

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku  
při působení teplotního stresu u rajčete Micro-Tom**

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	<b>Bc. Kateřina Marková</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Tereza Tichá</b>
Rok:	2017

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a 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. Byl/a jsem seznámen/a 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 ...

### **Poděkování**

Děkuji své školitelce Mgr. Tereze Tiché z Katedry biochemie PřF UP za ochotu a trpělivost při odborném vedení a konzultacích a také za poskytnutí potřebných materiálů pro vypracování teoretické i experimentální části této práce.

Velké poděkování patří doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za odborné konzultace a Mgr. Lucii Činčalové, Ph.D. za pomoc při vypracování experimentální části. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Věře Zoubkové za přípravu rostlinného materiálu.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Kateřina Marková
Název práce	Studium produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku při působení teplotního stresu u kultivaru rajčete Micro-Tom
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Tereza Tichá
Rok obhajoby práce	2017

### Abstrakt

V rámci reakce rostliny na teplotní stres (TS) dochází k indukci obranných mechanismů zprostředkovaných signálními molekulami, z nichž společně s reaktivními formami kyslíku (ROS) mají nezastupitelnou roli také reaktivní formy dusíku (RNS). ROS i RNS mohou přímo aktivovat signální kaskády vedoucí k obranné odpovědi nebo prostřednictvím posttranslačních modifikací, kdy dochází k regulaci aktivity enzymů zapojených do odpovědi na stresové podmínky.

Cílem této práce bylo sledování vlivu TS (2 h inkubace při 40 °C, 45 °C a 50 °C) na obrannou reakci kultivaru rajčete *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, kdy byla sledována produkce ROS, RNS i proteinových S-nitrosothiolů (RSNO). Byly sledovány změny aktivity a exprese S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR), enzymu zapojeném do katabolismu RNS. Dále byla studována aktivita a exprese enzymu s antioxidační aktivitou, askorbátperoxidasy (APX) a enzymu oxidačního vzplanutí, NADPH oxidasy. Vlivem TS došlo k intenzivní produkci ROS i NO a nárůstu hladiny RSNO. TS inicioval zvýšení aktivity i exprese NADPH oxidasy a naopak, aktivita a exprese APX byly významně sníženy, což poukazuje na indukci oxidativního stresu vyvolaného působením vysokých teplot. Aktivita GSNOR byla významně zvýšená zejména při vyšších teplotách (45 °C a 50 °C), v pozdějších stádiích obranné reakce se snižovala. K nárůstu exprese *GSNOR* došlo 2 h po ukončení TS při 40 a 45 °C. V případě TS při 50 °C byla exprese *GSNOR* zvýšená v čase 3 h po ukončení TS. V rané fázi obranné reakce 2 h po ukončení TS došlo k intenzivnímu nárůstu hladiny Hsp70, molekulárních chaperonů, které se mohou podílet na ochraně buněk před oxidativním poškozením.

**Klíčová slova** Teplotní stres, heat shock proteiny, reaktivní formy kyslíku, reaktivní formy dusíku, oxid dusnatý, S-nitrosylace, S-nitrosothioly, S-nitrosoglutathionreduktasa, askorbátperoxidasa, NADPH oxidasa

Počet stran	77
Počet příloh	0
Jazyk	Český



## Bibliographical identification

Author's first name and surname Bc. Kateřina Marková

Title Study of reactive oxygen and nitrogen species during the temperature stress in tomato cultivar Micro-Tom

Type of thesis Master

Department Department of Biochemistry

Supervisor Mgr. Tereza Tichá

The year of presentation 2017

### Abstract

The reaction of plants to temperature stress (TS) induces defence mechanisms mediated by signal molecules. Reactive oxygen species (ROS) together with reactive nitrogen species (RNS) play an irreplaceable role in these processes. ROS and RNS can directly activate signaling cascades leading to a defence response or through post-translational modifications that regulate the activity of enzymes involved in responding to stress conditions.

The aim of this work was to monitor the effect of TS (2 h incubation at 40 °C, 45 °C and 50 °C) on the defensive reaction of tomato cultivar *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, where production of ROS, RNS and protein S-nitrosothiols (RSNO) was measured. Changes in the activity and expression of S-nitrosogluthione reductase (GSNOR), an enzyme involved in catabolism of RNS, were monitored. Furthermore, the activity and expression of the enzyme with antioxidant activity, ascorbate peroxidase (APX) and the enzyme causing oxidative burst, NADPH oxidase, were studied. TS evocated intensive production of ROS, NO and RSNOs. Moreover, TS induced an increase in NADPH oxidase activity and expression. On the other hand, APX activity and expression was significantly reduced, indicating the induction of oxidative stress. GSNOR activity was significantly increased especially at higher temperatures (45 °C and 50 °C), and declined in the later defence stages. The increase in *GSNOR* expression occurred 2 h after TS termination at 40 and 45 °C. For TS at 50 °C, *GSNOR* expression was increased at 3 h after TS termination. In early phase of defence reaction (2 h after TS termination), an intensive increase in Hsp70 levels was observed. Hsp70 are molecular chaperones, which may be involved in cell protection from oxidative damage.

Keywords Heat stress, heat shock proteins, reactive oxygen species, reactive nitrogen species, nitric oxide, S-Nitrosylation, S-Nitrosogluthione reductase, S-Nitrosothiols, ascorbate peroxidase, NADPH oxidase

Number of pages 77

Number of appendices 0

Language Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	<b>2</b>
2.1	Teplotní stres	2
2.1.1.	Heat shock proteiny	3
2.1.2	Produkce ROS a RNS během teplotního stresu	5
2.1.3	Antioxidační systémy v rostlinné buňce	10
2.1.4	Degradace NO	11
2.2	Askorbátperoxidasa - klíčový enzym askorbát-glutathionového cyklu	13
2.3	NADPH oxidasa – klíčový enzym oxidativního vzplanutí	15
2.4	Posttranslační modifikace proteinů zprostředkované RNS	16
2.4.1	S-nitrosylace	17
2.4.1.1	Mechanismus tvorby S-nitrosothiolů a jejich odbourávání	18
2.4.1.2	Biologický význam a lokalizace S-nitrosothiolů u rostlin	20
2.4.1.3	Regulace metabolických drah prostřednictvím S-nitrosylace	22
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>24</b>
3.1	Materiál a přístroje	24
3.1.1	Chemikálie	24
3.1.2	Přístroje a vybavení	25
3.2	Biologický materiál	25
3.2.1	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom	25
3.2.2	Teplotní stres	26
3.3	Experimentální metody	27
3.3.1	Stanovení aktivity GSNOR	27
3.3.2	Stanovení aktivity APX	27
3.3.3	Stanovení aktivity NADPH oxidasy	28
3.3.4	Stanovení obsahu S-nitrosothiolů	29
3.3.5	Stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové	30
3.3.6	Detekce Hsp70 metodou Western blot	30
3.3.7	Stanovení exprese <i>GSNOR</i> , <i>APX</i> a <i>NADPH oxidasy</i>	32
3.3.7.1	Izolace a purifikace RNA	32
3.3.7.2	Měření koncentrace vyizolované RNA	33
3.3.7.3	Reverzní transkripce	33
3.3.7.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	34
3.3.7.5	Agarosová elektroforéza	34
3.3.8	Imunolokalizace GSNOR v příčných řezech listu	35
3.3.9	Lokalizace ROS, NO a RSNO	36
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>39</b>
4.1	Spektrofotometrické měření aktivity enzymů zapojených do metabolismu RNS a ROS	39
4.1.1	Aktivita GSNOR	39
4.1.2	Aktivita APX	40
4.1.3	Aktivita NADPH oxidasy	41
4.2	Expres genů zapojených do metabolismu RNS a ROS	42
4.2.1	Expres <i>GSNOR</i>	42
4.2.2	Expres <i>APX</i>	43
4.2.3	Expres <i>NADPH oxidasy</i>	44

.3	Stanovení RSNO	46
4.4	Mikroskopická detekce GSNOR, RSNO, NO a ROS	46
4.4.1	Imunohistochemická detekce GSNOR	47
4.4.2	Lokalizace RSNO	49
4.4.3	Lokalizace NO	51
4.4.4	Lokalizace ROS	52
4.5	Detekce Hsp70	54
<b>5</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ</b>	<b>74</b>

## CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo zpracování literární rešerše zaměřené na úlohu heat shock proteinů, reaktivních forem kyslíku a dusíku při působení teplotního stresu se zaměřením na klíčové enzymy zapojené v mechanismech oxidativního stresu. Dále byly zpracovány poznatky týkající se S-nitrosylace a jejího významu v regulaci metabolických drah u rostlin.

V experimentální části bylo cílem studium produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku v obranné reakci u kultivaru rajčete Micro-Tom vystavenému teplotnímu stresu.

1. Histochemická detekce ROS, NO, RSNO a imunolokalizace GSNOR v příčných řezech listů
2. Stanovení aktivity a exprese GSNOR, APX, NADPH oxidasy
3. Sledování hladiny proteinových S-nitrosothiolů

# 1 Úvod

Růst a vývoj rostlin je závislý na vnějších podmínkách. Nepříznivé environmentální podmínky, které lze označit jako stresové faktory neboli stresory, vyvolávají v rostlinách dynamický komplex reakcí - stres. Mohou v rostlinné buňce zpomalovat životní funkce nebo vyvolat buněčnou smrt, která může vést k poškození pletiv případně celé rostliny. Stresové faktory mohou být abiotické (fyzikální, chemické nebo mechanické) nebo biotické (např. napadení patogeny) povahy. Jedním z klíčových abiotických stresorů je zvýšená teplota. Aktivace obranných mechanismů závisí na intenzitě teplotního stresu, době jeho působení a samozřejmě na schopnostech rostliny aktivovat příslušné procesy, které rostlině umožní přežít. V aktivaci obranných mechanismů je zapojena řada signálních molekul. Zásadní roli mají reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS).

ROS, jako je singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ), peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoxidový anion ( $\text{O}_2^-$ ), hydroxylový anion ( $\text{OH}^-$ ), hydroxylový radikál ( $\text{OH}^\cdot$ ) a perhydroxylový radikál ( $^{\cdot}\text{O}_2\text{H}$ ), vznikají za katalýzy enzymů NADPH oxidasy, peroxidasy (POX), aminoxidasy, oxalát oxidasy, xanthin oxidasy nebo flavin oxidasy a naopak jejich hladina je regulována superoxid dismutasou, askorbát peroxidasou, glutathion peroxidasou popřípadě katalasou (Groß *et al.*, 2013). Významným zástupcem RNS je oxid dusnatý (NO), který vzniká enzymově například aktivitou nitrit:NO oxidoreduktasy, nitrát reduktasy či NO-synthasy. RNS i ROS jsou produkovány jak za fyziologických podmínek, tak ve zvýšené míře po vystavení rostlin působení stresových faktorů. Jsou zapojeny v signálních drahách za fyziologických podmínek např. při regulaci růstu a vývoje rostliny a také v rámci regulace obranných reakcí rostlin.

Regulace RNS je často spojena s procesem nitrace nebo S-nitrosylace proteinů. Interakcí NO s thiolovou skupinou zbytků aminokyselin v proteinech nebo peptidech vznikají tzv. S-nitrosothioly (RSNO) (Hoffmann *et al.*, 2003). Jedním z významných zástupců S-nitrosothiolů je S-nitrosoglutathion (GSNO), který slouží jako zásobárna NO v buňce a podílí se na transportu NO *in vivo* (Gaston *et al.*, 2003). Proces S-nitrosylace patří mezi významné posttranslační modifikace proteinů, kterými je regulována aktivita řady rostlinných proteinů zapojených do obranných reakcí. Významnou roli má S-nitrosylace při regulaci aktivity enzymů účastnících se metabolismu při tvorbě nebo odbourávání ROS. S-nitrosylace se podílí významně

na snížení aktivity NADPH oxidasy, enzymu produkujícího superoxidový radikál (Yun *et al.*, 2011). Naopak aktivita askorbátperoxidasy (APX), enzymu, který se účastní degradace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se prostřednictvím této modifikace zvyšuje (Begara-Morales *et al.*, 2013). Metabolismus ROS a RNS jsou vzájemně propojeny a regulovány.

## **2 Současný stav řešené problematiky**

### **2.1 Teplotní stres**

Mezi významné abiotické stresové faktory patří vedle chladu, sucha, zasolení, přítomnosti těžkých kovů i zvýšení teploty (Krasensky & Jonak, 2012). Rostliny jsou schopny vnímat velmi přesně i malé změny teplot. V průběhu některých vývojových pochodů mohou být rozpoznány i změny teplot o 1 °C (Penfield, 2008). Ačkoli pylová zrna některých druhů mohou snést až 70 °C a suchá semena dokonce až 120 °C, hydratované vegetativní buňky jsou k vyšším teplotám citlivější. Většinu vyšších rostlin poškodí již teploty nad 45 °C (Taiz & Zeiger, 2006).

