2009).



Obr. 15: N6022 - Syntetický inhibitor GSNOR. Sumární vzorec $C_{24}H_{22}N_4O_3$, chemický název 3-(5-(4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylfenyl)-1H-pyrrol-2-yl)propionová kyselina (MW 414.46) (převzato z Green *et al.*, 2012).



Obr. 16: Interakce N6022 s GSNOR anion - vazebnou kapsou na N6022 • GSNOR • NAD⁺ ternární komplex (převzato z Green *et al.*, 2012).

2.3.2 Význam GSNOR u rostlin

2.3.2.1 Úloha GSNOR ve fyziologii rostlin

S-nitrosoglutathionredukata je enzym lokalizovaný zejména v cytosolu. Další lokalizace byly objeveny v jádře a peroxisomu. Přítomnost GSNOR v jádře může regulovat místní hladiny GSNO a chránit tak genetický materiál před NO-indukovaným poškozením (Staab *et al.*, 2008a, b).

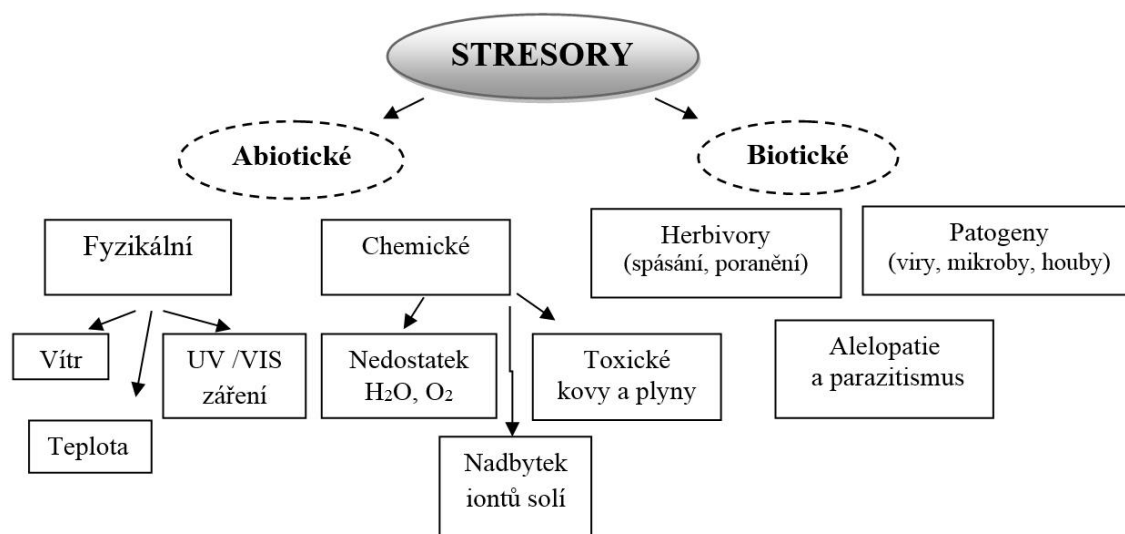
Aktivita GSNOR se zdá být nezbytná pro normální vývoj a plodnost rostliny za optimálních růstových podmínek (Lee *et al.*, 2008). U *Arabidopsis* je GSNOR kódována jedním genem, které je označován jako At5g43940. Analýza exprese *GSNOR* v *Arabidopsis* za pomoci Bio-Array ukazuje, že tento gen je významně exprimován

ve všech orgánech s výjimkou zralého pylu. Pomocí imunolokalizace a histochemické detekce bylo zjištěno, že je tento protein rozdílně exprimován, kdy vyšší exprese je v kořenech a listech v prvních stádiích vývoje. Je také známo, že GSNOR by mohla být zapojena v regulaci redoxního stavu (Espunya *et al.*, 2006). Tento enzym může být také zapojen do regulace rostlinné buněčné smrti pravděpodobně prostřednictvím procesu S-nitrosylace (Chen *et al.*, 2009).

V práci Kubienová *et al.* (2013a) zaměřené na studium úlohy a lokalizace GSNOR ve vývoji rostlin *Solanum* spp. byla stanovena exprese GSNOR v jednotlivých částech rostliny. Vyšší exprese genu v porovnání s kořeny byla detekována v děložních lístcích (10-ti denní semenáčky). V rostlinách pěstovaných 30 dní byla exprese GSNOR v kořenech vyšší v porovnání s listy. V pohlavních orgánech – v pestíku a tyčinkách – byla detekována také vysoká exprese, stejně jako během vývoje a zrání ovoce. Tyto výsledky byly v koleraci s měřením GSNOR aktivity v kořenech, výhoncích a listech rajčat, kdy nejnižší aktivita byla stanovena v listech.

2.3.2.2 Úloha GSNOR při stresových podmínkách

Rostliny jsou v průběhu svého života ovlivňovány aktuálním životním prostředím, ve kterém se nachází. Může docházet k působení řady stresových faktorů, jejichž vliv vede ke zpomalení životních funkcí, k poškození jednotlivých orgánů a v konečném důsledku i k smrti samotné rostliny. Stres je tedy stav, kdy je rostlina vystavena nepříznivým vlivům vnějšího prostředí. Stresové faktory mohou být abiotické a biotické povahy (Obr. 17).



Obr. 17: Rozdělení stresových faktorů: Hlavní rozdělení stresových faktorů na abiotické a biotické.

Stresovou reakci lze rozdělit na několik fází. První fáze tzv. „poplachová“ nastává po působení stresového faktoru, kdy dochází k narušení buněčných struktur a funkcí buňky. Dále následuje fáze „restituční“, kdy rostlina aktivuje své obranné mechanismy a v rámci této fáze nepřekračuje intenzita stresu letální úroveň. Následně rostlina zvyšuje svou odolnost vůči danému faktoru a tato fáze je fází „rezistence“. Poslední fází stresové reakce je „vyčerpání“, ke kterému dochází důsledkem dlouhodobého a intenzivního působení stresoru (Procházka *et al.*, 1998).

2.3.2.2.1. Salinita

Nepříznivý účinek zvýšené koncentrace minerálů, jako jsou např. Na^+ a/ nebo Cl^- ionty vyvolává u rostlin tzv. salinitní stres (Munns, 2005). Salinita je jedním z nejzávažnějších limitujících faktorů pro růst a vývoj rostlin. Hromadění ve vodě rozpustných solí v půdě se nazývá zasolování (salinizace). Podle obsahu soli v půdě pak dělíme půdu na neslanou (0-3 g/l), mírně zasolenou (3-6 g/l), středně zasolenou (6-12 g/l) a vysoce zasolenou (více jak 12 g/l) (<http://www.fao.org/docrep/R4082E/r4082e08.htm>, staženo 1. 8. 2013).

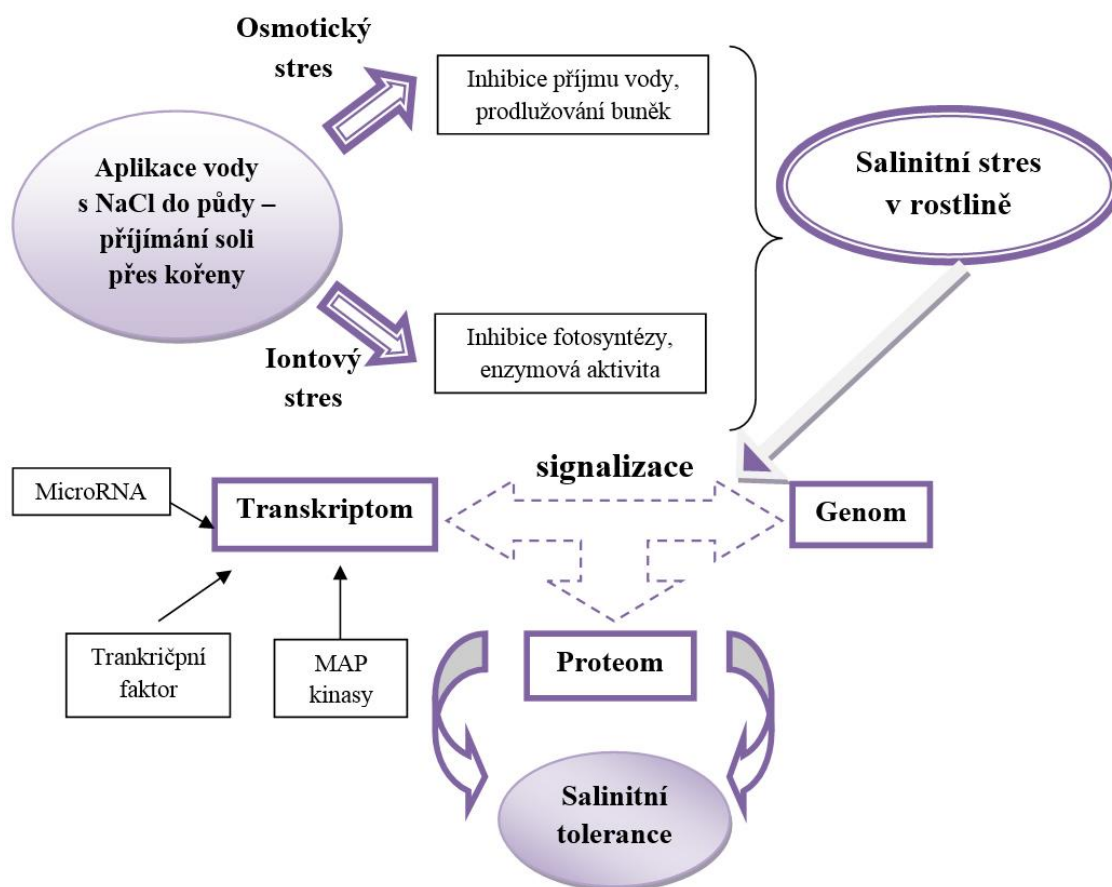
Podle původu rozlišujeme dva typy salinity půdy: primární (přírodní) nebo sekundární (vyvolanou člověkem). Primární salinizace spočívá v nahromadění solí přírodními procesy v důsledku vysokého obsahu solí v matečném materiálu nebo podzemní vodě. Tyto přírodní procesy zahrnují zvětrávání materiálu obsahujícího rozpustné soli (chloridy, sírany a hydrogenuhličitanu sodíku, vápníku a hořčíku) a depozici oceánské soli prostřednictvím větru a deště (Parihar *et al.*, 2015). Sekundární salinizace je způsobována lidskými zásahy, jako jsou nevhodné zavlažovací postupy, například při zavlažování vodou bohatou na soli či při nedostatečném odvodňování (Garg a Manchanda, 2008). Podle dostupných záznamů z Management Service FAO je více než 6 % světové půdy ovlivněna salinitou. Ze současných 230 milionů hektarů zavlažované půdy je 45 milionů hektarů zasolených (19,5 %).

Zvýšená koncentrace solí v půdě inhibuje růst rostlin a to ze dvou hlavních důvodů: 1) přítomnost solí snižuje schopnost rostliny přijímat vodu, 2) nadměrné množství solí vstupující do rostlin ovlivňuje transpirační tok rostliny (Greenway a Munns, 1980). V důsledku zvýšené koncentrace solí v půdě dochází u rostlin ke snížení vodního potenciálu a narušení iontové homeostázy. Negativní účinek salinity je pozorován na úrovni celé rostliny. Je ovlivněno klíčení, růst, produkce fotosyntetických pigmentů, fotosyntéza, vodní potenciál, rovnováha živin, dochází k oxidačnímu stresu,

což následně významně ovlivňuje vývoj rostlin a s tím spojený výnos zemědělsky důležitých plodin. V důsledku salinitního stresu může docházet až k uhynutí rostliny (Fernández-Torquemada a Sánchez-Lizaso, 2013; Tavakkoli *et al.*, 2011).

Hlavní vliv v rámci salinitního stresu mají sodné a chloridové ionty. Koncentrace sodných iontů ovlivňuje příjem draselných iontů, dochází k narušení regulace průduchů a v konečném důsledku ke ztrátě vody. Chloridové ionty ovlivňují tvorbu chlorofylu a způsobují tzv. chlorotickou toxicitu, z tohoto důvodu jsou tyto ionty mnohem nebezpečnější než sodné (Tavakkoli *et al.*, 2011).

Podle schopnosti růst a vyvíjet se v prostředí s vysokou koncentrací iontů rozdělujeme rostliny do dvou skupin. Jedná se o halofytní a glykofytní rostliny. Halofytní rostliny disponují řadou adaptivních mechanismů a jsou schopny růst a vyvíjet se v prostředí s vysokým zasolením půdy. Naopak glykofytní rostliny jsou citlivé k výkyvům koncentrace soli a při delším vystavení salinitnímu stresu hynou. Do této skupiny řadíme rýži, pšenici, většinu zeleniny včetně okurky a *A. thaliana* L. (Flowers *et al.*, 1977; Hasegawa *et al.*, 2000).