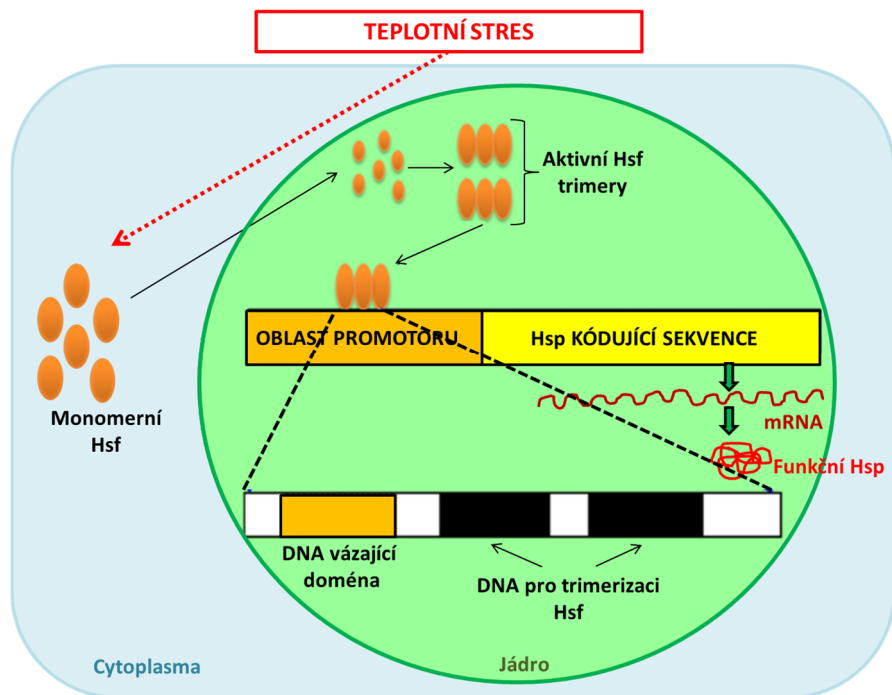
U rostlin je obranná odpověď na teplotní stres evolučně zachována (Fu *et al.*, 2002). V těchto procesech hraje velkou roli biosyntéza, transport a odbourávání ROS a RNS. Tyto mechanismy poté vedou k ochraně buněk před poškozením, obnově fyziologických funkcí nebo potenciálnímu zisku termotolerance. Tolerance je schopnost rostliny přizpůsobit se změně podmínek. Pokud se tolerance na daný podnět zvyšuje, dochází k aklimatizaci rostliny (Lin *et al.*, 1984). Na vzniku termotolerance se podílí proteinová homeostáze zabezpečená chaperoniny, které kontrolují ochranu proteinů před denaturací, jejich skládání a translokaci. Dále pak tvorba molekul pro osmoprotekci a detoxifikaci buněk. Mezi takové molekuly řadíme osmolyty jako aminokyseliny, polyaminy nebo cukry a sekundární metabolity jako flavoproteiny, karotenoidy a xantofyly (Hartl *et al.*, 2011). Rostliny mají zachováno asi 300 genů, které mohou za stresových podmínek tvořit makromolekuly zapojené do ochrany a opravy buněk (Kültz, 2005). Během teplotního stresu dochází ke změnám v metabolismu a struktuře buněk. Průduchy jsou uzavírány, snižuje se intenzita fotosyntézy a zvyšuje se intenzita buněčného dýchání. Nezanedbatelná část energie je při stresových podmínkách tvořena štěpením škrobů v mitochondriích (Rizhsky *et al.*,

2002). Kromě změny akumulace některých metabolitů dochází k nadprodukcí reaktivních forem kyslíku i dusíku. Celkově se indukce těchto změn ve fyziologii buňky označuje jako heat shock odpověď (HSR). V průběhu HSR dochází k indukci exprese a akumulaci specifické skupiny proteinů nazývaných heat shock proteiny (Hsp) (Vierling *et al.*, 1991).

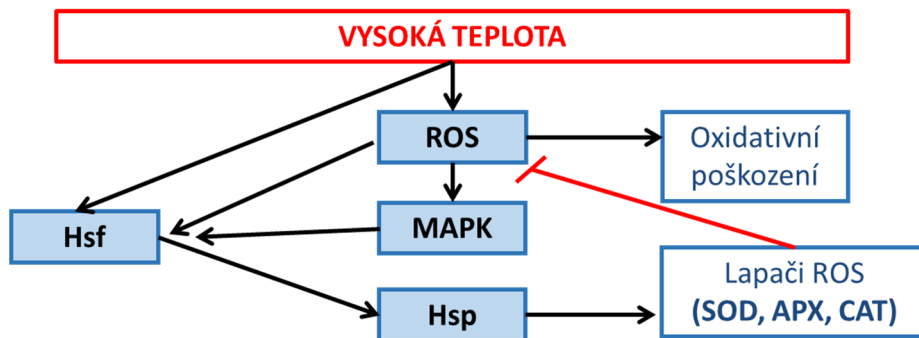
### **2.1.1 Heat shock proteiny**

Heat shock proteiny (Hsp) fungují jako tzv. molekulární chaperoniny, které jsou důležité při posttranslačním skládání proteinů. Dále mohou stimulovat opravné mechanismy, částečně se podílí na translokaci a dopravě nestabilních proteinů určených pro degradaci v lysosomech nebo proteasomech (Zhang *et al.*, 2005). Hsp jsou schopny rozpoznat nestabilní nebo inaktivní proteiny a interagovat s nimi.

Velká část Hsp se v buňce exprimuje konstitutivně v nízkých hladinách, avšak v některých vývojových stádiích a při působení stresorů dochází k jejich intenzivnější expresi. Exprese Hsp je primárně regulovaná na úrovni transkripce tzv. heat shock faktorů (Hsf) (Mishra *et al.*, 2002) (Obr. 1). Tyto faktory jsou lokalizovány v cytosolu, kde tvoří trimery, fosforylují se a poté jsou translokovány do jádra. V jádře se Hsf váží na konkrétní části promotoru v genu kódující Hsp a indukují tak jejich expresi (Morimoto *et al.*, 1992). Významnou roli v regulaci produkce Hsp hraje ROS (Obr. 2).



Obr. 1 Schématický diagram ukazující regulační mechanismy Hsp. Teplotní stres (TS) působící na buňku iniciuje přesun Hsf z cytoplasmy do jádra. V jádře pak monomerní jednotky tvoří aktivní trimery, které se mohou vázat na oblast promotoru genu kódující Hsp. Oblast promotoru, na kterou se váží Hsf, se skládá z jedné DNA-vázající domény a dvou domén pro trimerizaci Hsf. Úspěšná transkripce, translace a následná posttranslační modifikace produkují funkční Hsp, které se poté podílí na ochraně buněk před vysokými teplotami (převzato z Hasanuzzaman *et al.*, 2013).



Obr. 2 Model propojení mezi Hsf, Hsp a ROS v odezvě na TS. Vysoká teplota stimuluje tvorbu ROS, což může vést v kritických případech až k oxidativnímu poškození buňky. Transkripce Hsf je přímo aktivována teplotou, nebo zvýšenou hladinou ROS, a to buď přímou cestou nebo přes dráhu mitogenem aktivovaných protein kinas (MAPK). Hsf iniciují expresi genu pro Hsp, jehož vysoká hladina může pozitivně regulovat aktivitu antioxidantních enzymů (převzato z Driedonks *et al.*, 2015).

Hsp jsou klasifikovány do pěti hlavních tříd v závislosti na jejich molekulové hmotnosti, malé Hsp (s velikostí mezi 15-30 kDa), Hsp60, Hsp70, Hsp90 a Hsp100



(Wang *et al.*, 2004). Jednotlivé třídy mohou být dále rozděleny na podtřídy v závislosti na jejich intracelulární lokalizaci nebo funkci.

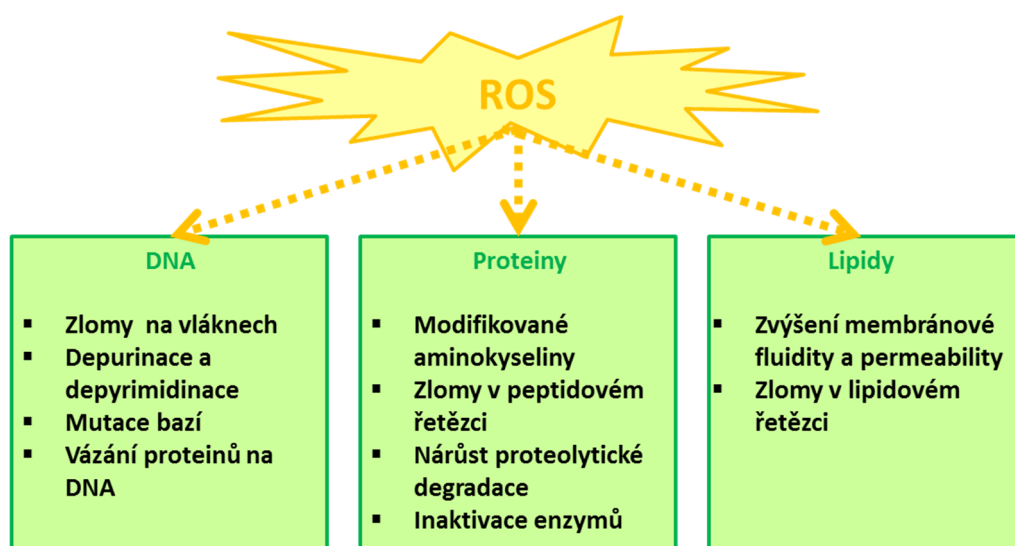
Nejvýznamnější skupina rostlinných Hsp proteinů, která je indukována TS, jsou Hsp70. Podílí se na translaci a translokaci proteinů, dále na jejich skládání, potlačení agregace nebo renaturaci proteinů (Zhang *et al.*, 2005). Tato skupina proteinů má velký vliv na získání termotolerance a ochranu buněk před oxidativním stresem (Vierling *et al.*, 1991; Banzet *et al.*, 1998). V buňkách jsou lokalizované v cytosolu, endoplasmatickém retikulu, mitochondriích, chloroplastech a peroxisomech spolu s ko-chaperoniny Hsp40 a GrpE (Vierling *et al.*, 1991; Boston *et al.*, 1996; Bukau & Horwich, 1998). Skutečnost, že Hsp70 hrají roli v ochraně buněk, byla prokázána u mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana*, kterým byla zamezena exprese genu pro Hsp70. Tyto rostliny poté vykazovaly vyšší senzitivitu vůči vysokým teplotám (Cho & Choi, 2009). U většiny rostlin dochází k akumulaci Hsp70 inkubací při 37-45 °C a u některých druhů se hladina Hsp70 zvyšuje i po inkubaci v chladových podmínkách (Li *et al.*, 1999).

### **2.1.2 Produkce ROS a RNS během teplotního stresu**

Pro přežití rostlin v neustále se měnících environmentálních podmínkách je nutná okamžitá odpověď na působení stresových faktorů, která je aktivovaná na základě rychlé intenzivní tvorby signálních molekul. Na přenosu informace o působení stresoru se významně podílí reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) (Molassiotis *et al.*, 2011; Valderrama *et al.*, 2007).

Obecně můžeme říci, že ROS jsou molekuly, které vznikají neúplnou redukcí molekulárního kyslíku. Zařazujeme mezi ně singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ), peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoxidový anion ( $\text{O}_2^-$ ), hydroxylový anion ( $\text{OH}^-$ ), hydroxylový radikál ( $\text{OH}^\cdot$ ) a perhydroxylový radikál ( $\text{O}_2\text{H}^\cdot$ ). Vysoká toxicita těchto molekul může v buňce způsobit oxidační stres. ROS jsou velmi reaktivní molekuly a mají krátký poločas rozpadu. Tyto vlastnosti umožňují zapojení ROS do mnoha buněčných procesů. ROS hrají důležitou roli ve vývoji rostliny, účastní se hormonální signalizace, odpovědi na stresové faktory a programované buněčné smrti (Farnese *et al.*, 2010).

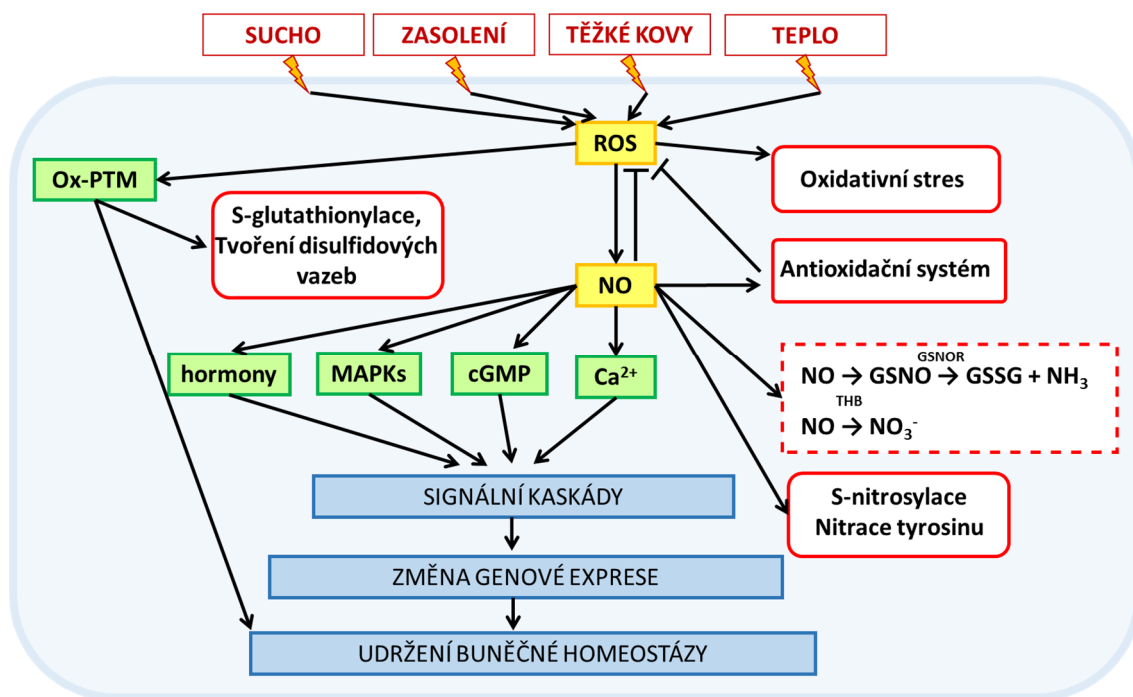
RNS jsou sloučeniny odvozené od NO, který se vyskytuje ve formě volného radikálu ( $\cdot\text{NO}$ ), redukovaného nitroxylového aniontu ( $\text{NO}^-$ ) nebo oxidovaného nitrosoniového kationtu ( $\text{NO}^+$ ). Dále mezi RNS patří oxid dusný ( $\text{N}_2\text{O}$ ), oxid dusitý ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), oxid dusičitý ( $\text{NO}_2$ ), dusitanový aniont ( $\text{NO}_2^-$ ), dusičnanový aniont ( $\text{NO}_3^-$ ), peroxydusitan ( $\text{ONOO}^-$ ), peroxydusičnan ( $\text{O}_2\text{NOO}^-$ ) a nitrosoperoxokarbonát ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ). Od molekuly NO jsou také odvozeny S-nitrosothioly (RSNO), které tvoří další významnou zásobu RNS v buňkách (Hill *et al.*, 2010). Významnou roli v regulaci buněčných procesů má zejména NO. Jedná se o malou, plynnou, reaktivní molekulu, která snadno difunduje do intercelulárního prostoru, kde může interagovat s řadou sloučenin (Correa-Aragunde *et al.*, 2015) (Obr. 3).



Obr. 3 ROS způsobují poškození biomolekul. Cílem mohou být nukleové kyseliny, proteiny i lipidy (převzato z Das & Roychoudhury, 2014).

ROS a RNS jsou vysoce reaktivní molekuly, které mohou ovlivňovat redoxní rovnováhu buňky a tak, vedle své signální funkce, se mohou podílet na vzniku tzv. oxidativního nebo nitrosativního stresu vedoucího k poškození buněčné struktury (Demidchik *et al.*, 2015). V současné době je známo, že ROS i RNS samostatně nebo po vzájemné interakci, se účastní široké škály fyziologických i patologických procesů buňky, zahrnujících odpovědi na biotický i abiotický stres, růst, klíčení nebo kvetení (Joudoi *et al.*, 2013; Asai *et al.*, 2008; El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 1998). V průběhu odpovědi na stresové podmínky se v rostlinné buňce

rapidně mění redoxní stav. Dochází k nárůstu hladiny ROS a NO a ovlivnění aktivity antioxidantních enzymů, které v případě aktivace mohou regulovat hladinu ROS. Následně dochází k zesílení signálu aktivací druhých posílů ( $\text{Ca}^{2+}$ , cGMP), případně přes mitogenem aktivovaných proteinkinasy (MAPKs) a produkci hormonů (del Rio, 2015) (Obr. 4).



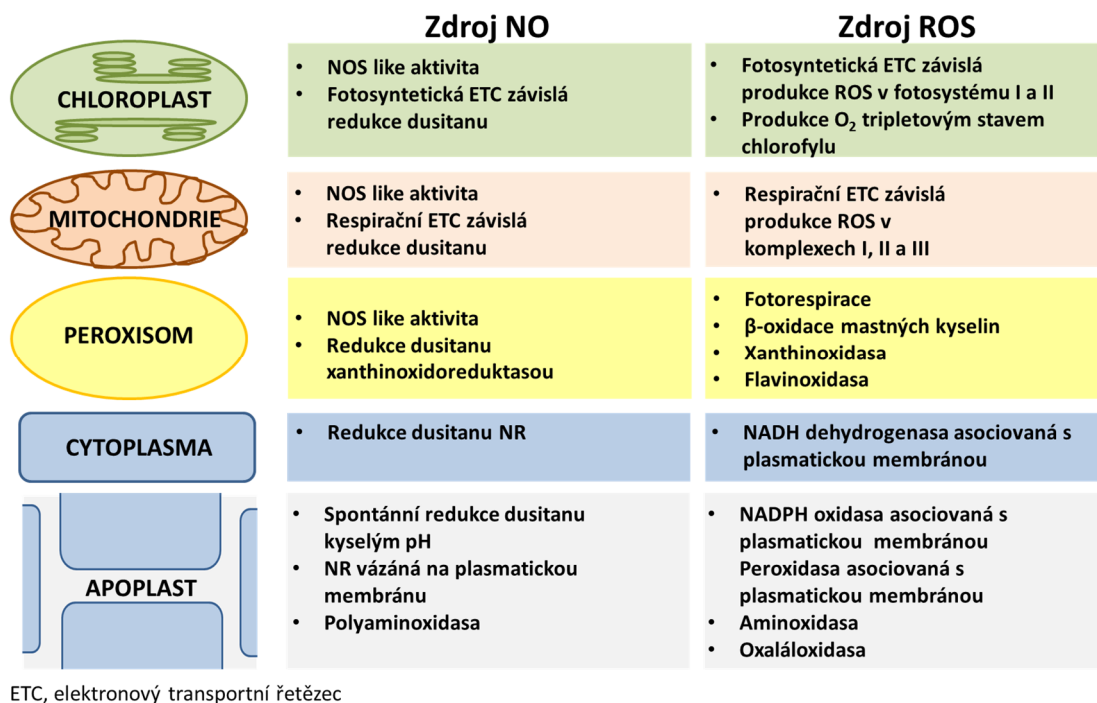
Obr. 4 Schématické znázornění interakcí mezi NO, ROS a dalšími signálními molekulami v reakci na abiotický stres. Signální molekuly zahrnují hormony, mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK), cyklický guanosin monofosfát (cGMP) a vápenaté ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ). NO a ROS také přenášejí signály přes posttranslační modifikace jako je nitrace tyrosinu, S-nitrosylace nebo oxidační posttranslační modifikace (Ox-PTM). ROS mohou být degradovány antioxidantními systémy. S-nitrosylací glutathionu vzniká S-nitrosoglutathion (GSNO), jehož hladina je regulována S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR) (převzato z Farnese *et al.*, 2016).

Enzymy zapojené do syntézy ROS a NO byly nalezeny v několika buněčných kompartmentech (Obr. 5). Jejich lokalizace je klíčová pro signalizační funkci (Groß *et al.*, 2013, Farnese *et al.*, 2016). ROS jsou z velké části, v důsledku působení stresových faktorů, produkovány v plasmatické membráně působením enzymů z rodiny NADPH oxidas (EC 1.6.3.1; Jajic *et al.*, 2015; Kwak *et al.*, 2003; Lamb & Dixon, 1997; Wang *et al.*, 2015). Jedná se o transmembránový protein využívající NADPH produkovaný v cytoplasmě katalyzující vznik  $\text{O}_2^-$  v apoplastu (Das & Roychoudhury,

2014). Na tvorbě ROS se v apoplastu podílejí další enzymy s oxidasovou a peroxidasou aktivitou (peroxidasa asociovaná s buněčnou stěnou, aminooxidasa, oxalát oxidasa) (Das & Roychoudhury, 2014). Na akumulaci ROS se dále podílí enzymové systémy lokalizované v chloroplastech, mitochondriích či peroxisomech. Chloroplasty jsou významným zdrojem ROS v průběhu transportu elektronů během fotosyntézy. ROS se uvolňují z molekuly kyslíku ve fotosystému II (Gupta & Igamberdiev, 2015). V mitochondriích dochází k tvorbě ROS, pokud přechod elektronů v dýchacím řetězci přesahuje kapacitu alternativních oxidas a cytochrom oxidas. Přebytečné elektrony jsou odstraněny především v komplexu I a III přechodem na molekulu kyslíku. Další organelou, kde se v průběhu stresových podmínek syntetizují ROS, jsou peroxisomy. Generuje se zde  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  v rámci metabolické aktivity zahrnující fotorespiraci, glyoxylátový cyklus nebo  $\beta$ -oxidaci (Tripathy & Oelmüller, 2012).

Ačkoli mechanismus tvorby NO stále není u rostlin zcela objasněn, bylo navrženo a potvrzeno několik enzymových a neenzymových drah produkce této aktivní molekuly. Jednou z možností jsou reduktivní procesy, které zahrnují aktivitu xanthinoxidoreduktasy (XOD, EC 1.1.3.22) v peroxisomech (Millar *et al.*, 1998) nebo nitrit:NO oxidoreduktasy (NiNOR, EC 1.7.1.1) v plasmatické membráně (Stöhr *et al.*, 2001). Oxidativní procesy jsou zprostředkovány hydroxylaminy a polyaminy (Rümer *et al.*, 2009; Filippou *et al.*, 2013). Významným zdrojem NO v rostlinách je cytosolární enzym nitrát reduktasa (NR, EC 1.6.6.1). Je esenciální pro asimilaci dusíku v rostlinné buňce a podílí se na produkci NO v řadě fyziologických procesů, ke kterým patří například tvorba květů nebo laterálních kořenů či ochrana před patogeny (Igamberdiev & Hill *et al.*, 2004; Mur *et al.*, 2013; Seligman *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2009). Za normálních růstových podmínek NR upřednostňuje redukci dusičnanu ( $NO_3^-$ ) na dusitan ( $NO_2^-$ ), kdy významnější množství NO je tvořeno pouze za anaerobních podmínek nebo vysoké hladině dusitanů (Mur *et al.*, 2013). Enzymem produkujícím NO by mohla být dále NO-synthasa (NOS, EC 1.14.13.39) oxidující L-arginin za tvorby L-citrulinu a NO. Tento enzym byl dosud charakterizován pouze v živočišných buňkách (Knowles & Moncada, 1994). Ačkoli v rostlinných buňkách nebyl nalezen protein nebo cDNA homologní s živočišnou NOS (Zemojtel *et al.*, 2006; Foresi *et al.*, 2010), byla v rostlinných extraktech pozorována enzymová tzv. NOS-like aktivita (Corpas *et al.*, 2009; Corpas & Barroso *et al.*, 2014). V rostlinné říši byla sekvence podobná NOS identifikována pouze u zelených řas (Foresi *et al.*, 2010). Transkriptomická studie asi

1000 rostlinných druhů potvrdila, že rostliny produkují NO odlišným mechanismem než živočichové (Jeandroz *et al.*, 2016).



Obr. 5 Lokalizace zdrojů NO a ROS v rostlinné buňce (převzato z Groß *et al.*, 2013).

ROS i RNS patří mezi velmi reaktivní a kromě interakcí s jinými molekulami mohou reagovat také mezi sebou. Vzájemná interakce může mít vliv na výslednou koncentraci a modifikuje signální funkce reakčních partnerů. Reakce mezi RNS a ROS jsou znázorněny v Tab. 1.

Tab. 1 Reakční stechiometrie mezi RNS a ROS (převzato z Groß *et al.*, 2013).

Reakční stechiometrie	Literatura
$\cdot\text{NO} + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{ONOO}^- + 2 \cdot\text{H}$	Beligni & Lamattina <i>et al.</i> , 2002
$\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$	Miyamoto <i>et al.</i> , 2009
$2 \text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2$	Moller <i>et al.</i> , 2007
$\text{NO}_2 + \text{NO} \leftrightarrow \text{N}_2\text{O}_3$	Moller <i>et al.</i> , 2007
$\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{NO}_2^- + 2 \text{H}^+$	Moller <i>et al.</i> , 2007
$\text{ONOOH} \rightarrow \text{ONOO}^- + \text{H}^+$ (ionizace)	Koppenol <i>et al.</i> , 2012
$\text{ONOOH} \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}^+$ (izomerace)	Koppenol <i>et al.</i> , 2012
$\text{ONOOH} \rightarrow \text{NO}_2 + \text{HO}$ (homolýza)	Koppenol <i>et al.</i> , 2012
$\text{ONOO}^- \rightarrow \text{NO} + \text{O}_2^-$ (homolýza)	Koppenol <i>et al.</i> , 2012
$\text{O}_2\text{NOO}^- \leftrightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2^-$ (homolýza)	Gupta <i>et al.</i> , 2009
$\text{ONOOH} + \text{ONOO}^- \rightarrow \text{O}_2\text{NOO}^- + \text{NO}_2^- + \cdot\text{H}$	Gupta <i>et al.</i> , 2009

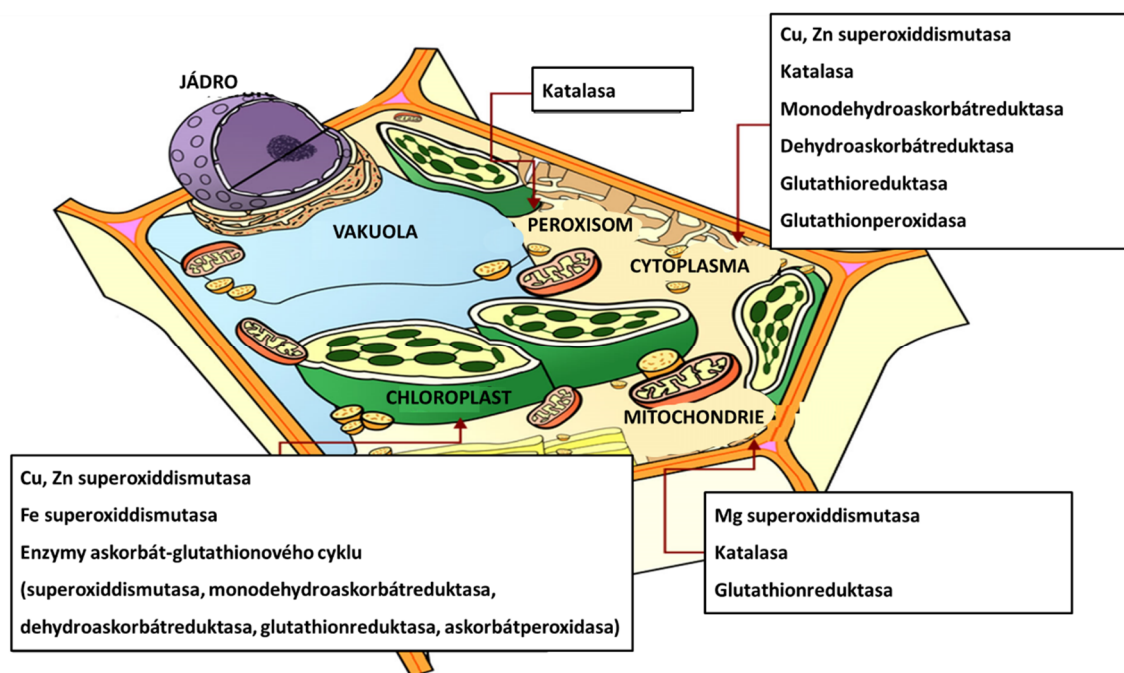
### 2.1.3 Antioxidační systémy v rostlinné buňce

Hladina ROS je regulována zapojením antioxidačních mechanismů probíhajících enzymatickou i neenzymatickou cestou (Tab. 2).