Obr. 18: Schematický diagram znázorňující dráhy působení salinitního stresu v rostlině a dráhy tolerance rostliny na tento stres (převzato z Parihar *et al.*, 2015).

Salinitní stres vyvolává v buňce vedle osmotického stresu, také tzv. oxidativní stres. Dochází ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku, jako jsou singletový kyslík, peroxid vodíku, superoxidové anionty, hydroxidové a perhydroxylové radikály. Tyto látky spouštějí expresi některých genů pro proteiny podílející se na obranných reakcích. ROS mohou být pro buňku toxické, vedou k inaktivaci enzymů, poškození membrán, peroxidaci lipidů, proteinů i nukleových kyselin (Piterková *et al.*, 2005; Baatour *et al.*, 2010; Zhu, 2003, Tanou *et al.*, 2009). ROS reagují s řadou klíčových biologických molekul, jako jsou DNA, RNA, proteiny, sacharidy a lipidy (Job *et al.*, 2005, Garg a Manchanda, 2009), čímž dochází k silnému narušení normálního metabolismu rostliny (Obr. 18) (Apel a Hirt, 2004).

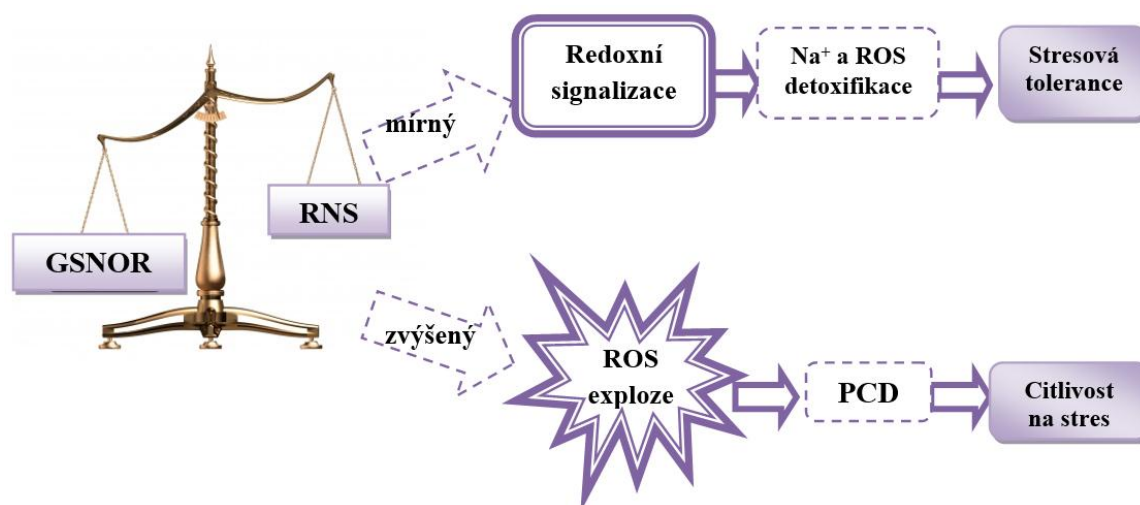
Rostliny si v průběhu svého vývoje vyvinuly řadu obranných mechanismů eliminujících působení ROS. Antioxidační mechanismy mohou být enzymového nebo neenzymového charakteru. Mezi antioxidačními enzymy patří enzymy askorbát-glutathionového (Halliwell-Asadova) cyklu: superoxidodismutasa (SOD, EC 1.15.1.11), askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11), monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR, EC 1.6.5.4), dehydroaskorbátreduktasa (DHAR, EC 1.8.5.1) a glutathionreduktasa (GR, EC 1.6.4.2), dále se jedná o fosfolipidhydroperoxid-glutathionperoxidasu (PHGPx, EC 1.11.1.9), katalasu (CAT, EC 1.11.1.6), glutathionperoxidasu (GPx, EC 1.11.1.12) a peroxidasu (POD, EC 1.11.1.7).

Typickými představiteli antioxidačních sloučenin jsou glutathion, L-askorbát (vitamin C), karotenoidy, α -tokoferol, fenolické látky a flavonoidy (Almeselmani *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2008). Bylo prokázáno, že zvýšení aktivity antioxidačních enzymů v orgánech rostlin je nezbytné pro zlepšení tolerance rostliny vůči salinitnímu stresu (Ahammed *et al.*, 2012).

Vedle ROS hrají důležitou roli v obranném mechanismu rostlin v reakci na salinitní stres reaktivní formy dusíku, kam patří oxidy dusíku, peroxyinitrit či S-nitrosothioly (Valderrama *et al.*, 2007; Corpas *et al.*, 2009a; Bai *et al.*, 2011; Tanou *et al.*, 2009, 2012; Leterrier *et al.*, 2012a, b). Nejvýznamnějším zástupcem RNS je oxid dusnatý, který je známý jako endogenní molekula zapojená do řady fyziologických a obranných procesů v rostlině (Neill *et al.*, 2003). Exogenní NO může aktivovat antioxidační obranné mechanismy, např. zvýšit hladiny antioxidačních enzymů a dalších antioxidantů (Neill *et al.*, 2008). NO působí také jako sekundární posel v souvislosti s mnoha signalizačními drahami v rostlinné buňce, včetně ROS-signální dráhy (Leterrier *et al.*, 2011). Reakcí NO a redukovaného glutathionu vzniká molekula

S-nitrosoglutathion, která slouží jako mobilní rezervoár NO. Důležitou roli při udržování hladiny GSNO a tím i homeostázy oxidu dusnatého hraje enzym S-nitrosoglutathionreduktasa. V posledních letech je intenzivně studována role tohoto enzymu za fyziologických i stresových podmínek (Leterrier *et al.*, 2011; Kubienová *et al.*, 2013; Kubienová *et al.*, 2014).

Řada studií potvrdila aktivaci oxidačního stresu u rajčat vystavených působení zvýšené koncentrace solí v prostředí (Gapi'nska a Sklodowska, 2000; Shalata *et al.*, 2001; Mittova *et al.*, 2002, 2003, 2004). V případě aplikace exogenního přídatku NO dochází ke snížení účinku salinity (Gong *et al.*, 2014a, b). V práci Gong *et al.* (2015) bylo naznačeno, že GSNOR může regulovat toleranci rostlin rajčete na salinitní stres. Nicméně, jeho funkce není zodpovědná za udržování homeostázy Na⁺ iontů, ale hraje roli v regulaci hladiny RNS a tak následně ovlivňuje redoxní rovnováhu. Jak je znázorněno na obr. 19, GSNOR může být zapojena do metabolismu ROS přes modulaci hladiny RNS. RNS mají duální funkci, mohou sloužit jako signální molekuly, ale také mohou způsobovat nitrosativní stres v závislosti na jejich hladině v buňce.



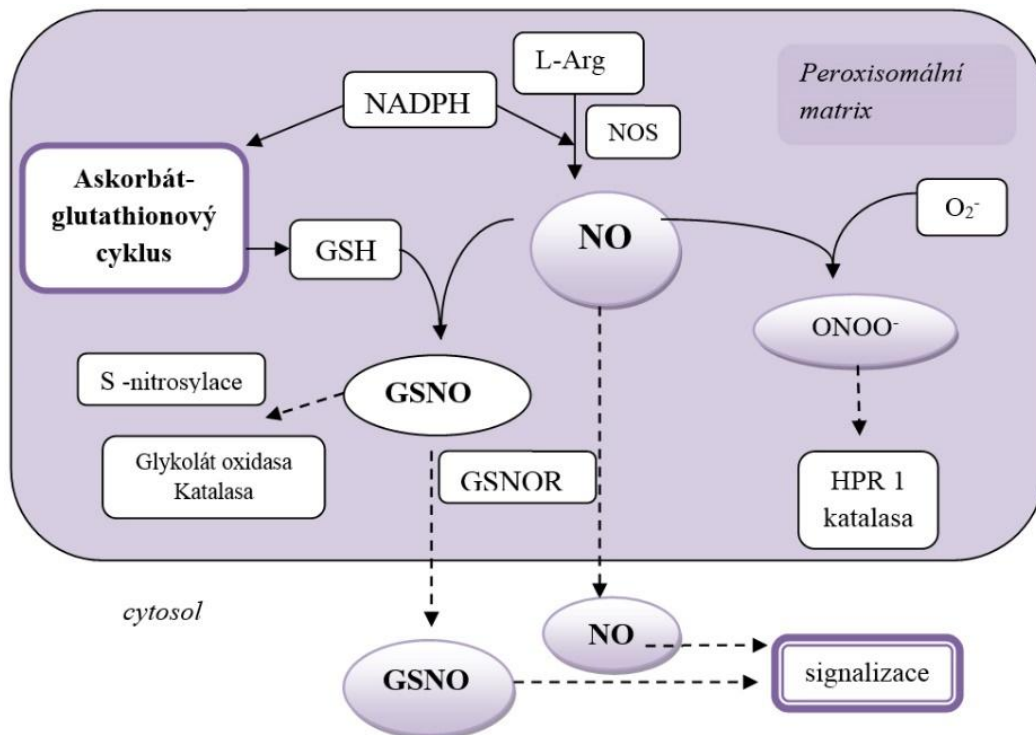
Obr. 19: Vliv GSNOR na redoxní signalizaci (převzato z Gong *et al.*, 2015). V počáteční fázi salinitního stresu down-regulace GSNOR má vliv na zvýšení hladiny RNS, což vede k aktivaci redoxní signální dráhy a aktivaci dalších mechanismů snižujících působení salinitního stresu, a dochází k nastolení tolerance na stres. Pokud v pozdější fázi salinitního stresu dojde k nadměrnému navýšení koncentrace RNS, dochází následně k vysoké produkci ROS (oxidativní vzplanutí), k vyvolání programované buněčné smrti (PCD). V tomto případě over-exprese GSNOR může snižovat hladinu RNS a tak chránit rostliny před účinky salinitního stresu.

Redukovaný GSH a redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH) jsou donory elektronů v mnoha enzymových reakcích a biosyntetických drahách. Mají klíčovou roli v udržování buněčné redoxní homeostázy rostlinných buněk za fyziologických a stresových podmínek (Barroso *et al.*, 1998; Noctor, 2006; Noctor

et al., 2006; Pollak *et al.*, 2007; Foyer a Noctor, 2011; Dubreuil-Maurizi a Poinssot, 2012). Jak je známo NADPH je nezbytný redukční ekvivalent pro regeneraci redukovaného glutathionu za katalýzy glutathionreduktasou v rámci askorbát-glutathionového cyklu (Berger *et al.*, 2004; Pollak *et al.*, 2007; Foyer a Noctor, 2011). Glutathion je považován za nejhojnější thiol s nízkou molekulovou hmotností v rostlinách (Noctor *et al.*, 2012). Přítomnost -SH skupiny činí GSH multifunkční molekulou, která je nezbytná pro fungování antioxidantního systému a také přispívá k tzv. „redoxnímu spínači“ proteinů, který usnadňuje jejich procesy regulace, jako je S-glutathionylace a S-nitrosylace (Spadaro *et al.*, 2010; Noctor *et al.*, 2012; Corpas *et al.*, 2013; Couturier *et al.*, 2013). Za stresových podmínek je hladina GSH významně snížena pravděpodobně v důsledku jeho využití v udržování aktivity a hladiny GSH-závislých enzymů. Tyto výsledky jsou zcela v souladu se studií GSH a aktivity GR u listů *Arabidopsis* v reakci na peroxid vodíku (Mhamdi *et al.*, 2010).