Tab 2. Enzymatické a neenzymatické antioxidanty, jejich funkce a lokalizace v rostlinné buňce (převzato z Das & Roychoudhury, 2014).

Enzymový antioxidant	EC	Katalyzovaná reakce	Subcelulární lokalizace
SOD	1.15.1.1	$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	Peroxisom, mitochondrie, cytosol, chloroplast
CAT	1.11.1.6	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	Peroxisom, mitochondrie
APX	1.11.1.11	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AA} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{DHA}$	Peroxisom, mitochondrie, cytosol, chloroplast
MDHAR	1.6.5.4	$2\text{MDHA} + \text{NADH} \rightarrow 2\text{AA} + \text{NAD}^+$	Mitochondrie, cytosol, chloroplast
DHAR	1.8.5.1	$\text{DHA} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{AA} + \text{GSSG}$	Mitochondrie, cytosol, chloroplast
GR	1.6.4.2	$\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$	Mitochondrie, cytosol, chloroplast
Neenzymový antioxidant	Funkce	Subcelulární lokalizace	
K. askorbová (AsA)	Detoxifikace $\text{H}_2\text{O}_2$ prostřednictvím APX	Cytosol, chloroplast mitochondrie, peroxisom, vakuola, apoplast	
Glutathion (GSH)	Detoxifikační ko-substrát pro peroxidy, GR, GST	Cytosol, chloroplast mitochondrie, peroxisom, vakuola, apoplast	
$\alpha$ -tokoferol	Detoxifikuje a chrání proti produktům membránové oxidace lipidů	Membrány	
Karotenoidy	Zháší nadbytek energie z fotosystémů	Chloroplast a jiné plastidy	
Flavonoidy	Přímo vychytává $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{O}_2^{\cdot-}$ a $\text{OH}\cdot$	Vakuola	
Prolin	Efektivní lapač $\text{O}_2^{\cdot-}$ a $\text{OH}\cdot$ ,	Mitochondrie, cytosol, chloroplast	

Mezi enzymy s antioxidační aktivitou patří superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11), glutathionperoxidasa (GPX, EC 1.11.1.9) a katalasa (CAT, EC 1.11.1.6) (Lázaro *et al.*, 2013) (Obr. 6, Tab 1). Na udržování hladiny ROS mají vliv nízkomolekulární antioxidační sloučeniny, jako je např. glutathion, askorbát nebo tokoferol (del Río, 2015). Antioxidační enzymy jsou přítomné v různých částech rostlinné buňky. Rozdílná lokalizace těchto enzymů zabezpečuje specifitu degradace ROS v konkrétních místech buňky (Obr. 6).

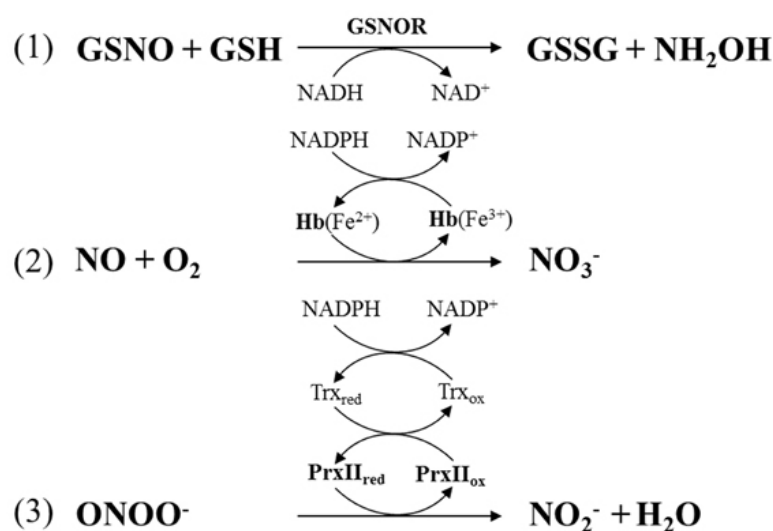


Obr. 6 Subcelulární lokalizace antioxidačních enzymů. Antioxidační enzymy jsou lokalizovány v cytoplasmě, peroxisomech, chloroplastech a mitochondriích pro dosažení místně specifického vychytávání ROS (převzato z Baek & Skinner, 2012).

#### 2.1.4 Degradace NO

NO může být eliminován interakcí s kovy, S-nitrosylací cysteinových residuí peptidů nebo proteinů. V reakci NO s  $O_2^{\cdot -}$  vzniká ONOO<sup>-</sup> a může docházet k nitraci tyrosinových residuí (Freschi *et al.*, 2013). S-nitrosylací GSH vzniká poměrně stálá molekula GSNO, která může sloužit v buňce jako zásobárna NO (Letierrier *et al.*, 2011). GSNO může být transportován floémem, což umožňuje signalizaci na dlouhé vzdálenosti (Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2014). Hladina GSNO v buňce je regulována enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR, EC 1.1.1.284), která katalyzuje

deaminaci GSNO za tvorby oxidované formy glutathionu (GSSG) a  $\text{NH}_3$  (Obr. 7). GSNOR se podílí na udržování celkové homeostázy NO v buňce a je tak esenciální pro přechodnou buněčnou signalizaci (Malik *et al.*, 2011). Množství enzymu GSNOR a jeho aktivita se vlivem stresových podmínek mění a je velkou mírou závislá na rovnováze mezi ROS a RNS (Yang *et al.*, 2015). Další možností modulace hladiny NO je prostřednictvím rostlinných hemoglobinů (Hb). První třída této skupiny enzymů (Hb1) katalyzuje přeměnu NO na  $\text{NO}_3^-$ . Tímto mechanismem může být ovlivněn rostlinný růst, vývoj a odpověď na stres (Obr. 7) (Hill *et al.*, 2010). Hladina RNS je také regulována činností thiol-dependentních peroxidas. Takovým enzymem je například peroxiredoxin IIE (PrxIIE) z *A. thaliana*. PrxIIE katalyzuje redukci  $\text{ONOO}^-$  na  $\text{NO}_3^-$  (Obr. 7) (Sakamoto *et al.*, 2003).

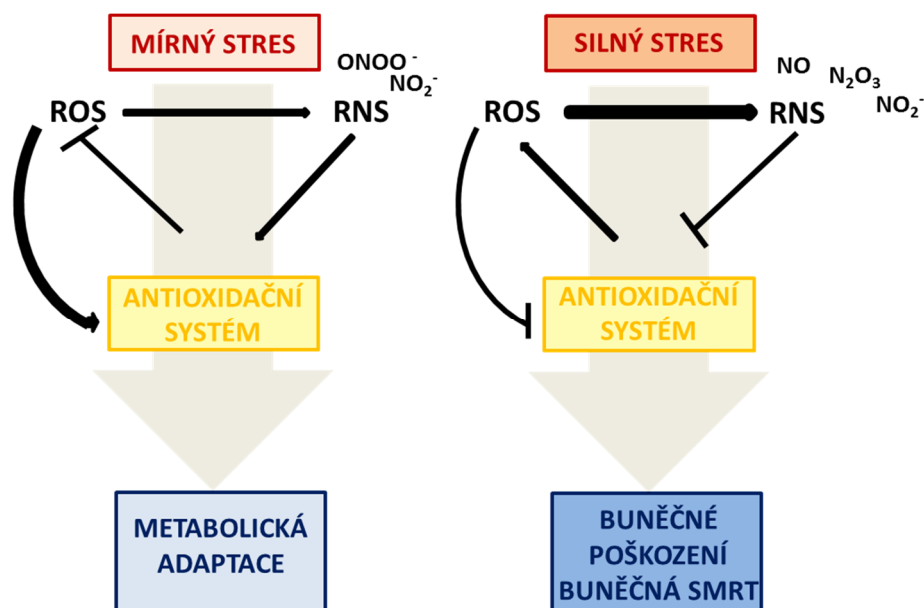


Obr. 7 Enzymatická regulace homeostázy NO prostřednictvím S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) (1), hemoglobinů (Hb) (2) a peroxiredoxinu IIE (PrxIIE) (3) (převzato z Groß *et al.*, 2013).

Proces produkce a degradace ROS a RNS spolu úzce souvisí a dochází k jejich vzájemnému ovlivnění. ROS mohou iniciovat syntézu NO v odpovědích na abiotický stres. Hladina NO má vliv např. na aktivitu NADPH oxidasy a APX, ovlivňuje tedy hladinu ROS v buňce (Groß *et al.*, 2013). Bylo prokázáno, že přidavek NO zvýšil aktivitu také SOD a CAT (Saxena & Shekhawat, 2013; Hasanuzzaman & Fujita, 2013; Shi *et al.*, 2014). Naproti tomu, jiné studie poukazují na inhibiční efekt NO na buněčné antioxidační mechanismy (Obr. 8) (Marti *et al.*, 2013). Tyto zdánlivě protichůdné



výsledky mohou poukazovat na vliv hladiny NO na regulaci produkce či degradace ROS.

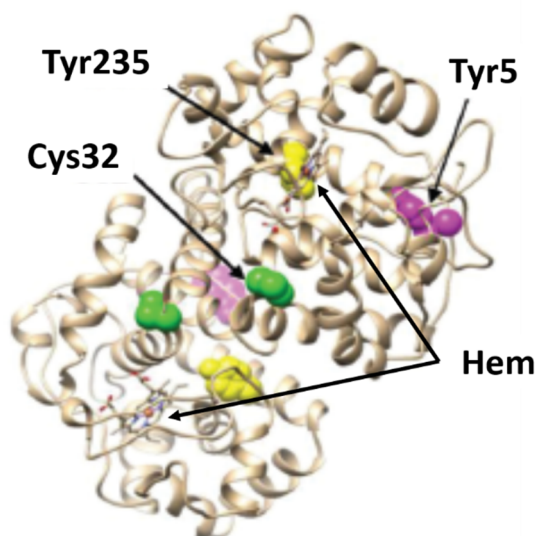


Obr. 8 Hypotetický model dynamických interakcí mezi NO, ROS a antioxidačními systémy v průběhu stresových podmínek. Mírné stresové podmínky způsobí nárůst hladiny ROS a NO. ROS indukuje syntézu NO a aktivuje antioxidační systém, který může pozitivně ovlivnit metabolickou adaptaci. Pokud je míra produkce ROS vyšší než produkce NO, dochází k oxidačním změnám NO a vytváří se RNS, které v buňce tvoří mírnější oxidativní stres. Silné stresové podmínky vedou k intenzivnímu oxidativnímu vzplanutí. Vysoké hladiny NO vedou k tvorbě N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a jiných RNS, které v buňce vytváří intenzivní nitrosativní stres. Za těchto podmínek ROS a RNS inhibují antioxidační systém a tím dochází k poškození buňky a v extrémním případě k buněčné smrti (převzato z Groß *et al.*, 2013).

## 2.2 Askorbátperoxidasa - klíčový enzym askorbát-glutathionového cyklu

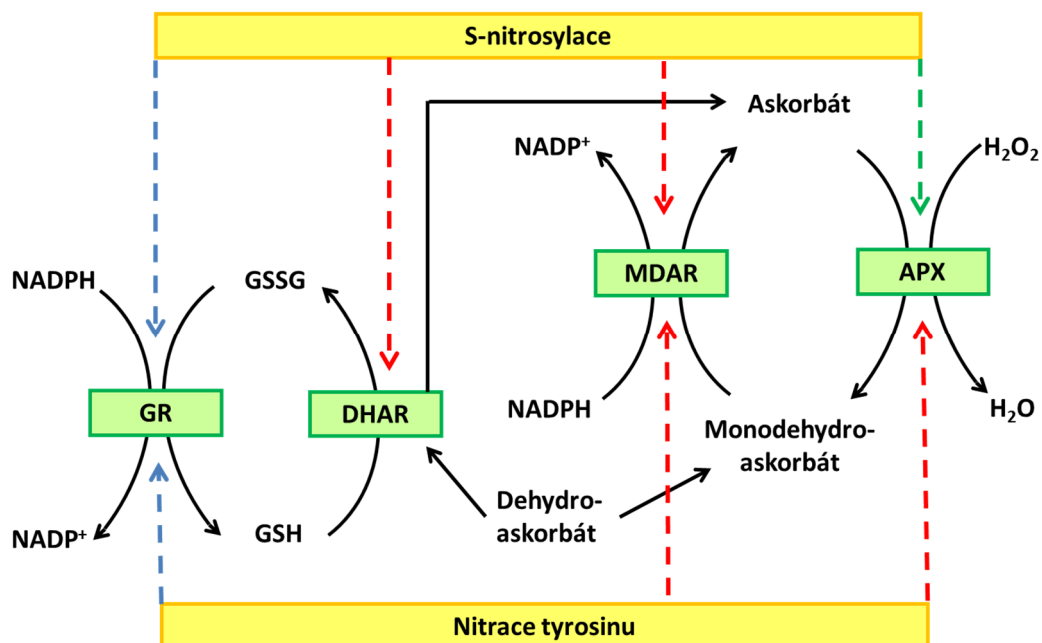
Askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11), která se významně podílí na rozkládání H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, spolu s glutathionreduktasou (GR, EC 1.6.4.2), monodehydroaskorbátreduktasou (MDAR, EC 1.6.5.4), dehydroaskorbátreduktasou (DHAR, EC 1.8.5.1) a antioxidačními metabolity Asa, GSH a NADPH tvoří askorbát-glutathionový cyklus neboli Foyer-Halliwell-Asadův cyklus, což je esenciální metabolická dráha regulující hladiny H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Obr. 9). APX má významnou roli v regulaci hladiny ROS v průběhu vývoje a zvláště při vystavení rostlin stresovým podmínkám. Systematický název tohoto enzymu je L-askorbát:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidoreduktasa. APX katalyzuje přenos elektronů z L-askorbátu na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za tvorby dehydroaskorbát a vody (Asada *et al.*, 1992). APX má několik izoenzymů, které se liší v závislosti na své buněčné lokalizaci. Mohou se

vyskytovat v cytosolu, chloroplastech, peroxisomech nebo mitochondriích (Shigeoka *et al.*, 2002). Ve své struktuře vždy obsahují hemovou skupinu, která umožní prvotní redukci peroxidu prostřednictvím oxidace atomu železa vázaného v hemu (Obr. 10). APX má homodimerní strukturu, oba monomery obsahují jednu skupinu hemu a jsou navzájem spojeny iontovými interakcemi (Patterson & Poulos, 1995).