Manai *et al.* (2014) se zaměřili na studium úlohy GSH a NADPH, které hrají důležitou roli v udržování redoxní homeostasy v rostlinných buňkách, a současně úlohy NO v kořenech u rostlin vystavených salinitnímu stresu. Studium metabolismu GSH a NADPH naznačuje, že existuje úzký vztah mezi redoxní homeostázou a metabolismem reaktivních forem kyslíku a dusíku (ROS a RNS). Proto byl sledován potenciální vztah mezi NADPH, GSH a NO na jedné straně a enzymy zapojenými do jejich metabolismu jako je NADP-dehydrogenasa (EC 1.6.99.1), GSNOR, GR a GPX (guajakolperoxidasa, EC 1.11.1.7) na straně druhé. S-nitrosylací GSH v reakci s volnými radikály NO vzniká GSNO (Corpas *et al.*, 2013). Za fyziologických podmínek je v kořenech rajčete obsah GSNO podobný jako oxidovaného glutathionu (GSSG), zatímco při salinitním stresu se obsah GSNO snížil. Současně s poklesem koncentrace GSNO bylo zaznamenáno zvýšení hladiny NO. Tyto výsledky korespondují se studií vlivu salinity realizovanou v kořenech *Arabidopsis* (Corpas *et al.*, 2009a; Leterrier *et al.*, 2012a, b), slunečnice (David *et al.*, 2010), olivových listů (Valderrama *et al.*, 2007), citrusových listů (Tanou *et al.*, 2009,2012) a listů kukuřice (Bai *et al.*, 2011). Bylo prokázáno, že exogenní aplikace NO může zmírnit vliv salinitního stresu, tento efekt bude souviset s rolí NO v obranném mechanismu a s detekovaným zvýšením endogenní hladiny NO v důsledku salinitního stresu (Kopyra a Gwozdz, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Významnou roli v reakci rostlin na salinitní stres má NO v regulaci klíčových enzymů askorbát-peroxidasového cyklu přes S-nitrosylace případně Tyr-nitrace APX a MDAR (Obr. 10) jak bylo prokázáno v experimentech na

rostlinách hrachu (Begara-Morales *et al.*, 2014, 2015). Provázanost role ROS, RNS, antioxidačních systémů a procesů jako je S-nitrosylace a Tyr-nitrace, kde hraje důležitou roli GSNO a peroxynitrit, vznikající v reakci NO se superoxidovým radikálem, je zde uvedena na obr. 20 (Corpas a Barroso, 2013).



Obr. 20. Schéma znázorňující provázanost role ROS, RNS, antioxidačních systémů a procesů jako je S-nitrosylace a Tyr-nitrace (převzato z Corpas a Barroso, 2013).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Acros Organics, USA: glutation, Triton X-100

Axon Medchem, Holandsko: N6022

Bio-Rad, USA: bromfenolová modř, Coomassie Brilliant Blue R-250

Bochemie, Česká republika: SAVO

Duchefa Biochemie (Nizozemsko): Murashige a Skoog medium (MS médium)

Lachema, Česká republika: aceton, diethylether, 96% ethanol, hydroxid draselný, hydroxid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, kyselina trihydrogenfosforečná, methanol

Lach-Ner, Česká republika: chlorid sodný, chlorid rtuťnatý, uhličitan amonný

MachereNagel: NucleoSpin kit pro izolaci RNA, rDNAasa

Roche: Transcriptor high fidelity cDNA synthesis kit

Sigma-Aldrich, Německo: agar, akrylamid, aminofenylfluorescein, DAF-FM DA, dihydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, dithiothreitol (DTT), DMSO, dusitan sodný, glycin, glycerol, fenylmethylsulfonilchlorid (PMSF), hovězí sérový albumin, hydrogenfosforečnan draselný dihydrát, hydrogenfosforečnan sodný dihydrát, merkaptoethanol, MES hydrát, N-(1-naftyl)ethylendiamin (NED), nikotidamidnukleotid redukovaný (NADH), persíran amonný, PTIO, sacharosa, sulfanilamid, Tris-HCl

3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); centrifuga CL31R (Thermo Jouan, Francie); centrifuga 6K15 (Sigma, Německo); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); laminární box (Schoeller, ČR); magnetická míchačka (IKA, Německo); spektrofotometr BioSpec-nano (Shimadzu, USA); termostat (Grant, UK); třepačka VXR basic (IKA, Německo); vortex (Stuart, UK), mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA), mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy H1 (BioTek Instruments, USA), světelný a fluorescenční mikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko), Real-Time system CFX96 (Bio-Rad, USA), Termalcycler C10000 (Bio-Rad, USA), Termalcycler T100 (Bio-Rad, USA)

3.1.3 Rostlinný materiál

Vliv aplikace vybraných látek (GSNO, GSH, N6022 - inhibitor GSNOR, PTIO) modulující hladinu NO a jejich kombinací na vývoj klíčnicích rostlin za fyziologických podmínek a v prostředí zvýšené koncentrace NaCl byl studován za pomoci 2 genotypů *Solanum* spp. lišící se rezistencí k biotrofnímu patogenu *Oidium neolycopersici* (padlí rajčatové): *S. lycopersicum* cv. Amateur – náchylný a *S. habrochaites* f. glabratum – vysoce rezistentní (Mlíčková *et al.*, 2004; Piterková *et al.*, 2011).

Pro sterilizaci byla semena sterilizována 30 s v 70% roztoku ethanolu, dále 25 minut za stálého třepání v 3% roztoku SAVO a následně 3x promyta sterilní vodou. Sterilizovaná semena byla přenesena na sterilní vodou ovlhčené 3 vrstvy filtračního papíru v Petriho misce. Pro naklíčení semen byla Petriho miska se semeny na dobu 3 – 5 dnů uchována ve tmě při teplotě 25°C. Do středu čtvercových Petriho misek na pevné MS médium (40 ml/miska) s vitamíny obsahující testované látky o finální koncentraci (tab. 5) bylo vyseto 10 naklíčených semen v jedné řadě. V kontrolním experimentu byla semena vyseta na MS médium neobsahující testované látky. Misky byly umístěny na 9 dní ve fytotronu (teplota 25°C). Experimenty byly prováděny vždy ve trojím opakování pro jednotlivé genotypy *Solanum* spp..

Tab. 5: Testované sloučeniny: koncentrace zásobních roztoků a finální koncentrace v MS médiu

Typ sloučeniny	Koncentrace zásobního roztoku	Finální koncentrace v MS médiu
GSH	100 mM	1,5 mM
GSNO	100 mM	100 µM
N6022	1 mM	0,1; 1; 10 µM
PTIO	133 mM	0,1 mM
N6022 + GSH		1 µM + 1,5 mM
N6022 + GSNO		1 µM + 100 µM
N6022 + PTIO		1 µM + 0,1 mM
NaCl	300 mM	50; 100; 150 mM
NaCl + N6022		100 mM + 1 µM

Vliv testovaných látek na růst semenáčků byl 9 dnů po výsevu semen na MS médium dokumentován digitálním fotoaparátem Sony A330. Dále byla oddělena kořenová část od nadzemní, rostlinný materiál byl zvážen a zamražen pro realizaci dalších experimentů (stanovení aktivity GSNOR, Western blot, exprese *GSNOR*). Apikální části kořenů (4 mm segmenty) byly dále použity pro histochemickou detekci produkce RNS.



Obr. 21: Petriho misky s 9-ti denními semenáčky a) *Solanum habrochaites* b) *Solanum lycopersicum* cv. Amateur pěstovanými na MS médiu.

3.1.4 Příprava média

Látky byly naváženy podle tab. 6. Dále k nim bylo přidáno 800 ml destilované H₂O a pH bylo upraveno na hodnotu 6,1. Poté byl objem doplněn na 1 l. Po autoklávování média byla hodnota pH 5,8.

Tab. 6: Příprava pevného média pro výsev semen

Látky	Množství [g/l]
MS médium s vitamíny	4,4
Agar	8
Sacharosa	10
MES hydrát	0,195

Složení MS média: MS médium obsahuje mikroprvky, makroprvky a organické látky podle práce Murashige a Skoog (1962) a vitamíny, jak je popsáno v práci Gamborg *et al.* (1968).

MES hydrát: hydrát 2-(N-morfolino) ethansulfonové kyseliny

3.1.5 Příprava S-nitrosoglutathionu (GSNO)

S-nitrosoglutathion byl připraven podle metodiky Moore a Mani z roku 2002.

Glutathion (MW=307,3) v množství 614 mg byl rozpuštěn ve 3 ml 0,5 M HCl na ledové lázni. Následně bylo přidáno 138 mg dusitanu sodného (MW=69). Tato reakční směs byla po dobu 40 minut chlazená na ledové lázni. Za pomocí Büchnerovy nálevky byla vzniklá červená sraženina odsáta a promyta 2x 10 ml ledově vychlazené deionizované H₂O, 2x 10 ml ledově vychlazeného acetonu a 2x 10 ml ledově vychlazeného diethyletheru. Takto promytý produkt byl přenesen do alobalu, sušen za tmy v exikátoru (GSNO je nestabilní na světle) a po dosušení zamražen.

3.1.6 Vyhodnocení délky kořenů a nadzemní části

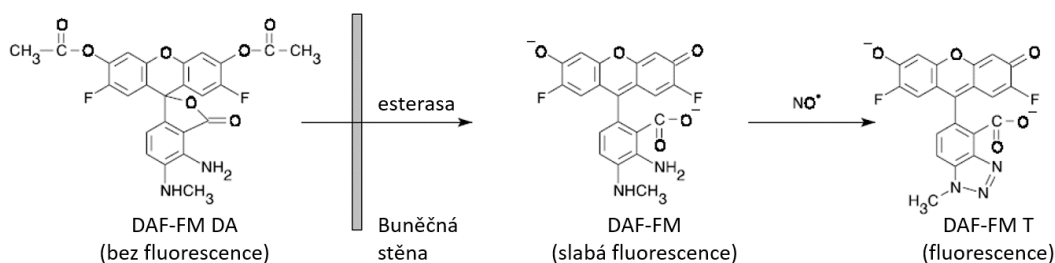
Pro vyhodnocení délky kořenů byl použit ImageJ 1.33 software (National Institute of Health, USA).

3.2 Metody

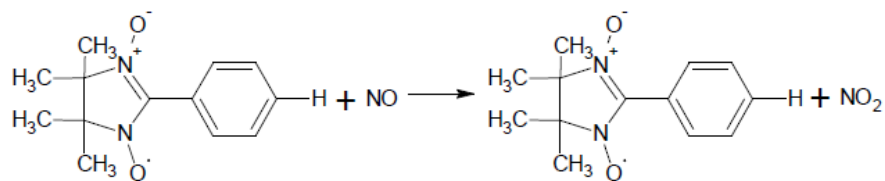
3.2.1 Histochemické stanovení produkce reaktivních forem dusíku

Pro detekci NO byla vybrána sonda DAF-FM DA (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát). Po vstupu do buňky přes membránu je pomocí esterasy deacetylována za vzniku DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein). DAF-FM dále reaguje s NO za vzniku vysoce fluorescenčního triazofluoresceinu. DAF-FM je citlivější a fotostabilnější než často používaný DAF-2 a je schopen stabilní a silné fluorescence v širokém rozmezí pH (Kojima *et al.*, 1998) (obr. 22). Fluorescenční sonda 3'-(p-aminofenyl)fluorescein (APF) byla použita pro detekci peroxynitritu. Tato látka sama o sobě nefluoreskuje, po reakci s ROS (např. ONOO⁻) vzniká intenzivně fluorescenční sloučenina (obr. 24).

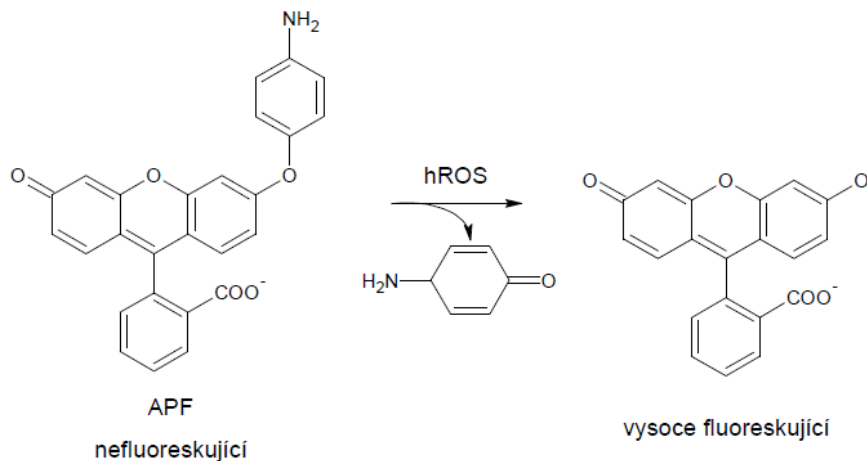
Lokalizace a detekce RNS byla realizována s využitím světelného a fluorescenčního mikroskopu Olympus BX50. Pro detekci oxidu dusnatého byly použity apikální části kořene (4 mm dlouhé segmenty) inkubované 20 minut v 20 μM DAF-FM DA v 10 mM Tris-HCl pufru, pH 7,4. Pro detekci peroxynitritu byly použity apikální části kořene inkubované 30 minut v 20 μM APF v 10 mM Tris-HCl pufru, pH 7,4. Poté byly kořenové segmenty přeneseny na podložní sklíčko do kapky 5% glycerolu v 10 mM Tris-HCl pufru, pH 7,4 a překryty krycím sklíčkem. Následně byla detekována zelená fluorescence v případě přítomnosti daného typu RNS. Jako negativní kontrola byly použity kořenové segmenty (bez modulátoru) inkubovány v PTIO (lapače NO) (obr. 23).