Obr. 10 Struktura cytosolické APX z hrachu v rozlišení 2.2 Å. Šipkami jsou označena místa vázaných hemů, místa potenciální nitrace tyrosinových residuí a S-nitrosylace cysteinových residuí (převzato z Begara-Morales *et al.*, 2013),

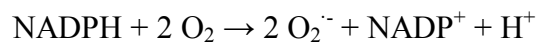
Posttranslační modifikace zprostředkované NO, jako je nitrace či S-nitrosylace, ovlivňují aktivitu APX a dalších enzymů askorbát-glutathionového cyklu (Lozano-Juste *et al.*, 2011; Fares *et al.*, 2011) a jsou pravděpodobným mechanismem regulace oxidativního stresu (Obr. 11) (Begara-Morales *et al.*, 2013).



Obr. 11 Schéma askorbát-glutathionového cyklu a NO-zprostředkovaných posttranslačních modifikací cílových enzymů. Aktivita APX je zvýšena S-nitrosylací a inhibována nitrací, aktivita MDAR je inhibována oběma modifikacemi, aktivita DHAR je inhibována pouze S-nitrosylací. Enzym GR není regulován žádnou z těchto modifikací. Červené šipky znázorňují inhibici, zelené zvýšení aktivity a modré žádnou změnu aktivity (upraveno podle Begara-Morales *et al.*, 2016).

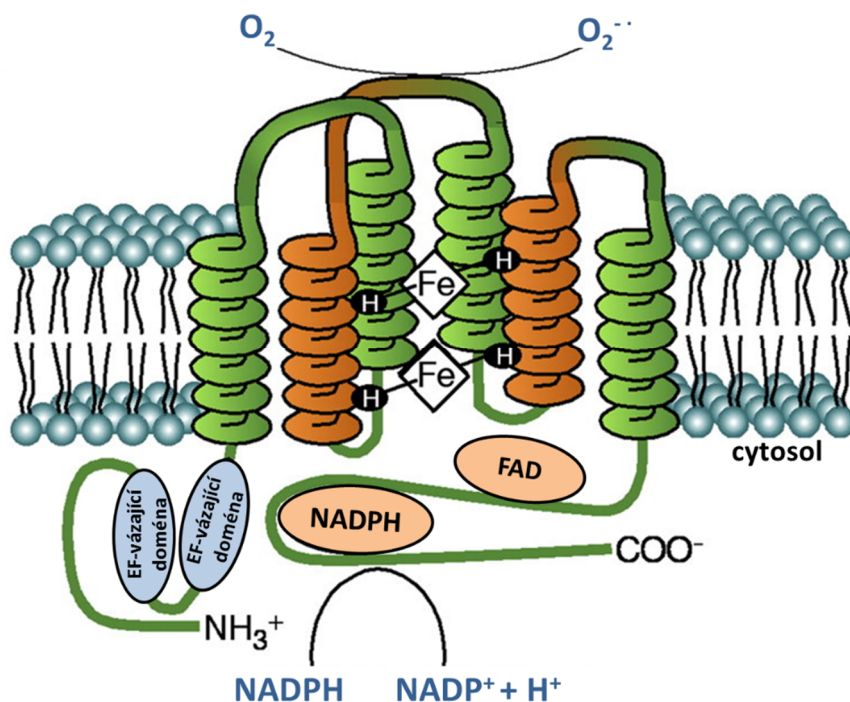
### 2.3 NADPH oxidasa – klíčový enzym oxidativního vzplanutí

Jedním z hlavních enzymů produkce ROS v rostlinné buňce je NADPH oxidasa (systematický název: NADPH:O<sub>2</sub> oxidoreduktasa, EC 1.6.3.1). Jedná se o enzymový komplex nacházející se v plasmatické membráně. Katalyzuje reakci, během které dochází k tvorbě superoxidového radikálu (Lamb & Dixon, 1997):



Rostlinné NADPH oxidasy patří do skupiny oxidas respiračního vzplanutí, v literatuře se proto setkáme i s označením jako Respiratory burst oxidase protein D (RbohD). Všechny NADPH oxidasy jsou vícesložkové komplexy tvořené šesti transmembránovými doménami (gp91, p67, p47, p40, p22 a Rac), obsahující domény s hemovou prosthetickou skupinou a domény vázající NADH a FAD. Navázaný FAD a atomy železa v molekule hemu umožňují přechod elektronů z NADPH na molekulu kyslíku (Obr. 12). Na vnějším povrchu plasmatické membrány dochází k uvolnění

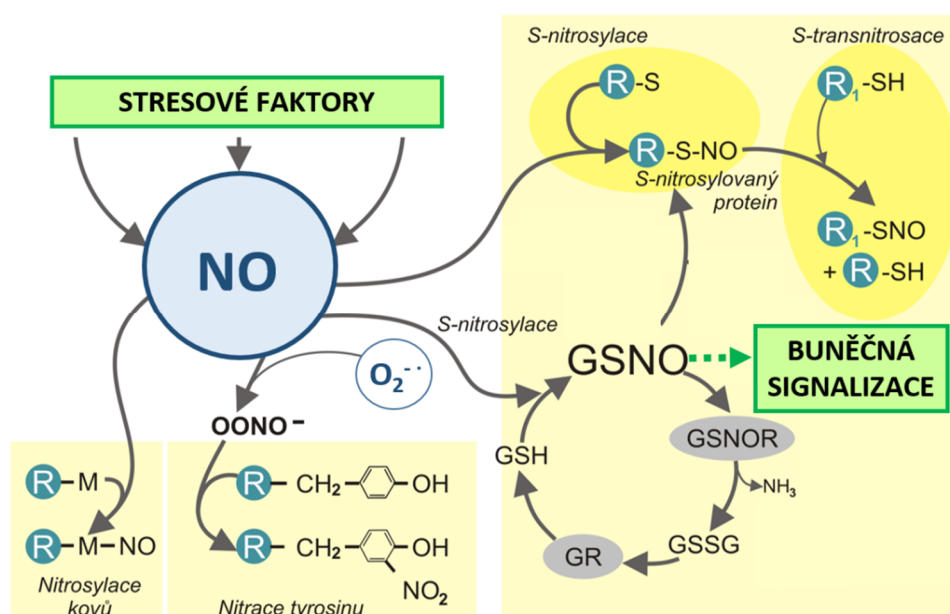
superoxidu, který následně dismutuje na peroxid vodíku spontánní cestou nebo pomocí SOD přítomné v apoplastu (Lamb & Dixon, 1997).



Obr. 12 Schématické znázornění struktury NADPH oxidasy nacházející se v plasmatické membráně. Enzym přenáší náboj z buněčného NADPH na molekulu  $O_2$  na vnější straně membrány. Na schématu jsou znázorněny domény vázající elongační faktory (EF) v blízkosti C-konce (převzato z Sagi & Fluhr, 2006).

## 2.4 Posttranslační modifikace proteinů zprostředkované RNS

Jedním z mechanismů buněčné signalizace jsou posttranslační modifikace cílových proteinů. Kromě modifikací jako je např. fosforylace, glykosylace, metylace, sulfatace nebo ubikvitinylace mohou proteiny interagovat i s RNS (Mann & Jensen, 2003). RNS se mohou vázat na kovová centra nebo na aminokyselinová residua proteinů. Nitrací tyrosinových residuí vzniká 3-nitrotyrosin, nitrací tryptofanu 6-nitrotryptofan a nitrosylací cysteinu S-nitrosocystein (Obr. 13) (Gow *et al.*, 2004).



Obr. 13 Posttranslační modifikace zprostředkované NO. Stresové faktory zvyšují produkci NO v buňce. NO se může dále podílet v procesech nitrosylace kovů, nitrace tyrosinových residuí a S-nitrosylace. Reakcí NO s cysteinovým residuem redukovaného glutathionu (GSH) vzniká stabilní S-nitrosoglutathion (GSNO), který dále může v buňce iniciovat signalizaci. S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) katabolizuje GSNO za vzniku glutathiondisulfidu (GSSG). GSSG je substrátem glutathionreduktasy (GR) a dochází k regeneraci redukovaného GSH. GSNO představuje nejvýznamnější nízkomolekulární RSNO a specificky reaguje s volnými sulfhydrylovými skupinami proteinů (tzv. S-transnitrosace) a umožňuje tak vznik vysokomolekulárních RSNO. Procesem S-transnitrosace si mohou NO skupinu předávat i jiné proteiny. S-nitrosylovaný protein (R-SNO) reaguje se sulfhydrylovou skupinou jiného proteinu (R<sub>1</sub>-SH) a vzniká S-nitrosylovaný protein R<sub>1</sub>-SNO (upraveno podle Corpas *et al.*, 2013 a Freschi *et al.*, 2013).

#### 2.4.1 S-nitrosylace

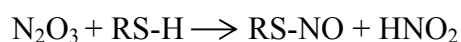
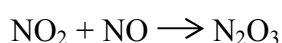
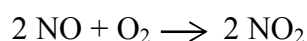
S-nitrosylace je reversibilní posttranslační modifikace proteinů zprostředkovaná NO. Na modifikovaných molekulách dochází k redoxním změnám, a proto je S-nitrosylace řazena do redoxních signálních drah, které se účastní řady buněčných procesů a regulace obranných mechanismů při vystavení rostliny biotickým i abiotickým stresovým faktorům (Gaston *et al.*, 2003).

Nitroso- skupina (-NO) se kovalentně váže na thiolovou skupinu (-SH) přítomnou v cysteinovém residuu daného proteinu a tvoří tak proteinové S-nitrosothioly (RSNO) (Hoffmann *et al.*, 2003). RSNO tvoří zásobní formu NO v buňce, umožňují jeho transport a tím i přenos informace na delší vzdálenost. Nejvíce zastoupeným nízkomolekulárním RSNO v buňkách je S-nitrosoglutathion (GSNO). Vzniká S-nitrosylací glutathionu (GSH), což je tripeptid složený z kyseliny glutamové, cysteinu

a glycinu. GSNO tvoří velkou část zásoby NO v buňce. Může být v okamžiku potřeby uvolněn nebo předán na thiolovou skupinu jiné molekuly. Přenos -NO skupiny z RSNO na jiný protein označujeme jako transnitrosační reakci (Lindermayr *et al.*, 2005) (Obr. 13).

#### 2.4.1.1 Mechanismus tvorby S-nitrosothiolů a jejich odbourávání

Ačkoli bylo navrženo několik mechanismů vzniku RSNO, stále není zcela jasné, který mechanismus převládá *in vivo*. Jeden z mechanismů je založen na vícestupňové tvorbě RSNO. V prvním kroku dochází tvorbě oxidu dusíku ve vyšším oxidačním stavu. Reakcí NO s O<sub>2</sub> se tvoří NO<sub>2</sub> a ten poté slouží jako akceptor elektronů. V následujícím kroku dochází k tvorbě nitrosačního činidla N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, které již může přímo interagovat s thiolovými residui za tvorby RS-NO (Kharitonov *et al.*, 1995). Rychlost S-nitrosylace však limituje především první a druhá reakce.

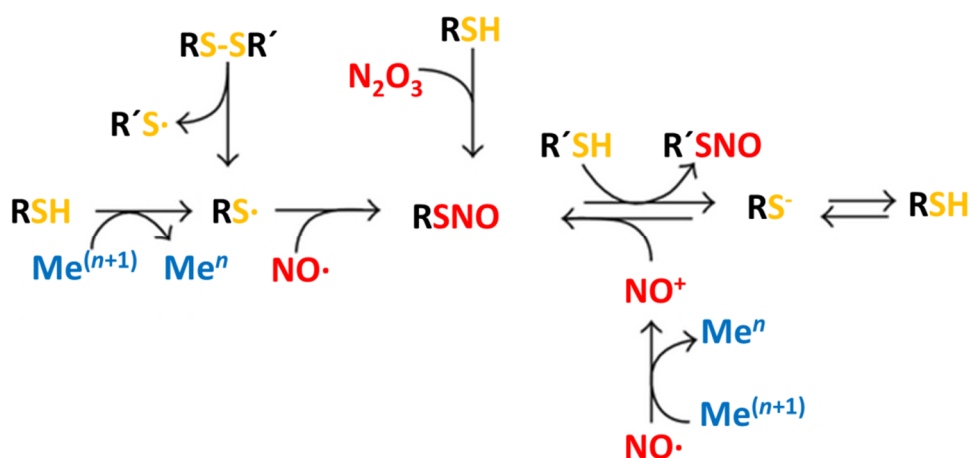


NO- skupina se také může vázat na thioly nitrosačním nebo nitrosylačním mechanismem. Jako nitrosační označujeme vytvoření kovalentní vazby mezi thiolem a NO<sup>+</sup> (Lancaster, 2008). Nitrosylační mechanismus je založen na koordinačně kovalentní vazbě thiolu s radikálem NO<sup>•</sup> (Gow *et al.*, 1997) (Obr. 14).