Obr. 22: Reakce fluorescenční sondy DAF-FM DA pro detekci NO



Obr. 23: Reakce NO a PTIO – negativní kontrola



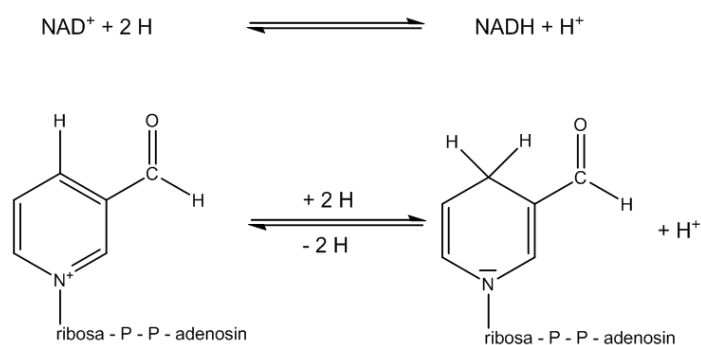
Obr. 24: Reakce fluorescenční sondy APF pro detekci ONOO⁻

3.2.2 Extrakce

Rostlinný materiál byl homogenizován v tekutém dusíku a následně v poměru 1:2 (1 g rostlinného materiálu:2 ml pufru) s extrakčním pufrům (50 mM Tris, 0,2% (v/v) Triton X-100, 2 mM DTT, 1 mM PMSF). Extrakt byl poté při 16 000 g a 4°C centrifugován. Supernatant byl přečištěn gelovou filtrací na kolonce NAP-5 (GE Healthcare). Kolonka byla ekvilibrována 10 mM Na⁺- fosfátovým pufrům, pH 6,8 (3x 2,5 ml pufru). Po ekvilibraci bylo na kolonku aplikováno 500 µl supernatantu a po jeho vsáknutí byl nanesen 1 ml 50 mM K⁺-fosfátového pufru, pH 7,8, tj. eluční pufr. Následovalo zachycení 1 ml eluátu a kolonka byla promyta 25 ml deionizované vody.

3.2.3 Stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy

Pro stanovení aktivity GSNOR byla použita spektrofotometrická metoda založena na principu Warburgova optického testu, které využívá S-nitrosoglutathionreduktasovou aktivitu enzymu.



Obr. 25. Warburgův optický test. Přeměna koenzymu NAD^+ na NADH při 340 nm (převzato z http://www.wikiskripta.eu/index.php/Warburgův_optický_test; staženo 15. 3. 2016).

V tomto experimentu byla sledována oxidace (úbytek) NADH při 340 nm a 30°C po dobu 20 minut. Měření bylo realizováno v uspořádání na 96 jamkových destičkách na readeru Synergy. Reakční směs obsahovala 225 μl reakčního pufru (20 mM Tris-HCl, pH 8), 15 μl extraktu a 30 μl 2 mM NADH . Pro samotný start reakce bylo přidáno 30 μl 4 mM GSNO. Pro každý vzorek byl připravován blank, který místo substrátu GSNO obsahoval 30 μl deionizované H_2O . Byl zaznamenán pokles absorbance v 10 s intervalech po dobu 20 minut. Reakce probíhala při 30°C. Experiment byl proveden ve třech opakováních. NADH a GSNO byly vždy připravovány čerstvě a uchovány v chladu a tmě, aby nedocházelo k jejich degradaci.

3.2.4 Stanovení S-nitrosothiolů metodou Savillova

Metoda je založena na reakci katalyzované Hg^{2+} , kdy dochází k uvolnění NO^+ z S-nitrosothiolů. Vznikající dusitan je detekován v kyselém prostředí pomocí tvorby diazoniové soli, která dále kopuluje s činidlem NED za tvorby azobarviva. Vzniklý produkt je detekován spektrofotometricky při 540 nm (Moore a Mani, 2002).

Stanovení S-nitrosothiolů bylo realizováno v uspořádání na 96-jamkových mikrodestičkách. Do každé jamky byly napipetováno 5 μl extraktu a 195 μl činidla Griess A nebo Griess B. Po 5 minutové inkubaci bylo přidáno 100 μl činidla NED. Po další 5 min inkubaci byla měřena absorbance při 540 nm.

Složení roztoků

Činidlo Griess A: 3,5% sulfanilamid v 0,5 M HCl

Činidlo Griess B: 3,5% sulfanilamid v 0,5 M HCl a 1% HgCl_2

Činidlo NED: 0,1% N-(1-naftyletylen)diamin v deionizované vodě

3.2.5 Stanovení proteinů Bradfordovou metodou

Měření obsahu proteinů bylo prováděno na readeru Synergy na 96 jamkových mikrodestičkách. Jako standart byl použit hovězí sérový albumin (BSA) (koncentrace 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 - 1,2 mg/ml). Jednotlivé jamky pro reakci obsahovaly: 45 µl deionizované vody, 5 µl extraktu nebo standardu BSA o příslušné koncentraci a 200 µl pracovního činidla Bradfordova. Následovala 5 min inkubace při laboratorní teplotě, po které byla proměřena absorbance při 595 nm.

Složení zásobního roztoku činidla Bradfordové: 0,5 mg/ml Coomasie Brilliant Blue G250; 0,25 M metanol; 0,5 M 85 % kyselina fosforečná. Naředěním 1:4 deionizovanou vodou byl získán pracovní roztok (Bradford, 1976).

3.2.6 Exprese GSNOR

Pro sledování exprese *GSNOR* byla použita metoda kvantitativní real-time PCR – qRT-PCR (polymerase chain reaction). Tato metoda umožňuje spolehlivou, citlivou a hlavně rychlou detekci a kvantifikaci specifického úseku RNA. qRT-PCR je variantou PCR, již předchází reverzní transkripce izolované RNA a získaná cDNA slouží jako templát pro DNA polymerasu se dvěma genově specifickými primery v real-time PCR reakci, která je založena na sledování průběhu PCR reakce přímo během reakce pomocí fluorescenčních sond.

3.2.6.1 Homogenizace rostlinného materiálu

Ve sterilní třecí misce s tloučkem byl homogenizován rostlinný materiál na prášek za pomoci kapalného dusíku. Do sterilní podchlazené mikrozkušavky bylo přesně odváženo 0,1 g zmrzlého rostlinného prášku. Takto připravené vzorky byly pro další zpracování uchovány při -80°C nebo byly ihned použity k izolaci RNA.

3.2.6.2 Izolace RNA pomocí komerčního kitu (NucleoSpin RNA Plant, Macherey-Nagel)

Do sterilní mikrozkušavky se vzorkem bylo přidáno 350 µl RA1 pufru a 3,5 µl β-merkaptioethanolu k lýzi buněk. Tato směs byla 1 min prudce vortexována. Do sběrné zkumavky byl umístěn fialový NucleoSpin filtr a na něj byl aplikován lyzát a centrifugován 1 min, 14 000 g při laboratorní teplotě. Filtrát bez poškození peletu byl přepipetován do nové 2 ml mikrozkušavky, kam bylo přidáno 350 µl 70% ethanolu. Mikrozkušavka se vzorkem byla opět prudce 1 min vortexována. Vzniklý lyzát byl aplikován na světle modrou NucleoSpin kolonu ve sběrné zkumavce. Zkušavka s kolonkou byla centrifugována 30 s při 10 000 g a laboratorní teplotě. Po centrifugaci

byla kolona umístěna do nové 2 ml sběrné zkumavky. Na kolonu bylo aplikováno 350 μ l MDB (membráně desalting buffer) a opět proběhla centrifugace 1 min, 14000 g při laboratorní teplotě k vysušení membrány. Ve sterilní mikrozkuhavce byla připravena reakční směs DNAsy, kdy pro každou reakci bylo smícháno 10 μ l DNAsy a 90 μ l DNAsa reakčního pufru, následovalo opatrné promíchání překlápěním zkumavky. Tato reakční směs byla aplikována v množství 95 μ l na střed silikátové membrány kolonky a inkubována 15 min při laboratorní teplotě. Poté pomocí 200 μ l RA2 byla membrána promyta a inaktivována DNAsa, opět došlo k centrifugaci 30 s při 10 000 g. Kolonka byla umístěna do nové sběrné zkumavky, na ni přidáno 0,6 ml RA3 a centrifugována 30 s při 10 000 g. Následně byl odstraněn filtrát, kolonka byla umístěna zpět do sběrné zkumavky a bylo přidáno 0,25 ml RA3 roztoku. Centrifugace proběhla 2 min při 14 000 g a kolonka byla přenesena do nové sterilní 1,5 ml mikrozkuhavky a na střed silikátové membrány bylo přidáno 50 μ l DEPC H₂O (RNase free). Pomocí centrifugace 1 min při 14 000 g byla vymyta vysoce čistá RNA z kolonky. Takto získaný vzorek byl zamražen na -80 °C.

3.2.6.3 Spektrofotometrické stanovení čistoty RNA

Míra čistoty vyizolované RNA byla stanovena spektrofotometricky při 260 a 280 nm ve 2 μ l vzorku. Poměr hodnot $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ odpovídá uspokojivé čistotě vzorku. Hodnota A_{260} byla použita k výpočtu koncentrace RNA. Koncentrace byla měřena na mikrodestičkovém readeru Synergy H1 pomocí destičky Take3.

3.2.6.4 Reverzní transkripce (přepis RNA do cDNA)

Veškeré komponenty použité pro přípravu reakce včetně vzorků je nutné po celou dobu uchovávat na ledu. Všechny vzorky pro kvantitativní RT-PCR byly připraveny se stejným výchozím množstvím RNA (tj. 1 μ g). Do malé mikrozkuhavky (tzv. stripů) byl aplikován 1 μ g RNA, 1 μ l 50 μ M oligo(dT) primeru, objem byl doplněn sterilní vodou na 11,4 μ l. Tato směs byla stočena v pikofuze a inkubována 10 min při 65°C v termocycleru. Po inkubaci byla mikrozkuhavka přenesena na led a přidána druhá reakční směs složená ze 4 μ l 5x reakčního pufru, 0,5 μ l RNAsového inhibitoru, 2 μ l dNTP mixu, 1 μ l DTT a 1,1 μ l reverzní transkriptasy (celkový objem 8,6 μ l). Tato směs byla stočena na pikofuze a byla provedena inkubace při 45°C 30 min. Poté následovala 5 min inaktivace při 85°C. Vzniklá cDNA byla zamražena na -20°C.

3.2.6.5 Kvantifikace genové exprese GSNOR metodou real-time PCR

Pro samotnou qPCR reakci byl jako teplát použit 1 μ l vytvořené cDNA. Jako kontrolní (negativní vzorek) byl použit 1 μ l nepřepsané RNA. Dále jako kontrola sloužil 1 μ l H₂O v RT reakci místo vlastní cDNA. Pro reakci byly použity genově specifické primery (Tab. 9) a SYBR Green próba (ABgene, ThermoScientific, UK) s pasivní referenční barvičkou ROX k normalizaci dat. Každá reakce byla provedena ve třech technických replikátech. Pro přípravu 20 μ l reakční směsi byly použity komponenty v množstvích uvedených v tab. 7. Reakční směs byla pipetována do PCR zkumavek – stripů uložených v chladicím stojánku.

Tab. 7: Příprava reakční směsi

Složka	Objem v μ l/reakce
SYBR Green Mix 2x	10
Forward primer 3 μ M	1,75
Reverse primer 3 μ M	1,75
Deionizovaná voda	5,5
cDNA	1

Mikrozkumavky – stripy byly důkladně uzavřeny víkem, krátce centrifugovány v pikofuze a následně vloženy do termocykleru. Termocykler C1000 byl přednastaven na PCR program podle tab. 8.

Tab. 8: Nastavení real-time PCR reakce v programu Biorad CPX Manager

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95 °C	15 min	1 cyklus
Denaturace	95 °C	15 s	40 cyklů
Navázání primerů	56 °C	30 s	40 cyklů
Elongace	72 °C	30 s	40 cyklů

V PCR reakci byl stanovován studovaný gen pro GSNOR a jako house-keeping gen byl použit elongační faktor 1 α . Sekvence jejich primerů jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9: Sekvence forward a reverse primerů použitých při PCR reakci

Sledovaný gen	forward primer	reverse primer
GSNOR	CTGGAGTGGGAGTTATGATGAA	CCTCCGCCACAGCAAGACCAACT
EF 1α	GGTCATCATCATGAACCATCC	CATACCAGCATCACCGTTCTT

6. ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium úlohy S-nitrosoglutathionreduktasy a reaktivních forem dusíku v procesu vývoje kořene *Solanum* spp. s využitím modulátorů ovlivňujících hladinu NO za fyziologických podmínek a salinitního stresu.

Z výsledků a diskuse práce vyplývají následující závěry:

- Rychlejší vývoj rostlin (větší délka i hmotnost kořenů a nadzemních částí) byl charakteristický pro šlechtěný genotyp *Solanum lycopersicum* cv. Amateur, u kterého byla detekována vyšší aktivita GSNOR, exprese GSNOR, hladina S-nitrothiolů a RNS v kořenové části v porovnání s divokým genotypem *S. habrochaites*.
- Zvýšená hladina RSNO v kořenovém systému v případě aplikace sloučeniny N6022, inhibující enzym GSNOR, nebo při aplikaci GSNO, tj. donoru NO, do růstového média vedla k pozitivnímu ovlivnění růstu kořenů u obou genotypů *Solanum* spp.. Naopak přítomnost lapače NO růst kořenů ovlivnila negativně.
- Potvrzená regulace hladiny RNS změnou aktivity GSNOR, následně může ovlivňovat hladinu ROS, které mají významnou roli v mechanismu reakcí vedoucích k dělení a prodlužování buněk, a to např. přímou interakcí ROS a RNS nebo ovlivněním aktivity klíčových enzymů metabolismu ROS, např. NADPH oxidasy a APX cestou S-nitrosylace. Současně může dojít k pozitivnímu ovlivnění auxinové signální dráhy S-nitrosylací jednoho z klíčových proteinů.
- Změny detekované po aplikaci PTIO poukazují na možné vzájemné ovlivnění hladiny RNS a ROS, kdy primární efekt snížení hladiny RNS, může ovlivnit produkci ROS vedoucí k následné aktivaci produkce RNS a intenzivní S-nitrosylaci. Následnou aktivací enzymu GSNOR se organismus chrání před nitrosativním stresem.
- Inhibice růstu kořene v prostředí redukovaného glutathionu potvrzuje významnou úlohu ROS v procesu vývoje rostliny. Genotypy *Solanum* spp., s rozdílnou citlivostí na patogen *O. neolycopersici*, se významně lišily svou reakcí na přítomnost externího redukovaného glutathionu na úrovni aktivace GSNOR aktivity a intenzity procesu S-nitrosylace.
- Byl potvrzen negativní vliv salinitního stresu na růst kořenů. Významnější efekt vyšší koncentrace NaCl byl pozorován u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. Oba genotypy *Solanum* spp. se lišily odpovědí na salinitní stres na úrovni GSNOR a S-nitrosylace.
- Významná role GSNOR v regulaci reakce rostlin na salinitní stres byla potvrzena potlačením inhibičního efektu NaCl na růst kořene v přítomnosti inhibitoru GSNOR. V tomto případě lze předpokládat absenci oxidativního stresu v důsledku ovlivnění aktivity klíčových enzymů metabolismu ROS, např. NADPH oxidasy a APX cestou S-nitrosylace.

Závěrem lze říci, že byla potvrzena významná úloha GSNOR ve vývoji rostlin *Solanum* spp. za fyziologických podmínek i v případě působení salinitního stresu, regulující hladinu RNS a proces S-nitrosylace.

7. LITERATURA

- Abat J. K., Deswal R. (2009): Differential modulation of S-nitrosoproteome of *Brassica juncea* by low temperature: change in S-nitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity. *Proteomics* **9**, 4368–4380.
- Ahmed G. J., Zhang S., Shi K., Zhou Y. H., Yu J. Q. (2012): Brassinosteroid improves seed germination and early development of tomato seedling under phenanthrene stress. *Plant Growth Regulation* **68**, 87–96.
- Achkor H., Díaz M., Fernández M. R., Biosca J. A., Parés X., Martínez M. C. (2003): Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**, 2248–2255.
- Airaki M., Leterrier M., Mateos R. M., Valderrama R., Chaki M., Barroso J. B., Del Río L. A., Palma J. M., Corpas F. J. (2012): Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum Annuum L.*) plants under low temperature stress. *Plant Cell and Environment* **35**, 281–295.
- Alamillo J. M., Garcia-Olmedo F. (2001): Effects of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal* **25**, 529–540.
- Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357**, 593–615.
- Almeselmani M., Deshmukh P. S., Sairam R. K., Kushwaha S. R., Singh T. P. (2006): Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Science* **171**, 382–388.
- Altug S., Demiryurek A. T., Cakici I., Kanzik I. (1999): The beneficial effects of peroxynitrite on ischaemia – reperfusion arrhythmias in rat isolated hearts. *European Journal of Pharmacology* **384**, 157–162.
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology* **55**, 373–399.
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J. (2011): Understanding the fate of peroxynitrite in plant cells – from physiology to pathophysiology. *Phytochemistry* **72**, 681–688.
- Arteel G. E., Briviba K., Sies H. (1999): Protection against peroxynitrite. *FEBS Letters* **445**, 226–230.
- Asada K. (1992): Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* **85**, 235–241.
- Baatour O., Kaddour R., Wannes W. A., Lachaa`l M., Marzouk B. (2010): Salt effects on the growth, mineral nutrition, essential oil yield and composition of marjoram (*Origanum majorana*). *Acta Physiologiae Plantarum* **32**, 45–51.
- Bai X., Yang L., Yang Y., Ahmad P., Yang Y., Hu X. (2011): Deciphering the protective role of nitric oxide against salt stress at the physiological and proteomic levels in maize. *Journal of Proteome Research* **10**, 4349–4364.
- Bandeoglu E., Eyidogan F., Yücel M., Avni Öktem H. (2004): Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. *Plant Growth Regulation* **42**, 69–77.
- Barroso J. B., Peragon J., Contreras-Jurado C., Garcia-Salguero L., Corpas F. J., Esteban F. J. (1998): Impact of starvation-refeeding on kinetics and protein expression of trout liver NADPH-production systems. *American Journal of Physiology* **274**, 1578–1587.
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F. J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M. C., Valderrama R., Sandalio L. M., Del Río L. A. (2006): Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1785–1793.
- Baxter A., Mittler R., Suzuki N. (2014): ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1229–1240.

- Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., López-Jaramillo J., M. Padilla N., Carreras A., Corpas F. J., Barroso J. B. (2014): Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **65**, 527–538.
- Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., López-Jaramillo J., M. Padilla N., Carreras A., Luque F., Corpas F. J., Barroso J. B. (2015): Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **66**, 5983 – 5996.
- Beligni M. V., Fath A., Bethke P. C., Lamattina L., Jones R. L. (2002): Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiology* **129**, 1642 – 1650.
- Benhar M., Forrester M. T., Stamler J. S. (2009): Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Molecular Cell Biology* **10**, 721 – 732.
- Berger F., Ramírez-Hernández M. H., Ziegler M. (2004): The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P)H. *Trends in Biochemical Sciences* **29**, 111–118.
- Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D. (2008): New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 21–39.
- Bethke P. C., Badger M. R., Jones R. L. (2004): Apoplasmic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**, 332 – 341.
- Bethke P. C., Libourel I. G., Reinohl V., Jones R. L. (2006): Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break Arabidopsis seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* **223**, 805–812.
- Bolwell G. P. (1999): Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 287–294.
- Bradford M. M. (1976): Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248 – 254.
- Broniowska K. A., Diers A. R., Hogg N. (2013): S-nitrosoglutathione. *Biochimica et Biophysica Acta* **1830**, 3173 – 3181.
- Cano A., Artés F., Arnao M. B., Sánchez-Bravo J., Acosta M. (1996): Inhibition of etiolated lupin hypocotyl growth and rooting by peroxides, ascorbate and glutathione. *Journal of Plant Physiology* **147**, 721-728.
- Carver J., Doctor A., Zaman K., Gaston B. (2005): S-nitrosothiol formation. *Methods in Enzymology* **396**, 95 – 105.
- Castello P., David P., McClure T., Crook Z., Poyton R. (2006): Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxia signaling in eukaryotes. *Cell Metabolism* **3**, 277–287
- Colagiovanni D. B., Drolet D. W., Langlois-Forget E., Piché M., Looker D., Gary J. (2012): A nonclinical safety and pharmacokinetic evaluation of N6022: A first-in-class S-nitrosoglutathione reductase inhibitor for the treatment of asthma. *Rosenthal a Regulatory Toxicology and Pharmacology* **62**, 115–124.
- Corpas F. J., Del Rio L. A., Barroso J. B. (2008a): Post-translational modifications mediated by reactive nitrogen species: nitrosative stress responses or components of signal transduction pathways? *Plant Signaling & Behavior* **3**, 301 – 303.
- Corpas F. J., Chaki M., Fernández-Ocaña A., Valderrama R., Palma J. M., Carreras A., Begara-Morales J. C., Airaki M., del Río L. A., Barroso J. B. (2008b): Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1711 – 1722.
- Corpas F. J., Hayashi M., Mano S., Nishimura M., Barroso J. B. (2009a): Peroxisomes are required for in vivo nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* **151**, 2083–2094.
- Corpas F. J., Chaki M., Leterrier M., Barroso J. B. (2009b): Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 920–923.
- Corpas F. J., Barroso J. B. (2013): Nitro-oxidative stress vs. oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytologist* **199**, 633–635.

- Corpas F. J., Palma J. M., Del Río L. A., Barroso J. B. (2013): Protein tyrosine nitration in higherplants grown under natural and stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **4**, 29.
- Correa-Aragunde N., Graziano C. M., Lamattina L. (2004): Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**, 900 – 905.
- Correa-Aragunde N., Lanteri M. L., Garcí'a-Mata C., Ten Have A., Laxalt A. M., Graziano M., Lamattina L. (2007): Nitric oxide functions as intermediate in auxin, abscisic acid, and lipid signaling pathways. *Plant Cell Monographs. Nitric oxide* **34**, 113–130.
- Correa-Aragunde N., Foresi N., Lamattina L. (2013): Structure diversity of nitric oxide synthases (NOS): the emergence of new forms in photosynthetic organisms. *Frontiers in Plant Science* **4**, 232.
- Couturier J., Chibani K., Jacquot J. P., Rouhier N. (2013): Cysteine-based redox regulation and signaling in plants. *Frontiers in Plant Science* **4**, 105.
- Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo G., Giustarini D., Milzani A. (2009): Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Science* **34**, 85–96.
- Danielson S. R., Andersen J. K. (2008): Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 1787 – 1794.
- David A., Yadav S., Bhatla S. C. (2010): Sodium chloride stress induces nitric oxide accumulation in root tips and oil body surface accompanying slower oleosin degradation in sunflower seedlings. *Physiologia Plantarum* **140**, 342–354.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R. A., Lamb C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585–588.
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. (2001): Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **98**, 13454–13459.
- de Oliveira H. C., Wulff A., Saviani E. E., Salgado I. (2008): Nitric oxide degradation by potato tuber mitochondria: evidence for the involvement of external NAD(P)H dehydrogenases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1777**, 470–476.
- Del Río L. A., Corpas F. J., Barroso J. B. (2004): Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**, 783–792
- Del Río L. A., Puppo A. (2009): *Reactive oxygen species in plant signaling*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Díaz M., Achkor H., Titarenko E., Martínez M. C. (2003): The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Letters* **543**, 136 – 139.
- Dolferus R., Osterman J. C., Peacock W. J., Dennis E. S. (1997): Cloning of the Arabidopsis and rice formaldehyde dehydrogenase genes: implications for the origin of plant ADH enzymes. *Genetics* **146**, 1131 - 1141.
- Duan Q., Kita D., Li C., Cheung A. Y., Wu H. M. (2010): FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A.* **107**, 17821–17826.
- Dubreuil-Maurizi C., Poinssot B. (2012): Role of glutathione in plant signaling under biotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 210–212.
- Ducrocq C., Blanchard B., Pignatelli B., Ohshima H. (1999): Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **55**, 1068–1077.
- Durner J., Wendehenne D., Klessing D. F. (1998): Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **95**, 10328–10333.
- Durner J., Klessing D. F. (1999): Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 369–374.
- Engeland K., Höög J. O., Holmquist B., Estonius M., Jörnvall H., Vallee B. L. (1993): Mutation of Arg-115 of human class III alcohol dehydrogenase: a binding site required for formaldehyde dehydrogenase activity and fatty acid activation. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **90**, 2491 – 2494.