Stabilita vazby RS-NO je z velké části ovlivněna intracelulárními podmínkami. Stabilitu ovlivňuje pH, teplota, světelné podmínky, přítomnost O<sub>2</sub> či některých kationtů. Rozklad RSNO může probíhat homolytickou i heterolytickou cestou. Homolytická dráha je však energeticky výhodnější a je upřednostňována v živých systémech (Stamler & Toone, 2002). Homolytickým štěpením na ultrafialovém světle vznikají radikály NO<sup>•</sup> a RS<sup>•</sup> (Noble & Williams, 2000). RSNO se také rozkládají redukčním štěpením za přítomnosti kationtů, zejména měďných, stříbrných či rtuťnatých (Swift & Williams, 1997) (Obr. 14). Stabilitu RSNO také ovlivňuje redukční prostředí cytosolu. Hladina GSH v intracelulárním prostoru přímo ovlivňuje hladinu RSNO (Clementi *et al.*, 1998). Proto je pro zachování stability některých RSNO nutná ochrana před redukčním

prostředím uzavřením do váčku, hydrofobního obalu nebo začleněním do membrány (Rafikova *et al.*, 2002).

Zásobní a transportní funkce RSNO je dána jejich chemicko-fyzikálními vlastnostmi. Silně polární a stericky nechráněná vazba mezi atomem síry a -NO skupinou způsobuje jejich nestabilitu. RSNO tak mohou poměrně snadno uvolňovat NO nebo předávat -NO skupinu jiným molekulám v procesu transnitrosace (Shahani & Sawa, 2011). K přenosu -NO skupiny dochází po ataku atomu dusíku nukleofilním thiolátovým aniontem (Obr. 14) (Hogg, 1999).

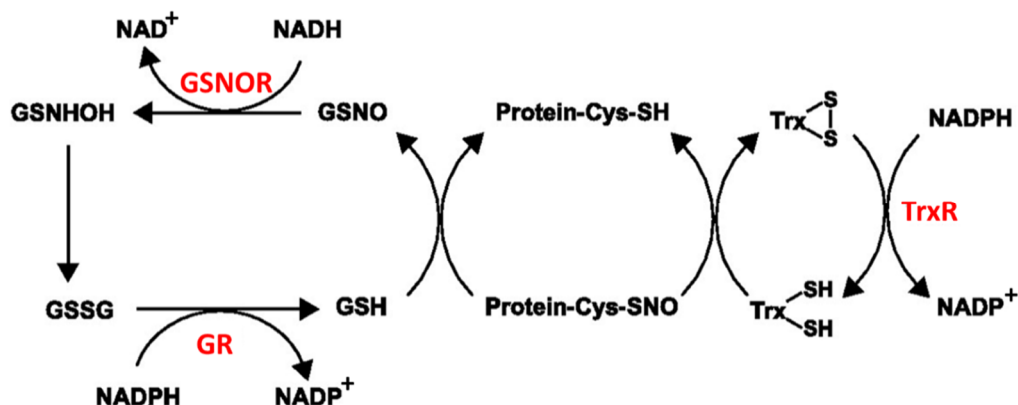


Obr. 14 Mechanismus S-nitrosylace. Proteiny se sulfhydrylovou skupinou (RSH) mohou podléhat S-nitrosylaci za vzniku S-nitrosothiolů (RSNO). Existuje několik možných reakčních mechanismů. Jedním je reakce radikálu NO· s thiolovým radikálem RS·. RS· vzniká kovem katalyzovanou oxidací RSH nebo homolytickým štěpením disulfidových můstků (RS-SR'). RSH může být také S-nitrosylován reakcí s  $N_2O_3$  nebo reakcí s  $NO^+$ , který vzniká kovem katalyzovanou oxidací NO·. Další reakcí produkující S-nitrosylované adukty je přenos  $NO^+$  z RSNO na R'S· (transnitrosylace) (převzato z Di Giacomo *et al.*, 2012).

Na regulaci hladiny RSNO se v buňkách podílí i enzymové systémy. Jedním z hlavních enzymů účastnících se katabolismu RSNO je S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR; EC 1.1.1.284), neboli glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa. Tento enzym katalyzuje degradaci GSNO, čímž snižuje nepřímou celkovou hladinu RSNO (Obr. 15). Za účasti NADH ireverzibilně přeměňuje GSNO na glutathiondisulfid (GSSG) a amoniak (Liu *et al.*, 2001). Ke snižování hladiny RSNO dochází aktivitou thioredoxinreduktasy (TrxR, EC 1.8.1.9) (Obr. 15). TrxR katalyzuje redukci



thioredoxinu (Trx), který je S-nitrosylován na Cys69. Trx je S-nitrosylován prostřednictvím transnitrosací reakce (Mitchell *et al.*, 2007).



Obr. 15 Denitrosylace proteinů zprostředkovaná S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR) a thioredoxinreduktasou (TrxR). Proteiny mohou podléhat reverzibilní S-nitrosylaci a denitrosylaci. V levé části obrázku je znázorněna denitrosylace zprostředkovaná GSNOR. Transnitrosací redukovaného glutathionu (GSH) vzniká S-nitrosoglutathion (GSNO) a protein v nemodifikované formě. GSNO je redukován díky NADH-dependentní aktivitě GSNOR za vzniku intermediátu glutathion-S-hydroxysulfenamidu (GSNHOH), který se může podrobit další reakci s GSH za tvorby oxidovaného glutathionu (GSSG). Redoxní cyklus je dokončen redukcí GSSG na GSH, kterou zprostředkovává enzym glutathionreduktasa (GR). V pravé části obrázku je znázorněna denitrosylace zprostředkovaná enzymem TrxR. Trx obsahující dvě thiolová residua může podléhat oxidaci, která je spojena s denitrosylací S-nitrosylovaného substrátu. Oxidovaný Trx je dále redukován aktivitou TrxR využívající NADPH na regeneraci aktivního Trx (převzato z Lima *et al.*, 2010).

#### 2.4.1.2 Biologický význam a lokalizace S-nitrosothiolů u rostlin

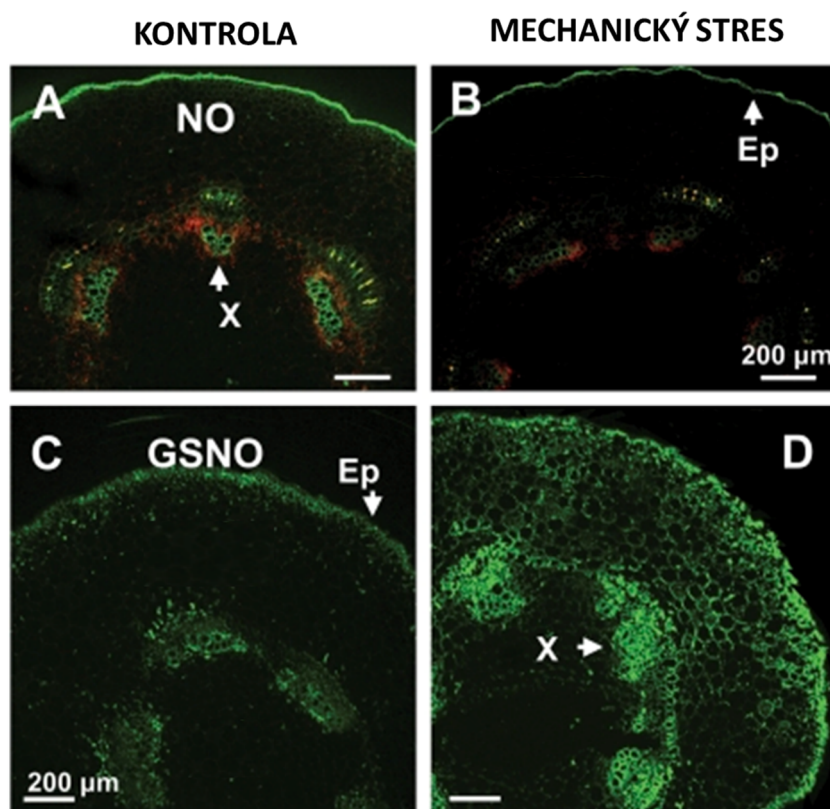
S-nitrosylované proteiny jsou zapojeny v aktivaci a regulaci řady obranných mechanismů v reakci na biotický i abiotický stres. Hrají klíčovou roli v regulaci hormonální signalizace. V rostlinných buňkách RSNO také zabezpečují ochranu před nitrosativním nebo oxidativním stresem.

S-nitrosylace má také významnou funkci v regulaci programované buněčné smrti (apoptozy). Apoptotická signální kaskáda je zahájena aktivací kaspas, které dále mohou štěpit specifické proteiny a dochází k aktivaci celého procesu buněčné smrti (Martínez-Ruiz *et al.*, 2007). Tyto proteasy obsahují ve svém aktivním místě cystein, S-nitrosylace cysteinového residua zablokuje aktivní místo a projeví se antiapoptotický účinek. Za fyziologických podmínek je většina kaspas v S-nitrosylované formě (Kim *et al.*,



1997). Vlivem redukčního prostředí v cytosolu dochází k denitrosylaci kaspas, a tím k jejich aktivaci. Hladina NO však také může působit proapoptoticky. K aktivaci apoptotické signální dráhy dochází po uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií do cytosolu. Tento přesun může být iniciován právě vysokou koncentrací NO, která má vliv na otevírání pórů mitochondriální membrány (Schonhoff *et al.*, 2003).

Za fyziologických podmínek byly u rostlin RSNO lokalizovány především v buňkách cévního svazku (xylém), popřípadě v epidermálních buňkách. Vlivem stresových podmínek dochází ke zvýšení produkce RSNO zejména v buňkách mezofylu (Corpas *et al.*, 2004).



Obr. 16 Detekce NO a GSNO v řezech hypokotylu slunečnice po mechanickém poškození. Jasně zelená fluorescence odpovídá signálu NO detekovanému pomocí fluorescenční sondy DAF-2 DA, (A, B). GSNO byl detekován imunohistochemicky použitím specifické protilátky proti GSNO (1:2500). Ep, epidermis; X, xylém. Měřítka 200 μm. Převzato z Chaki *et al.*, 2011.

### 2.4.1.3 Regulace metabolických drah prostřednictvím S-nitrosylace

Proces S-nitrosylace proteinů hraje významnou roli v regulaci metabolických drah v řadě fyziologických i patologických procesů (Haendeler *et al.*, 2002). Velice často jsou takto modifikovány proteiny se signální, regulační nebo antioxidační funkcí, např. u *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno asi 100 různých proteinů, které jsou modifikovány S-nitrosylací (Lindermayr *et al.*, 2005) (Tab. 2).

Tab. 2 Příklady vybraných rostlinných proteinů regulovaných prostřednictvím S-nitrosylace. (převzato z Astier *et al.*, 2012)

Funkční třída proteinu	Identifikovaný protein	Stimulace	Efekt	Cys-NO	Rostlina
Metabolismus	GADPH	GSNO, salinita, patogen, nadměrné ozáření	(-)	155, 159	<i>A. thaliana</i> <i>N. tabacum</i> <i>C. aurantium</i> <i>K. pinnata</i> <i>O. sativa</i>
Fotosyntéza	Methioninadenosyltransferasa 1	GSNO	(-)	144	<i>A. thaliana</i>
	Velká podjednotka RUBISCO	GSNO, nízká teplota	(-)	192, 427	<i>A. thaliana</i> <i>B. juncea</i> <i>K. pinnata</i>
	Fotosystém I apoprotein A2	Konstitutivní	?	559	<i>A. thaliana</i> <i>B. juncea</i> <i>C. aurantium</i> <i>K. pinnata</i>
Signalizace	Tubulin β	GSNO	?	56	<i>A. thaliana</i>
	Auxinový receptor TIR1	GSNO	(+)	140	<i>A. thaliana</i>
	Transkripční faktor MYB2	GSNO	(-)	53	<i>A. thaliana</i>
	NPR1	GSNO	(-)	156	<i>A. thaliana</i>
	TGA1	GSNO	(+)	172, 287	<i>A. thaliana</i>
Zpracování genetické informace	Kalnexin CNX1	Konstitutivní	?	108	<i>A. thaliana</i>
	Elongační faktor EF-1α	GSNO	?	87	<i>A. thaliana</i> <i>B. juncea</i>
Transportéry a kanály	Vakuolární ATPasová podjednotka	Konstitutivní	?	201	<i>A. thaliana</i>
	Fosfátový transportér (PHT3;1)	Konstitutivní	?	104	<i>A. thaliana</i>
	Adenylátový translokátor	Konstitutivní	?	130	<i>A. thaliana</i>
Produkce ROS	NADPH oxidasa	GSNO, patogen	(-)	890	<i>A. thaliana</i>
Detoxifikace ROS	Askorbátperoxidasa	GSNO, plynný NO	(-)	32	<i>A. thaliana</i> <i>A. toxicaria</i> <i>C. aurantium</i>
	Katalasa	GSNO	(-)	230	<i>P. sativum</i>
Detoxifikace ONOO <sup>-</sup>	Peroxiredoxin II E	GSNO, patogen	(-)	121	<i>A. thaliana</i>
Štěpení proteinů	Metakaspasa AtMC9	Konstitutivní	(-)	147	<i>A. thaliana</i>
	Cystein-proteasa RD21	Konstitutivní	?	233, 342	<i>A. thaliana</i>

Konstitutivní = konstitutivní S-nitrosylace; (+) aktivace, (-) inhibice, ? efekt není znám; Cys-NO = specifické cysteinové residuum podléhající S-nitrosylaci; *A. thaliana*, *Arabidopsis thaliana*; *N. tabacum*, *Nicotiana tabacum*; *C. aurantium*, *Citrus aurantium*; *K. pinnata*, *Kalanchoe pinnata*; *O. sativa*, *Oryza sativa*; *B. juncea*, *Brassica juncea*; *A. toxicaria*, *Antiaris toxicaria*

S-nitrosylací jsou regulovány aktivity enzymů zapojených v metabolismu ROS a RNS, mezi které patří např. GSNOR, NADPH oxidasa nebo enzymy askorbát-glutathionového cyklu. S-nitrosylace cysteinových residuí negativně reguluje enzymovou aktivitu GSNOR. Inhibice tohoto enzymu poté vede k akumulaci RSNO v buňkách (Guerra *et al.*, 2016).