- Espunya M. C., Díaz M., Moreno-Romero J., Martínez M. C. (2006): Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell and Environment* **29**, 1002 – 1011.
- 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, *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **102**, 8054 – 8059.
- Fernández-Marcos M., Sanz L., Lewis D. R., Muday G. K., Lorenzo O. (2011): Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PINFORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **108**, 18506-18511.
- Fernández-Marcos M., Snaz L., Lorenzo O. (2012): Nitric oxide An emerging regulator of cell elongation during primary root growth. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 196 – 200.
- Fernández-Marcos M., Sanz L., Lewis D. R., Muday G. K., Lorenzo O. (2013): Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **108**, 18506 – 18511.
- Fernández-Torquemada Y., Sánchez-Lizaso J. L. (2013): Effects of salinity on seed germination and early seedling growth of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **119**, 64–70.
- Ferrer-Sueta G., Radi R., (2009): Chemical biology of peroxyxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chemical Biology*. **4**, 161–177.
- Fliegmann J., Sandermann H. Jr. (1997): Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase cDNA: a novel plant gene of detoxification. *Plant Molecular Biology* **34**, 843 - 854.
- Flores T., Todd C. D., Tovar-Mendez A., Dhanoa P. K., Correa-Aragunde N. (2008): Arginase-negative mutants of Arabidopsis exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiology* **147**, 1936–1946.
- Flowers T., Troke P. F., Yeo A. R. (1977): The mechanisms of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **28**, 89–121.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations Page: <http://www.fao.org/docrep/R4082E/r4082e08.htm> (1. 8. 2013).
- Foresi N. P., Laxalt A. M., Tonón C. V., Casalongue C. A., Lamattina L. (2007): Extracellular ATP induces nitric oxide production in tomato cell suspensions. *Plant Physiology* **145**, 589 – 592.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina L. (2010): Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* **22**, 3816 – 3830.
- Fortenberry J. D., Owens M. L., Brown, L. A. (1999): S-Nitrosoglutathione enhances neutrophil DNA fragmentation and cell death. *American Journal of Physiology* **276**, 435 – 442.
- Foyer C. H., Noctor G. (2009): Redox regulation and photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling* **11**, 861 – 905.
- Foyer C. H., Noctor G. (2011): Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155**, 2–18.
- Freschi L. (2013): Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* **4**, 398.
- Fröhlich A., Durner J. (2011) The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): Is one really needed? *Plant Science* **181**, 401 – 404.
- Gamborg O. L., Eveleigh D. E. (1968): CULTURE METHODS AND DETECTION OF GLUCANASES IN SUSPENSION CULTURES OF WHEAT AND BARLEY. *Canadian Journal of Biochemistry* **46**, 417.
- Gapińska M., Skłodowska M. (2000): Antioxidant enzymes (CuZn-SOD, GSH-Px) activity and lipid peroxides concentration in NaCl-stressed tomato leaves. *Current Topics in Biophysics* **24**, 49–55.

- Garg N., Manchanda G. (2008): Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**, 595–618.
- Garg N., Manchanda G. (2009): ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems* **143**, 81–96.
- Gaston B., Reill J., Drazen, J. M., Fackler J., Ramdev P., Arnelle D., Mullins M. E., Sugarbaker D. J., Chee C., Singel, D. J. (1993): Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **90**, 10957–10961.
- Gaupels F., Spiazzi-Vandelle E., Yang D., Delledonne M. (2011): Detection of peroxynitrite accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive defense response. *Nitric Oxide – biology a chemistry* **25**, 222 – 228.
- Gaupels F., Kuruthukulangarakoola G. T., Durner J. (2012): Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 707–714.
- Glyanko A. K (2013): Initiation of nitric oxide (NO) synthesis in roots of etiolated seedlings of Pea (*Pisum sativum* L.) under the influence of nitrogen-containing compounds. *Biochemistry* **78**, 471-476.
- Gong Y. W., Yuan Y. J. (2005): Nitric oxide mediates inactivation of glutathione S - transferase in suspension culture of *Taxus cuspidata* during shear stress. *Journal of Biotechnology* **123**, 185-192.
- Gong B., Li X., Bloszies S., Wen D., Sun S., Wei M. (2014a): Sodic alkaline stress mitigation by interaction of nitric oxide and polyamines involves antioxidants and physiological strategies in *Solanum lycopersicum*. *Free Radical Biology and Medicine* **71**, 36–48.
- Gong B., Li X., VandenLangenberg K. M., Wen D., Sun S., Wei M. (2014b): Overexpression of S-adenosyl-L-methionine synthetase increased tomato tolerance to alkali stress through polyamine metabolism. *Plant Biotechnology Journal* **12**, 694–708.
- Gong B., Wen D., X. Wang, M. Wei, F. Yang, Y. Li, Q. Shi (2015): S-Nitrosogluthathione Reductase-Modulated Redox Signaling Controls Sodic Alkaline Stress Responses in *Solanum lycopersicum* L. *Plant Cell Physiology* **56**, 790–802.
- Gonzalez-Perez S., Quijano C., Romero N., Melr T. B., Radi R., Arellano J. B. (2008): Peroxynitrite inhibits electron transport on the acceptor side of higher plant photosystem II. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **473**, 25–33.
- Gow A. J., Buerk D. G., Ischiropoulos H. (1997): A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2841 – 2845.
- Gow A. J., Farkouh C. R., Munson D. A., Posencheg M. A., Ischiropoulos H. (2004): Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**, 262 – 268.
- Green L. S., Lawrence E. C., Patton A. K., Sun X., Rosenthal G. J., Richards J. P. (2012): Mechanism of Inhibition for N6022, a First-in-Class Drug Targeting S-Nitrosogluthathione Reductase. *Biochemistry* **51**, 2157 – 2168.
- Greenway H., Munns R. (1980): Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 149–190.
- Guerra D., Ballard K., Truebridge I., Vierling E. (2016): S-nitrosation of conserved cysteines modulates activity and stability of S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR). *ACS Paragon Plus Environment*, 1-38.
- Gueta-Dahan Y., Yaniv Z., Zilinskas B. A., Ben-Hayyim G. (1997): Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in *Citrus*. *Planta* **203**, 460–469.
- Guo F. Q., Crawford N. M. (2005): *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and darkinduced senescence. *Plant Cell* **17**, 3436 – 3450.
- Gupta K. J., Stoimenova M., Kaiser W. M. (2005): In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2601 – 2609.
- Gupta K. J., Fernie A. R., Kaiser W. M., van Dongen J. T. (2011): On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* **16**, 160–168

- Haendeler J., Hoffmann J., Tischler V., Berk B. C., Zeiher A. M., Dimmeler S. (2002): Redox regulatory and anti - apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nature Cell Biology* **4**, 743 – 749.
- Hasegawa P. M., Bressan R. A., Zhu J. K., Bohnert H. J. (2000): Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology - Plant Molecular Biology* **51**, 463–99.
- Hedberg J. J., Griffiths W. J., Nilsson S. J. F., Höög J. O. (2003): Reduction of S-nitrosoglutathione by human alcohol dehydrogenase 3 is an irreversible reaction as analysed by electrospray mass. *European Journal of Biochemistry* **270**, 1249 – 1256.
- Heijnen C. G. M., Haenen G. R. M. M., van Acker F. A. A., van der Vijgh W. J. F., Bast A. (2001): Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicology in Vitro* **15**, 3–6.
- Hess D. T., Stämmler J. S. (2011): Regulation by S-nitrosylation of protein posttranslational modification. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 4411 – 4418.
- Hill B. G., Dranka B. P., Bailey S. M., Lancaster J. R., Darley-Usmar V. M. (2010): What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *The Journal of biological chemistry* **285**, 19699 – 19704.
- Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2009): Nitrate proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické listy* **103**, 788 – 794.
- Hoffman M. D., Sniatynski M. J., Kast J. (2008): Current approaches for global post-translational modification discovery and mass spectrometric analysis. *Analytica Chimica Acta* **627**, 50.
- Hong J. K., Yun B. W., Kang J. G., Raja M. U., Kwon E., Sorhagen K. (2008): Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *Journal of Experimental Botany* **59**, 147–154.
- Huang X., Kiefer E., von Rad U., Ernst D., Foissner I., Durner J. (2002): Nitric oxide burst and nitric oxide-dependent gene induction in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 625–631.
- Holzmeister C., Fröhlich A., Sarioglu H., Bauer N., Durner J., Lindermayr C. (2011): Proteomic analysis of defense response of wildtype *Arabidopsis thaliana* and plants with impaired NO homeostasis. *Proteomics* **11**, 1664–1683.
- Cheng J. C., Seeley K. A., Sung Z. R. (1995): RML1 and RML2, Arabidopsis genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiology* **107**, 365-376.
- Chaki M., Valderrama R., Fernandez-Ocana A. M., Carreras A., Lopez-Jaramillo J., Luque F., Palma J. M., Pedrajas J. R., Begara-Morales J. C., Sanchez-Calvo B., Gomez-Rodriguez M. V., Corpas F. J., Barroso J. B. (2009a): Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4221–4234.
- Chaki M., Fernández-Ocana A. M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F. J., Luque F., Gómez-Rodríguez M. V., Begara-Morales J. C., Corpas F. J., Barroso J. B. (2009b): Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant and Cell Physiology* **50**, 265 – 279.
- Chen R., Sun S., Wang C., Li Y., Liang Y., An F. (2009): The *Arabidopsis* PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Research* **19**, 1377 – 1387.
- Igamberdiev A. U., Baron K., Manac'h-Little N., Stoimenova M., Hill R. D. (2005): The haemoglobin/nitric oxide cycle: involvement in flooding stress and effects on hormone signalling. *Annals of Botany* **96**, 557–564.
- Iglesias M. J., Terrile M. C., Bartoli C. G., D'Ippolito S., Casalongue C. A. (2010): Auxin signaling participates in the adaptive response against oxidative stress and salinity by interacting with redox metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **74**, 215–222.
- Inzé A., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., van Breusegem F. (2012): A subcellular localization compendium of hydrogen peroxide-induced proteins. *Plant, Cell and Environment* **35**, 308–320.

- Ischiropoulos H. (2003): Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**, 776 – 783.
- Jasid S., Simontacchi M., Bartoli C. G., Puntarulo S. (2006): Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology* **142**, 1246–1255.
- Jensen D. E., Belka G. K., Du Bois G. C. (1998): S-nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemical Journal* **331**, 659 – 668.
- Jensen O. N. (2006): Interpreting the protein language using proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 391 – 403.
- Job C., Rajjou L., Lovigny Y., Belghazi M., Job D. (2005): Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiology* **138**, 790–802.
- Kavya R., Saluja R., Singh S., Dikshit M. (2006): Nitric oxide synthase regulation and diversity: Implications in Parkinson's disease. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **15**, 280 – 294.
- Keszler A., Zhang Y., Hogg N. (2010): Reaction between nitric oxide, glutathione, and oxygen in the presence and absence of protein: how are S-nitrosothiols formed? *Free Radical Biology and Medicine* **48**, 55–64.
- Kim Y. M., Talanian R. V., Billiar T. R. (1997): Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 31138 – 31148.
- Klepper L. (1979): Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment* **13**, 537–542.
- Kneeshaw S. G., Tada Y., Loake G. J., Spoel H. (2014): Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates. *Plant Immunity Sophie Molecular Cell* **56**, 153–162.
- Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirat Y., Nagano T. (1998): Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry* **70**, 2446 – 2453.
- Kone B. C., Kunczewicz T., Zhang W., Yu Z. Y. (2003): Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **285**, F178 – F190.
- Kong J., Dong Y., Song Y., Bai X., Tian X., Xu L., Liu S., He Z. (2016): Role of Exogenous Nitric Oxide in Alleviating Iron Deficiency Stress of Peanut Seedlings (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Plant Growth and Regulation* **35**, 31–43.
- Kopyra M., Gwozdz E. A. (2003): Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 1011.
- Kovacs I., Lindermayr C. (2013): Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science* **4**, 137.
- Kranner I., Beckett R. P., Wornik S., Zorn M., Pfeifhofer H. W. (2002): Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *Plant Journal* **31**, 13 – 24.
- Kranner I., Birtic S., Anderson K. M., Pritchard H. W. (2006): Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death. *Free Radical Biology and Medicine* **40**, 2155 – 2165.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tache R., Luhová L., Barroso J. B., Petřivalský M. (2013a): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosoglutathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889 – 902.
- Kubienová L. (2013b): Studium produkce reaktivních forem dusíku a enzymů jejich metabolismu u rostlin. UP v Olomouci, *Disertační práce*, 11.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Mieslerová B., Petřivalský M. (2014): Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosoglutathione reductase in plants. *Planta* **239**, 139–146.
- Kwon E., Feechan A., Yun B. W., Hwang B. H., Pallas J. A., Kang J. G., Loake G. J. (2012): AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*. *Planta* **236**, 887–900.

- Lamotte O., Courtois C., Barnavon L., Pugin A., Wendehenne D. (2005): Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta* **221**, 1–4.
- Lancaster, J. R., Jr. (1997): A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide-Biology a chemistry* **1**, 18–30.
- 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*. *Plant Cell* **20**, 786 – 802.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J. M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2011): Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 789 – 793.
- Leterrier M., Airaki M., Palma J. M., Chaki M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2012a): Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environmental Pollution* **166**, 136 – 143.
- Leterrier M., Barroso J. B., Valderrama R., Palma J. M., Corpas F. J. (2012b): NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from *Arabidopsis* roots contributes in the mechanism of defence against the nitro-oxidative stress induced by salinity. *Scientific World-Journal* **2012**, 694-740.
- Leitner M., Vandelle E., Gaupels F., Bellin D., Delledonne M. (2009): NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 451 – 458.
- Liaudet L., Vassalli G., Pacher P. (2009): Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Frontiers in Bioscience* **14**, 4809 – 4814.
- Li X., Pan Y., Chang B., Wang Y., Tang Z. (2016): NO Promotes Seed Germination and Seedling Growth Under High Salt May Depend on EIN3 Protein in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1203.
- Lin C. C., Jih P. J., Lin H. H., Lin J. S., Chang L. L., Shen Y. H., Jeng S. T. (2011): Nitric oxide activates superoxide dismutase and ascorbate peroxidase to repress the cell death induced by wounding. *Plant Molecular Biology* **77**, 235–249.
- Lin A., Wang Y., Tang J., Xue P., Li C., Liu L., Hu B., Yang F., Loake G. J., Chu C. (2012): Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. *Plant Physiology* **158**, 451–464.
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J. (2005): Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**, 921–930.
- Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., Durner J. (2006): Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 4285 - 4291.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J. S. (2001): A metabolite enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490 – 494.
- Liu H. Y., Yu X., Cui D. Y., Sun M. H., Sun W. N., Tang Z. C. (2007): The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. *Cell Research* **17**, 638 – 649.
- Manai J., Gouiab H., Corpas F. J. (2014): Redox and nitric oxide homeostasis are affected in tomato (*Solanum lycopersicum*) roots under salinity-induced oxidative stress. *Journal of Plant Physiology* **171**, 1028–1035.
- Manjunatha G., Gupta K. J., Lokesh V., Mur L. A., Neelwarne B. (2012): Nitric oxide counters ethylene effects on ripening fruits. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 476–483.
- Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N. (2012): A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in Plant Science* **17**, 9–15.
- Martínez M. C., Achkor H., Persson B., Fernández M. R., Shafqat J., Farrés J., Jörnvall H., Parés X. (1996): *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase - Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class P and liver class I alcohol dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry* **241**, 849 – 857.
- Melo P. M., Silva L. S., Ribeiro I., Seabra A. R., Carvalho H. G. (2011): Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration. *Plant Physiology* **157**, 1505–1517.

- Mhamdi A., Hager J., Chaouch S., Queval G., Han Y., Tacconat L. (2010): *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiology* **153**, 1144–1160.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., van Breusegem F. (2011): ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* **16**, 300–309.
- Mittova V., Guy M., Tal M., Volokita M. (2002): Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Free Radical Research* **36**, 195–202.
- Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. (2003): Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell and Environment* **26**, 845–856.
- Mittova V., Guy M., Tal M., Volokita M. (2004): Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1105–1113.
- Mlíčková K., Luhová L., Lebeda A., Mieslerova B., Peč P. (2004): Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolyopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 753 – 761.
- Modolo L. V., Augusto O., Almeida I. M. G., Magalhaes J. R., Salgado I. (2005): Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Letters* **579**, 3814–3820.
- Molina A., Bueno P., Marín M. C., Rodríguez-Rosales M. P., Belver A., Venema K., Donaire J. P. (2002): Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New Phytologist* **156**, 409–415.
- Moore K. P., Mani A. R. (2002): Measurement of protein nitration and S-nitrosothiol formation in biology and medicine. In: *Methods in Enzymology* (Enrique Cadenas, Packer Lester, eds.), Academic Press, 256 – 268.
- Moro M. A., Darley-Usmar V. M., Goodwin D. A., Read N. G., Zamora-Pinot R., Feelisch M., Radomski M. W., Moncada S. (1994): Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **91**, 6702–6706.
- Morot-Gaudry-Talarmain Y., Rockel P., Moureaux T., Quillere I., Leydecker M. T., Kaiser W. M., Morot-Gaudry J. F. (2002): Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* **215**, 708–715.
- Mueller K., Linkies A., Vreeburg R. A., Fry S. C., Krieger-Liszlay A., Leubner-Metzger G. (2009): *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology* **150**, 1855–1865.
- Munns R. (2005): Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* **167**, 645–663.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assay with Tobago tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473 – 497.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hancock J. T. (2002): Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology* **128**, 13–16.
- Neill S. J., Desikan R., Hancock J. T. (2003): Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist* **159**, 11–35.
- Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J. (2008): Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **59**, 165–176.
- Noctor G., Foyer C. H. (1998): Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249–279.
- Noctor G. (2006): Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell and Environment* **29**, 409–425.

- Noctor G., Queval G., Gakière B. (2006): NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1603–1620.
- Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B. (2012): Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell and Environment* **35**, 454–484.
- Pagnussat G. C., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L. (2002): Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* **129**, 954–956.
- Parani M., Rudrabhatla S., Myers R., Weirich H., Smith B., Leaman D. W., Goldman S. L. (2004): Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* **2**, 359–366.
- Parihar P., Singh S., Singh R., Singh V. P., Prasad S. M. (2015): Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 4056–4075.
- Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005): Oxidative stress: Localisation of reactive oxygen species formation and degradation in plant tissue. *Chemické Listy* **99**, 455–466.
- Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008): Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chemické Listy* **102**, 410 – 416.
- Piterková J., Hofman J., Mieslerová B., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A., Petřivalský M. (2011): Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp. – *Oidium neolycopersici* interaction. *Environmental of Experimental Botany* **74**, 37 – 44.
- Piterková J., Luhová L., Hofman J., Turečková V., Novák O., Petřivalský M., Fellner M. (2012): Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany* **110**, 767-776.
- Pollak N., Dölle C., Ziegler M. (2007): The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochemical Journal* **402**, 205–218.
- Polverari A., Molesini B., Pezzotti M., Buonauro R., Marte M., Delledonne M. (2003): Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Microbe Interaction Journal* **16**, 1094–1105.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998): Klíčení semen. Fyziologie stresu. Fyziologie rostlin. *Academia Praha*, pp. 348 – 351, 412 – 414.
- Qu C., Liu C., Gong X., Li C., Hong M., Wang L., Hong F. (2012): Impairment of maize seedling photosynthesis caused by a combination of potassium deficiency and salt stress. *Environmental and Experimental Botany* **75**, 134–141.
- Queval G., Issakidis-Bourguet E., Hoeberichts F. A., Vandorpe M., Gakiere B., Vanacker H., Miginiac-Maslow M., Van Breusegem F., Noctor G. (2007): Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength dependent gene expression and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. *Plant Journal* **52**, 640 – 657.
- Radi R., Beckman J. S., Bush K. M., Freeman B. A. (1991a): Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 4244–4250.
- Radi R., Cassina A., Hodara R. (2002): Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biological Chemistry* **383**, 401–409.
- Radi R. (2013): Protein tyrosine nitration: Biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Accounts of Chemical Research* **46**, 550–559.
- Reynaert N. L., Ckless K., Korn S. H., Vos N., Guala A. S., Wouters E. F., van der Vliet A., Janssen-Heininger Y. M. (2004): Nitric oxide represses inhibitory κ B kinase through S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **101**, 8945 – 8950.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W. M. (2002): Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* **53**, 103–110.
- Romero-Puertas M. C., Corpas F. J., Sandalio L. M., Leterrier M., Rodríguez-Serrano M., del Río L. A., Palma J. M. (2006): Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytologist* **170**, 43–52.

- Romero-Puertas M. C., Laxa M., Matte` A., Zaninotto F., Finkemeier I., Jones A. M. E., Perazzolli M., Vandelle E., Dietz K. J., Delledonne M. (2007): S-Nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**, 4120–4130.
- Romero-Puertas M. C., Campostrini N., Matte` A., Righetti P. G., Perazzolli M., Zolla L., Roepstorff P., Delledonne M. (2008): Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**, 1459–1469.
- Rubbo H., Radi R. (2008): Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochimica et Biophysica Acta-general Subject* **1780**, 1318 – 1324.
- Rumer S., Gupta K. J., Kaiser W. M. (2009): Plant cells oxidase hydroxylamines to NO. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2065–2072.
- Rustérucchi C., Espunya M. C., Diaz M., Chabannes M., Martinez M. C. (2007): S-nitrosogluthathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology* **143**, 1282 – 1292.
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002): *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosogluthathione reductase. *FEBS Letters* **515**, 20 - 24.
- Sakamoto A., Tsukamoto S., Yamamoto H., Ueda-Hashimoto M., Takahashi M., Suzuki H., Morikawa H. (2003): Functional complementation in yeast reveals a - 72 - protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species. *Plant Journal* **33**, 841–851.
- Salgado I., Martínez M. C., Oliveira H. C., Frungillo L. (2013): Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate reductase and S-nitrosogluthathione reductase in stress-related responses. *Brazilian Journal of Botany* **36** (2), 89–98
- Saito S., Yamamoto-Katou A., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K. (2006): Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology*. **47**, 689–697.
- Sandalio L. M., Rodríguez-Serrano M., Gupta D. K., Archilla A., Romero-Puertas M. C., del Río L. A. (2012): Reactive oxygen species and nitric oxide in plants under cadmium stress: from toxicity to signaling. In: *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change*. (Ahmad P, Prasad MNV, eds.) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 199–215.
- Sanghani P. C., Stone C. L., Ray B. D., Pindel E. V., Hurley T. D., Bosron W. F. (2000): Kinetic mechanism of human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **39**, 10720 – 10729.
- Sanghani P. C., Robinson H., Bosron W. F., Hurley T. D. (2002): Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of Apo, Binary, and inhibitory ternary complexes. *Biochemistry* **41**, 10778 – 10786.
- Sanghani P. C., Robinson H., Bennett-Lovsey R., Hurley T. D., Bosron W. F. (2003): Structure-function relationships in human Class III alcohol dehydrogenase (formaldehyde dehydrogenase). *Chemico-Biological Interactions* **143**, 195 – 200.
- Sanghani P. C., Davis W. I., Fears S. L., Green S. L., Zhai L., Tang Y., Martin E., Bryan N. S., Sanghani S. P. (2009): Kinetic and cellular characterization of novel inhibitors of S-nitrosogluthathione reductase. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 24354 – 24362.
- Semchuk N. M., Vasylyk V., Kubrak O. I., Lushchak V. I. (2011): Effect of sodium nitroprusside and S-nitrosogluthathione on pigment content and antioxidant system of tocopherol-deficient plants of *Arabidopsis thaliana*. *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal* **83**, 69 – 79.
- Shafqat J., El-Ahmad M., Danielsson O., Martínez M. C., Persson B., Parés X. (1996): Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: Common derivation of the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol-active forms (classes I and P). *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **93**, 5595-5599.
- Shalata A., Mittova V., Volokit M., Guy M., Tal M. (2001): Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. *Physiology of Plant* **112**, 487–494.
- Shi J. H., Yang Z. B. (2011): Is ABP1 an auxin receptor yet? *Molecular Plant* **4**, 635–640.