Jednoznačně byla potvrzena regulace aktivity enzymu NADPH oxidasy procesem S-nitrosylace. S-nitrosylace klíčového residua Cys890 způsobuje snížení jeho enzymové aktivity. Také enzymy askorbát-glutathionového cyklu, podílející se na snižování hladiny H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v buňce, jsou regulovány prostřednictvím nitrace i S-nitrosylace, které mají různý efekt na jejich aktivitu (Obr. 11) (Kato *et al.*, 2013). Experimenty na hrachu setém (*Pisum sativum* L., cv. Lincoln) prokázaly, že S-nitrosylace Cys20 a Cys147 negativně reguluje aktivitu DHA a stejně tak modifikace Cys68 a Cys197 inhibuje aktivitu MDAR (Kato *et al.*, 2013; Begara-Morales *et al.*, 2015). S-nitrosylace Cys58 a Cys63 glutathionreduktasy (GR) hrachu setého neovlivňuje aktivitu tohoto enzymu (Begara-Morales *et al.*, 2015).

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Materiál a přístroje

##### 3.1.1 Chemikálie

**AppliChem (Německo):** dodecylsírán sodný; hovězí sérový albumin frakce V; sušené nízkotučné mléko.

**Bioline (USA):** HyperLadder 50 bp.

**Bio-Rad (USA):** Coomassie Brilliant Blue R250; marker molekulové hmotnosti Precision Plus Dual Xtra Standards.

**Biotium (USA):** GelRed™.

**Cell Signaling (USA):** sekundární anti-myší protilátka značená alkalickou fosfatou.

**Duchefa Biochemie (Nizozemsko):** dithiotreitol.

**EURX (Polsko):** GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit; Color Taq DNA Polymerase.

**Lachema (Česká republika):** hydroxid sodný; chlorid hořečnatý.

**Lach-Ner (Česká republika):** ethanol; formaldehyd; chlorid sodný; chlorovodíková kyselina; methanol; peroxid vodíku.

**MP Biomedicals (Francie):** tris(hydroxymethyl)aminomethan.

**Roche (Švýcarsko):** inhibitor proteas Complete ULTRA tablety; Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit.

**Sigma-Aldrich (Německo):** aceton; akrylamid/bis-akrylamid; agar; askorbát; 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceindiacetát; azid sodný;  $\beta$ -merkapt ethanol; bromfenolová modř; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfát *p*-toluidinová sůl; EDTA; 2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetát; dimethylsulfoxid; dusitan sodný; ethylendiamidtetraoctová kyselina; fenylmethylsulfonyl fluorid; glycerol; 2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonová kyselina; 2-4-karboxyfenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid; L-cystein; monoklonální myší protilátka proti Hsp70 produkovaná; N-ethylmaleimid; N-(1-naftyl)ethylendiamin; N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin; N, N'-tetramethylendiamin; nitrotetrazoliová modř; octová kyselina; persíran amonný; polyvinylpyrolidin; Ponceau S; redukovaný glutathion; NADH; NADPH; sulfanylamid; Triton X-100; Tween 20.

**Thermo Fischer Scientific (USA):** Alexa Fluor® 488 C<sub>5</sub>Maleimid; 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-5-karboxanilid.

**Primární polyklonální protilátka anti-SIGSNOR:** protilátka byla připravena standardní metodou (Harlow & Lane, 1988) intradermální aplikací purifikovaného rekombinantního proteinu GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur (Kubienová *et al.*, 2013a).

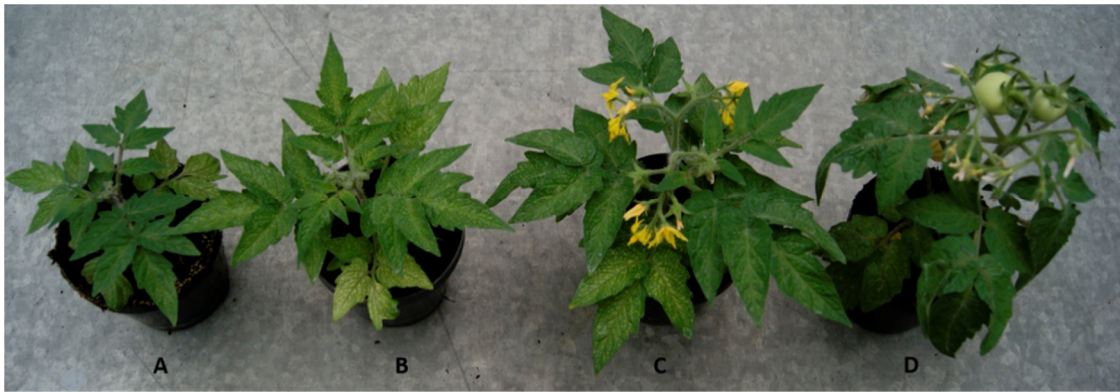
### 3.1.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA); centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo); destička Take3 Multi-Volume plate (BioTek, USA); dokumentační zařízení Gel-Doc (Bio-Rad, USA); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektroforetická komůrka pro agarosovou elektroforézu Safe Blue (Major Science, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); fluorescenční mikroskop BX50 (Olympus, Japonsko); inkubátor EN120 (Nüve, Turecko); kolonky NAP-10 (GE Healthcare, USA); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA); nitroceluloseová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA); termocykler T100TM (Bio-Rad, USA); termoblok (BioSan, Litva); třepačka 3D (BioSan, Litva); vibratom Leica VT1000S (Leica Biosystems, Německo); vortex (Stuart, UK); zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (Bio-Rad, USA),

## 3.2 Biologická materiál

### 3.2.1 *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

Pro experimenty byl zvolen kultivar Micro-Tom rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). Tento kultivar se projevuje trpasličím fenotypem (Obr. 16) (Marti *et al.*, 2006). Malý vzrůst, krátký životní cyklus (70-90 dní) a malý genom o velikosti 350 Mpb, tvoří vhodné vlastnosti pro modelový organismus (Meissner *et al.*, 1997; Eyal & Levy, 2002). Kultivar Micro-Tom vznikl křížením kultivarů rajčete Florida Basket a Ohio 4013-3.



Obr 16 Rostliny rajčete *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom ve vývojových stádiích 50, 60, 70 a 90 dní (A, B, C, D).

Semena rajčete *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom byla vyseta do vlhkého perlitu. Semenáčky s vyvinutými děložními listy (přibližně 10 denní) byly přesazeny do směsi zahradního substrátu a rašeliny v poměru 2:1. Rostliny pěstované ve skleníku při teplotě 18-20 °C s fotoperiodou 12/12 h (den/noc) byly pravidelně zalévány a hnojeny. Pro experimenty byly použity 60 denní rostliny, které byly pěstovány nezávisle ve třech sériích.

### 3.2.2 Teplotní stres

Pro studium teplotního stresu byly 60 denní rostliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom inkubovány po dobu 2 h při teplotách 40, 45 nebo 50 °C. V časových intervalech 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po vystavení teplotnímu stresu (TS) byly odebrány listy ze 4., 5. a 6. patra rostliny a ihned přeneseny do kapalného dusíku. Stejná patra byla odebrána kontrolním rostlinám, které byly inkubovány při laboratorní teplotě (25 °C).

Ze všech listů odebraných pater byl pro každou teplotu a čas připraven směsný vzorek, který byl homogenizován v kapalném dusíku. Směs byla pro jednotlivá stanovení odvážena po 1 g do připravených zkumavek. Pro studium exprese bylo sterilně odebráno 0,1 g vzorku. Všechny zkumavky se vzorky byly uchovány v -80 °C.

### 3.3 Experimentální metody

#### 3.3.1 Stanovení aktivity GSNOR

Aktivita GSNOR byla stanovena spektrofotometricky sledováním oxidace NADH při 340 nm na 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Do každé jamky bylo nanášeno 200  $\mu\text{l}$  20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl pufru (pH 8,0), 40  $\mu\text{l}$  vzorku a 30  $\mu\text{l}$  2  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku NADH. Enzymová reakce byla odstartována přidáním 30  $\mu\text{l}$  4  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku GSNO. Měření poklesu absorbance při 340 nm probíhalo každých 15 vteřin po dobu 10 min. Do jamky se slepým vzorkem bylo přidáno 30  $\mu\text{l}$  deionizované vody namísto substrátu GSNO. Roztoky GSNO a NADH byly vždy před měřením čerstvě připraveny a uchovány ve tmě.

Příprava vzorku: Listy byly homogenizovány v kapalném dusíku. K odváženému 1 g homogenátu byly přidány 2 ml extrakčního pufru (50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7,5; 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  PMSF; 0,2% (v/v) Triton X-100). Následovala inkubace vzorků na misce s ledem po dobu 20 min a poté byly vzorky 30 min centrifugovány při 16 000 g a teplotě 4°C. Supernatant byl přečištěn na odsolovací kolonce NAP-10 naplněné sorbentem Sephadex G-25. Kolonky byly ekvilibrovány 15 ml 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Na-fosfátového pufru (pH 6,8) a poté byl nanášen 1 ml supernatantu. Po přidání 2 ml 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  K-fosfátového pufru (pH 7,8) bylo zachyceno 1,5 ml eluátu. Kolonky byly promyty 25 ml deionizované vody.

Příprava GSNO dle Moore & Mani, 2002: Ve 3 ml 0,5 M HCl bylo rozpuštěno 614 mg redukovaného glutathionu (0,66  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Do roztoku vychlazeného na ledové lázni bylo za stálého míchání přidáno 138 mg  $\text{NaNO}_2$  (0,66  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Vzniklá červená sraženina GSNO byla po 40 min odsáta pomocí Büchnerovy nálevky a promyta 20 ml ledově vychlazené deionizované vody, 20 ml vychlazeného acetonu a 20 ml vychlazeného diethyletheru. Po promytí byl GSNO uložen do alobalu, přes noc ponechán v exikátoru a poté uchován při -20 °C.

#### 3.3.2 Stanovení aktivity APX

Aktivita APX byla stanovena na 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Principem metody je sledování poklesu absorbance při oxidaci askorbátu. Do jamky bylo nanášeno

125  $\mu\text{l}$  0,1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátového pufru (pH 7), 15  $\mu\text{l}$  rostlinného extraktu a 72  $\mu\text{l}$  1,75  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku askorbátu. Enzymová reakce byla odstartována přidáním 38  $\mu\text{l}$  0,7  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku peroxidu vodíku a byl měřen nárůst absorbance při 290 nm po dobu 2 min. Do jamky se slepým vzorkem byl namísto extraktu nanesen extrakční pufr. Roztoky askorbátu a peroxidu vodíku byly před měřením vždy čerstvě připraveny.

Příprava vzorku: Listy byly homogenizovány v kapalném dusíku a k odváženému 1 g homogenátu byly přidány 2 ml extrakčního pufru (50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7,5; 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  PMSF; 0,2% (v/v) Triton X-100). Homogenát byl ponechán 20 min na misce s ledem. Po extrakci byly vzorky 30 min centrifugovány při 16 000 g a 4 °C. Pro měření aktivity byl použit čerstvě připravený supernatant, který byl uchován ve tmě na ledové lázni.

### 3.3.3 Stanovení aktivity NADPH oxidasy

Aktivita NADPH oxidasy byla stanovena na 96 jamkové mikrotitrační destičce měřením absorbance při 492 nm. Nárůst tvorby superoxidových radikálů byl poté vypočten pomocí extinkčního koeficientu 21600  $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Jiang & Zhang, 2002).

Do jamek mikrodestičky bylo nanášeno 10  $\mu\text{l}$  vzorku membránové frakce (příprava je uvedena níže), 240  $\mu\text{l}$  roztoku A či roztoku B. Nárůst absorbance byl měřen po dobu 30 min. Membránová frakce je schopna spontánně redukovat XTT i bez účasti NADPH a tato redukce tedy není výsledkem NADPH oxidasové aktivity. K odstranění tohoto vlivu byly spolu se vzorky měřeny dva slepé vzorky. První slepý vzorek byl složen z 10  $\mu\text{l}$  deionizované vody a 240  $\mu\text{l}$  roztoku A. Druhým slepým vzorkem byla směs 10  $\mu\text{l}$  vzorku membránové frakce a 240  $\mu\text{l}$  roztoku B. Jako finální slepý vzorek sloužil rozdíl změn jejich absorbancí v čase 0-30 min od zahájení měření. Pro přípravu roztoků A a B (Tab. 2) byl použit 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl pufr (pH 7,5), čerstvé roztoky 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  XTT a 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADPH.

Tab. 2 Příprava roztoků A a B.

Roztok	Deionizovaná voda (ml)	1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pufr (ml)	1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ XTT (ml)	1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADPH (ml)
A	3,875	0,625	6,250	1,250
B	5,125	0,625	6,250	-



Příprava vzorku: Listy rajčete byly homogenizovány v kapalném dusíku a byl odvážen 1 g homogenátu, ke kterému byly přidány 4 ml extrakčního pufru. Směs byla promíchána pomocí vortexu a centrifugována při 14 000 g při 4 °C po dobu 30 min. 2,5 ml supernatantu bylo přeneseno do kyvet pro ultracentrifugaci. Centrifugační kyvety se vzorky byly vyváženy a vloženy do ultracentrifugy, kde byly centrifugovány 60 min při 203 000 g a 4 °C. Poté byl ze zkumavek odstraněn supernatant a sediment obsahující membránovou frakci byl rozsuspendován v 100 µl ledového 10 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,4).

Příprava extrakčního pufru: Nejprve byly připraveny roztoky 1 mol·l<sup>-1</sup> sacharosy, 1 mol·l<sup>-1</sup> HEPES (pH 7,2), 0,25 mol·l<sup>-1</sup> EDTA, 1 mol·l<sup>-1</sup> DTT a 0,1 mol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>. Pro přípravu 100 ml extrakčního pufru bylo odváženo 0,0632 g L-cysteinu a 0,6 g PVP. Dle Tab. 3 byly smíchány uvedené roztoky, k nimž byla přidána příslušná navážka L-cysteinu, PVP a 10 tablet inhibitoru proteas (Tablets of Complete, Mini, EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail Tablets). Extrakční pufr byl doplněn destilovanou vodou do objemu 100 ml a byl vychlazen v ledové lázni.