- Shi Y. F., Wang D. L., Wang C., Culler A. H., Kreiser M. A., Suresh J., Cohen J. D., Pan J., Baker B., and Liu J. Z. (2015): Loss of GSNOR1 Function Leads to Compromised Auxin Signaling and Polar Auxin Transport. *Molecular Plant* **8**, 1350–1365.
- Shoulars K., Rodriguez M. A., Thompson T., Turk J., Crowley J., Markaverich B. M. (2008): Regulation of the nitric oxide pathway genes by tetrahydrofurandiols: microarray analysis of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett* **264**, 265–273.
- Sies H., Sharov V. S., Klotz L. O., Briviba K. (1997): Glutathione peroxidase proteus against peroxyxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxyxynitrite reductase. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 27812–27817.
- Smirnoff N. (2000): Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 229–235.
- Souza J. M., Peluffo G., Radi R. (2008): Protein tyrosine nitration - functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 357 – 366.
- Spadaro D., Yun B. W., Spoel S. H., Chu C., Wang Y. Q., Loake G. J. (2010): The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. *Physiology Plant* **138**, 360–371.
- Spoel S. H., Loake G. J. (2011): Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 358–364.
- Staab C. A., Alander J., Brandt M., Lengqvist J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2008a): Reduction of S-nitrosoglutathione by alcohol dehydrogenase 3 is facilitated by substrate alcohols via direct cofactor recycling and leads to GSH-controlled formation of glutathione transferase inhibitors. *Biochemical Journal* **413**, 493 – 504.
- Staab C. A., Hellgren M., Höög J. O. (2008b): Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3950 – 3960.
- Staab C. A., Alander J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2009): The Janus face of alcohol dehydrogenase 3. *Chemico-Biological Interactions* **178**, 29 – 35.
- Stämmler J. S., Singel D. J., Loscalzo J. (1992): Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**, 1898–1902.
- Stämmler J. S., Lamas S., Fang F. C. (2001): Nitrosylation: the prototypic redox-based, signaling mechanism. *Cell* **106**, 675–683.
- Stöhr C., Strube F., Marx G., Ullrich W. R., Rockel P. (2001): A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**, 835–841.
- Sun X., Wasley J. W., Qiu J., Blonder J. P., Stout A. M., Green L. S., Strong S. A., Colagiovanni D. B., Richards J. P., Mutka S. C., Chun L., Rosenthal G. J. (2011a): Discovery of S-nitrosoglutathione reductase inhibitors: Potential agents for the treatment of asthma and other inflammatory diseases. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2**, 5849 – 5853.
- Sun X., Qiu J., Strong S. A., Green L. S., Wasley J. W. F., Colagiovanni D. B., Mutka S. C., Blonder J. P., Stout A. M., Richards J. P., Chun L., Rosenthal G. J. (2011b): Structure-activity relationships of pyrrole based S-nitrosoglutathione reductase inhibitors: pyrrole regioisomers and propionic acid replacement, *Bioorg. ACS Medicinal Chemistry Letters* **21**, 3671 – 3675.
- Sun X., Qiu J., Strong S. A., Green L. S., Wasley J. W., Blonder J. P., Colagiovanni D. B., Mutka S. C., Stout A. M., Richards J. P., Rosenthal G. J. (2011c): Discovery of potent and novel S-nitrosoglutathione reductase inhibitors devoid of cytochrome P450 activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**, 5849–5853.
- Szabó C. (2003): Multiple pathways of peroxyxynitrite cytotoxicity. *Toxicology Letters* **140–141**, 105–112.
- Szabó C., Ischiropoulos H., Radi R. (2007) Peroxyxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **6**, 662–680.
- Tanou G., Molassiotis A., Diamantidis G. (2009): Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environmental and Experimental Botany* **65**, 270–281.

- Tanou G., Filippou P., Belghazi M., Job D., Diamantidis G., Fotopoulos V. (2012): Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *Plant Journal* **72**, 585–599.
- Tavakkoli E., Fatehi F., Coventry S., Rengasamy P., McDonald G. K. (2011): Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2189–2203
- Terrile M. C., Tonón C. V., Iglesias M. J., Lamattina L., Casalongué C. A. (2010): Extracellular ATP and nitric oxide signaling pathways regulate redox-dependent responses associated to root hair growth in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *Plant Signaling & Behavior* **5**, 698–701.
- Terrile M. C., París R., Caldero'n-Villalobos L. I., Iglesias M. J., Lamattina L., Estelle M., Casalongué C. A. (2012): Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the *Arabidopsis* TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *Plant Journal* **70**, 492–500.
- Thomas D. D., Miranda K. M., Colton C. A., Citrin D., Espey M. G., Wink D. A. (2003): Heme proteins and nitric oxide (NO): The neglected, eloquent chemistry in NO redox signaling and regulation *Antioxidants & Redox Signaling* **5**, 307–317.
- Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P., Lebeda A. (2006): Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiology of Molecular Plant Pathology* **68**, 22 – 32.
- Tonón C., Terrile M. C., Iglesias M. J., Lamattina L., Casalongue C. (2010): Extracellular ATP, nitric oxide and superoxide act coordinately to regulate hypocotyl growth in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Physiology* **167**, 540 – 546.
- Tun N. N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E. I. S., Scherer G. F. E. (2006): Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiological* **47**, 346–354.
- Turko I. V., Murad F. (2002): Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacological Reviews* **54**, 619 – 634.
- Uotila L., Koivusalo M. (1979): Purification of formaldehyde and formate dehydrogenase from pea seeds by affinity chromatography and S-formylglutathione as the intermediate of formaldehyde metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **196**, 33–45.
- Valderrama R., Corpas F. J., Carreras A., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Luque F., Gómez-Rodríguez M. V., Colmenero-Varea P., Del Río L. A., Barroso J. B. (2007): Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* **581**, 453–461.
- Vernoux T., Wilson R. C., Seeley K. A., Reichheld J. P., Muroy S., Brown S., Maughan S. C., Cobbett C. S., Vanontagu M., Inzé D., May M. J., Sung Z. R. (2000): The root meristemless1/cadmium sensitive Gene Defines a Glutathione-Dependent Pathway Involved in Initiation and Maintenance of Cell Division during Postembryonic Root Development. *Plant Cell* **12**, 97 – 109.
- Virag L., Szabo E., Gergely P., Szabo C. (2003): Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicology Letters*. **140–141**, 113–124.
- Wang E. Q., Lee W. I., Brazeau D., Fung H. L. (2002): cDNA microarray analysis of vascular gene expression after nitric oxide donor infusions in rats: implications for nitrate tolerance mechanisms. *AAPS PharmSciTech Journal* **4**, E10.
- Wang Y. Q., Yun B. W., Kwon E., Hong J. K., Yoon J., Loake G. J. (2006): S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1777 – 1784.
- Wang P., Du Y., Li Y., Ren D., Song C. P. (2010): Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 2981–2998.
- Wang P., Du Y., Hou Y. J., Zhao Y., Hsu C. C., Yuan F. (2015): Nitric oxide negatively regulates abscisic acid signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **112**, 613–618.
- Wendehenne D., Hancock J. T. (2011): New frontiers in nitric oxide biology in plant. *Plant Science* **181**, 507–508.

- White P. J., Charbonneau A., Cooney G. J., Marette A. (2010): Nitrosative modifications of protein and lipid signaling molecules by reactive nitrogen species. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **299**, 868 – 878.
- Wiki Skripta Page: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Warburgův_optický_test (15. 3. 2016).
- Wilson I. D., Neill S. J., Hancock J. T. (2008): Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell and Environment* **31**, 622–631.
- Wippermann U., Fliegmann J., Bauw G., Langebartels C., Maier K., Sandermann H. Jr. (1999): Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase: Protein sequence and catalytic properties. *Planta* **208**, 12-18.
- Wu T. M., Lin W. R., Kao Y. T., Hsu Y. T., Yeh C. H., Hong C. Y., Kao C. H. (2013): Identification and characterization of a novel chloroplast/mitochondria co-localized glutathione reductase 3 involved in salt stress response in rice. *Plant Molecular Biology* **83**, 379–390.
- Wulff A., Oliveira H. C., Saviani E. E., Salgado I. (2009): Nitrite reduction and superoxide-dependent nitric oxide degradation by *Arabidopsis* mitochondria: influence of external NAD(P)H dehydrogenases and alternative oxidase in the control of nitric oxide levels. *Nitric Oxide – Biology and chemistry* **21**, 132–139.
- Xu S., Guerra D., Lee U., Vierling E. (2013): S-nitrosoglutathione reductases are low-copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **4**, 430.
- Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S. (1999): An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science* **4**, 128–129.
- Yang H., Mu J., Chen L., Feng J., Hu J., Li L. (2015): S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiology* **167**, 1604–1615.
- Yin H., Chen Q., Yi M. (2008): Effects of short-term heat stress on oxidative damage and responses of antioxidant system in *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regulation* **54**, 45–54.
- Yu M., Lamattina L., Spoel S. H., Loake G. J. (2014): Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist* **202**, 1142–1156.
- Yun B. W., Feechan A., Yin M., Saidi N. B., Le Bihan T., Yu M., Moore J. W., Kang J. G., Kwon E., Spoel S. H. (2011): S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264–268.
- Zago E., Morsa S., Dat J. F., Alard P., Ferrarini A., Inze´ D., Delledonne M., Van Breusegem F. (2006): Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiology* **141**, 404 – 411.
- Zandonadi D. B., Santos M. P., Dobbss L. B., Olivares F. L., Canellas L. P., Binzel M. L., Okorokova-Facanha A. L., Facanha A. R. (2010): Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta* **231**, 1026 – 1035.
- Zechmann B., Koffler B. E., Russell S. D. (2011): Glutathione synthesis is essential for pollen germination in vitro. *BMC Plant Biology* **11**, 54.
- Zhang Y. Y., Wang L. L., Liu Y. L., Zhang Q., Wei Q. P., Zhang W. H. (2006): Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast, *Planta* **224**, 545-555.
- Zhu J. K. (2003): Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 441–445.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA/BIS	Akrylamid- <i>N,N</i> -bisakrylamid
ABP1	Auxin-vázající protein 1
ACC	1- aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
ACO	ACC oxidasa
ACS	ACC synthasa
ADH (1,3)	Alkoholdehydrogenasa (třídy 1,3)
anti-GSNO	Protilátka proti GSNO
AP	Alkalická fosfatasa
APX1	Askorbátperoxidasa 1
APS	Persíran amonný
APF	Aminofenylfluorescein
Arg	L-arginin
AsA	Kyselina askorbová
AtGSNOR	GSNOR z <i>Arabidopsis thaliana</i>
AUX	Auxin
BoGSNOR	GSNOR z <i>Botritis synerea</i>
BSA	Hovězí sérový albumin
CAT	Katalasa
CcOx	Cytochrom <i>c</i> oxidasa
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
Cl ⁻	Chloridový anion
CO ₃ ⁻ ·	Uhličitanový radikál
Cys	Cystein
DAF-FM DA	Diaminofluorescein diacetát
DHAR	Dehydroaskorbátreduktasa
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
eNOS	Endotelová synthasa NO
FAD	Oxidovaný flavinadenindinukleotid
FALDH	Glutation-dependentní formaldehyddehydrogenasa
Fe ²⁺	Železnatý kation
FMN	Flavinmononukleotid
Glu	Glutamát
GPx	Glutathionperoxidasa
GPX	Guajakolperoxidasa
GS	Glutaminsynthetasa
GSH	Glutathion
GSSH	Oxidovaný glutathion
GSNHOH	S-hydroxylaminoglutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSO ₂ H	Kyselina sulfinová
GSONH ₂	Glutathion-sulfinamid
GSSG	Glutathion-disulfid
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
Hb	Hemoglobin
Hcy	Homocystein
hGSNOR	Lidská GSNOR

HMGSH	S-(hydroxymethyl) glutathion
HNO ₂	Kyselina dusitá
HR	Hypersenzitivní reakce
IAA	Indol-3-octová kyselina
iNOS	Indubcilní synthasa NO
JA	Kyselina jasmonová
LsGSNOR	GSNOR z <i>Lactuca sativum</i>
MACC	1- malonylaminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
MAP kinasa	Mitogen aktivovaná proteinkinasa
MAT1	Methioninadenosyltransferasa1
MDAR	Monodehydroaskorbátreduktasa
METsynthasa	Methionsynthasa
Met	Methionin
Na ⁺	Sodný kation
NAD ⁺	Oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Redukovaný nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NaCl	Chlorid sodný
NH ₂ OH	Hydroxylamin
NH ₃	Amoniak
NH ₄ ⁺	Amonný kation
Ni-NOR	Nitrit:NO oxidoreduktasa
NiR	Nitritreduktasa
nitro-Tyr	Nitrotyrosin
nNOS	Neuronová synthasa NO
NO ⁻	Nabitý nitroxyl
NO	Oxid dusnatý
NO ⁺	Nitrosoniový ion
NO ₂ ⁻	Dusitanový anion, nitrit
NO ₂	Oxid dusičitý
NO ₂ Cl	Nitrylchlorid
NO ₃ ⁻	Dusičnanový anion, nitrát
NO ₃ ⁻ ·	Dusičnanový radikál
NOS	NO-synthasa
NPR1	NON-EXRESSER OF PATHOGENESIS-RELATED GENE 1
NR	Nitrátreduktasa
N ₂ O ₃	Oxid dusitý
N ₂ O ₄	Dimer oxidu dusičitého
O ₂	Kyslík
O ₂ ⁻	Superoxidový anion
ONOOH	Kyselina peroxynitritová
ONOO ⁻	Peroxynitrit
P	Protein
PCD	Programovaná buněčná smrt
PHGPx	Fosfolipidhydroperoxid-glutathionperoxidasa
PMSF	Fenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidasa
Prx	Peroxiredoxiny
PSII	Fotosystém II

PTIO	2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl 3-oxid
RAC/ROPs	Rho GTPasa
RBOHD	Respiratory burst oxidase homolog D
RHS	Redukovaný thiol
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RS •	Thylový radikál
RSNO(s)	S-nitrosothiol(y)
SA	Kyselina salicylová
SABP3	SA- vazebný protein 3
SAHasa	Adenosylhomocysteinasa
SAM	S-adenosylmethionin
sGC	solubilní guanilátcyklasa
SIGSNOR	GSNOR ze <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Amateur
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamin
SNP	Nitroprussid sodný
SOD	Superoxiddismutasa
TF	Transkripční faktor
TiR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
TRX <i>h5</i>	Thioredoxin <i>h5</i>