Tab. 3 Objemy roztoků použitých pro přípravu extrakčního pufru.

Složka	Koncentrace	Objem (ml)
Sacharosa	1 mol·l <sup>-1</sup>	25
HEPES	1 mol·l <sup>-1</sup>	5
EDTA	0,25 mol·l <sup>-1</sup>	1,2
DTT	1 mol·l <sup>-1</sup>	0,1
MgCl <sub>2</sub>	0,1 mol·l <sup>-1</sup>	0,1

### 3.3.4 Stanovení obsahu RSNO

S-nitrosothioly se stanovují spektrofotometrickou metodou podle Savilla. Principem této metody je uvolňování NO<sup>+</sup> za katalýzy Hg<sup>2+</sup> soli. Po reakci se sulfanilamidem vzniká diazoniová sůl kopulující s N-(1-naftyletylen)diaminem (NED) za tvorby azobarviva, které je možné detekovat spektrofotometricky při 540 nm (Saville, 1958).

Pro měření byly použity rostlinné extrakty přečištěné na kolonkách NAP-10. Do jamek mikrotitrační destičky bylo nanášeno 195 µl činidla Griess B a 5 µl extraktu. Po 5 min inkubace bylo přidáno 100 µl činidla NED. Po dalších 5 min byla měřena absorbance při 540 nm. Jako slepý vzorek bylo použito 195 µl činidla Griess A, 5 µl deionizované vody a 100 µl činidla NED.

Koncentrace S-nitrosothiolů byla odečtena z rovnice lineární regrese, která byla sestavena z měření kalibračních standardů GSNO. Byly použity 1; 1,25; 2,5; 5; 10; 50; 100; 200 a 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoky GSNO v 0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl.

#### Použité roztoky:

- Griess A: 3,5% sulfanilamid v 0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl.
- Griess B: 3,5% sulfanilamid v 0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl a 1%  $\text{HgCl}_2$ .
- NED: 0,1% N-(1-naftyletylen)diamin v deionizované vodě.

### **3.3.5 Stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové**

Proteiny v kyselém prostředí interagují s barvivem Coomasie Blue G-250 a vytváří stabilní komplex, který můžeme spektrofotometricky stanovovat při 595 nm (Bradford, 1976).

Měření bylo prováděno v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Do jamek bylo nanášeno 45  $\mu\text{l}$  deionizované vody, 5  $\mu\text{l}$  vzorku a 200  $\mu\text{l}$  činidla Bradfordové (0,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  Coomasie Brilliant Blue G250; 0,25  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  methanol; 0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  kyselina fosforečná). Po 5 min byla měřena absorbance při 595 nm. Jako slepý vzorek bylo namísto vzorku použito 5  $\mu\text{l}$  vody. Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí rovnice lineární regrese, která byla sestavena z měření kalibračních standardů hovězího sérového albuminu (BSA). Koncentrace standardů BSA byly 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### **3.3.6 Detekce Hsp70 metodou Western blot**

Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE v 8% dělicím polyakrylamidovém gelu, pH 8,8 (Laemmli, 1970) a 4% zaostřovacím (horním) polyakrylamidovém gelu, pH 6,8. Gely byly připraveny dle tabulky 4. Polymerace gelu byla odstartována přidávkem persíranu amonného (APS). Polymerace spodního i horního gelu mezi skly trvala 30 minut. Poté byly skly s gelem přemístěny do elektroforetické komory a zality elektrodoým pufrem. Po nanášení vzorků do jamek v zaostřovacím gelu byla komora připojena ke zdroji napětí a byla spuštěna separace. Elektroforetická separace probíhala zpočátku při napětí 120 V, po zaostření v horním gelu se začaly proteiny ve spodním gelu dělit a napětí bylo zvýšeno na 180 V.

Tab. 4 Objemy roztoků pro přípravu zaostřovacího (4%) a dělicího (8%) polyakrylamidového gelu. Rozpis je uveden pro 2 gely o tloušťce 1,5 mm.

	AA/BIS (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)	SDS (ml)	TEMED (ml)	APS (ml)	Tris/HCl (1,5 mol·l <sup>-1</sup> ) pH 8,8 (ml)	Tris/HCl (0,5 mol·l <sup>-1</sup> ) pH 6,8 (ml)
4% gel	2,6	12,2	0,2	0,02	0,2	-	5
8% gel	5,4	9,4	0,2	0,02	0,2	5	-

Příprava vzorků pro SDS-PAGE: Vzorky byly smíchány v poměru 3:1 s 4x koncentrovaným Laemmliho vzorkovacím pufrem (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 0,2% bromfenolová modř; 5% merkaptoethanol) a 10 min inkubovány při teplotě 95 °C. Vzorky byly poté ochlazeny na laboratorní teplotu a nanášeny do jamek gelu. Pro detekci Hsp70 bylo do jamek nanášeno 30 µl nepřečištěného rostlinného extraktu. Na každý gel byl rovněž nanášen standard molekulové hmotnosti (Precision Plus Protein Dual Xtra Standards, Bio-Rad, USA) v objemu 5 µl bez inkubace při teplotě 100°C.

Separované proteiny metodou SDS-PAGE byly přeneseny z gelu na povrch nitrocelulosové membrány pomocí blottingu v tankovém uspořádání. Membrána, filtrační papíry a blotovací porézní houbičky byly ponořeny po dobu 5 min do blotovacího pufru (0,025 M Tris-HCl, pH 8,3; 0,192 M glycin, 20% (v/v) methanol). Na černou stranu blotovací kazety byly umístěny jednotlivé vrstvy v pořadí: porézní houbička, filtrační papír, gel, nitrocelulosová membrána, filtrační papír a porézní houbička. Uzavřená blotovací kazeta byla umístěna do blotovací komůrky a byla naplněna blotovacím pufrem.

Prvním krokem imunochemické detekce proteinů na membráně bylo blokování nespecifických míst v 5% roztoku sušeného mléka v TTBS pufru po dobu 2 h. Po blokování byla membrána přenesena do roztoku primární myší monoklonální protilátky anti-Hsp70 v 5% roztoku sušeného mléka (1:500). Membrány byly poté přes noc inkubovány za mírného míchání při 4 °C. Následovalo třikrát opakované promývání 20 ml roztoku TTBS po dobu 20 minut. Membrány byly poté přeneseny do roztoku kozí anti-myší sekundární protilátky značené alkalickou fosfatase (AP) v 5% roztoku sušeného mléka, ředění 1:1000. Membrány byly znovu 3x 20 minut promývány 20 ml TTBS a poté byl přidán barvicí roztok NBT-BCIP pro vizualizaci proteinových bandů. Pro přípravu barvicího roztoku bylo na jednu membránu použito 3 ml AP pufru, 25 µl

NBT roztoku a 25  $\mu$ l BCIP roztoku. Poté byly membrány promyty deionizovanou vodou a vyfoceny v dokumentačním zařízení Gel-Doc.

#### Použité roztoky:

- TBS (pH 7,5): 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl; 0,5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl
- TTBS: 400 ml TBS, 200  $\mu$ l Tween-20
- AP pufr: 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl (pH 9,5); 5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ; 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl
- NBT roztok: 10% NBT v 70% DMF
- BCIP roztok: 5% NBT v 100% DMF

### **3.3.7 Stanovení exprese *GSNOR*, *APX* a *NADPH oxidasy***

#### **3.3.7.1 Izolace a purifikace RNA**

Izolace RNA z rostlinného materiálu byla provedena pomocí komerčního kitu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx, Polsko). Listy rajčete Micro-Tom byly homogenizovány tekutým dusíkem a za sterilních podmínek bylo odebráno 100 mg homogenátu. Poté bylo přidáno 200  $\mu$ l LG pufru a 100  $\mu$ l RL pufru obsahujících  $\beta$ -merkptoethanol v poměru 1:99. Vzorky byly centrifugovány po dobu 4 min při 16 000 g. Supernatant byl odebrán do žluté mikrozkušavky obsahující centrifugační kolonku, bylo přidáno 200  $\mu$ l RL pufru a kolonky byly znovu centrifugovány 16 000 g po dobu 4 min. K eluátu bylo přidáno 300  $\mu$ l 96% ethanolu a byl přemístěn do bílé mikrozkušavky s kolonkou obsahující silikátový sorbent vázající RNA. Vzorky byly centrifugovány 1 min při 11 000 g. Z mikrozkušavek byl odstraněn eluát a na kolonku bylo nanášeno 400  $\mu$ l Wash DN1 pufru. Po 1 min centrifugaci při 11 000 g byl eluát znovu odstraněn a na kolonku bylo přidáno 50  $\mu$ l DNR pufru, jehož součástí je DNasa (1 U/ $\mu$ l) k odstranění genomové DNA. Kolonky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Po přidání 400  $\mu$ l Wash RB1 pufru byly kolonky centrifugovány 1 min při 11 000 g. Kolonky byly dále promyty RBW pufrům. Nejprve bylo nanášeno 650  $\mu$ l RBW pufru a po 1 min centrifugaci při 11 000 g bylo přidáno 350  $\mu$ l RBW pufru. Kolonky byly centrifugovány 2 min při 11 000 g. V posledním kroku bylo přidáno 50  $\mu$ l RNase-free roztoku a kolonky byly centrifugovány 1 min při 11 000 g pro eluci RNA.

### 3.3.7.2 Měření koncentrace vyizolované RNA

Koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometrickým měřením. Na Take3 Multi-Volume destičku (BioTek) byly nanесeny 2  $\mu\text{l}$  vzorku a měřila se absorbance při 260, 280 a 320 nm. Z poměrů absorbance při 260 a 280 nm a poté 260 a 230 nm byla zkontrolována čistota RNA. Jako slepý vzorek sloužila sterilní destilovaná voda. Koncentrace RNA byla vypočtena z absorbance při 260 nm. Absorbance rovna 1 odpovídá koncentraci RNA 40  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.3.7.3 Reverzní transkripce

Přepis izolované RNA na cDNA byl proveden pomocí komerčního kitu Transkription Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche). V prvním kroku bylo do stripu nanесeno 1  $\mu\text{g}$  vyizolované RNA a 1  $\mu\text{l}$  oligo dT primeru. Tato směs byla doplněna RNase-free vodou na objem 11,4  $\mu\text{l}$ . Po 10 min inkubaci při 65 °C byla směs ochlazená na ledu. Dále byl připraven roztok pro druhý krok reverzní transkripce (Tab. 5). Po přidání tohoto roztoku byla směs inkubována 30 min při 45°C, 5 min při 85°C a poté ochlazená na 4 °C. Připravená cDNA byla uchována při -20°C.

Tab. 5 Objemy složek roztoků pro reverzní transkripci.

Složka	Objem ( $\mu\text{l}$ )
5x Reaction Buffer	4
Protector (inhibitor RNasy)	0,8
dNTP mix (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	2
DTT (0,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	1
Reverzní transkriptasa	1,1

### 3.3.7.4 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Pomocí Color Taq DNA polymerasy (EURx) byla připravena reakční směs pro PCR (Tab. 6). Ve vzorcích byly sledovány geny pro *GSNOR*, *APX* a *NADPH oxidasu*. Jako tzv. provozní gen (housekeeping gene) byl použit elongační faktor *EF-1 $\alpha$* , jehož exprese je ve všech vývojových stádiích konstitutivní. Pro každý gen byly použity příslušné forward a reverse primery (Tab. 7). Připravená směs byla vložena do termocykleru T100TM (Bio-Rad) a po nastavení programu (Tab. 8) byla spuštěna reakce. Produkty

byly uchovány v  $-20^{\circ}\text{C}$ . Primery pro všechny sledované geny se vázaly při stejné teplotě  $60^{\circ}\text{C}$ .

Tab. 6 Složení reakční směsi pro PCR.

Složka	Objem ( $\mu\text{l}$ )
5x Pol. Buffer B	10
dNTP mix ( $5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ každý dNTP)	2
Forward primer ( $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	1,5
Reverse primer ( $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	1,5
Color Tag DNA polymerasa1 ( $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ )	1,25
cDNA	1
Sterilní 2x destilovaná voda	32,75

Tab. 7 Sekvence forward a reverse primerů studovaných genů.

	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Gen-Bank číslo
S1-EF-1 $\alpha$	GGTCATCATCATGAACCATCC	ATACCAGCATCACCGTTCTT	X53043
SIGSNOR	CTGGAGTGGGAGTTATGATGAA	CCTCCGCCACAGCAAGACCAACT	GU296438
NADPH ox	CGGATGGAAATGAAGTTGAAA	AAGCATCAAACAATTCCAACG	AF088276
APX	GAGGACCTGATGTTCCCTTTC	AAGGTATGGGCACCAGAGAGT	AY974805

Tab. 8 Nastavení PCR programu v termocykleru.

	Teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	Čas (s)	Opakování (počet)
Aktivace	95	180	1
Denaturace	95	30	35
Navázání primerů	60	30	35
Elongace	72	60	35
Finální elongace	72	420	1
Chlazení	4	$\infty$	1

### 3.3.7.5 Agarosová elektroforéza

Rozpuštěním agarosy v TAE pufru byl připraven 3% (w/v) gel (3,6 g agarosy v 120 ml TAE pufru). Před jeho zatuhnutím bylo přidáno 7,2  $\mu\text{l}$  interkalačního barviva GelRed (Biotium, USA). Tuhý gel byl přemístěn do elektroforetické komůrky pro agarosovou elektroforézu naplněné TAE puftrem. Do jamek bylo přeneseno 15  $\mu\text{l}$  vzorku po PCR a 4  $\mu\text{l}$  markeru molekulové hmotnosti HyperLadder 50 bp (Bioline). Elektroforéza byla spuštěna při konstantním napětí 90 V a separace probíhala po dobu 40 min.

#### Použité roztoky:

- TAE pufr:  $40\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl;  $20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  kyselina octová,  $1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA

### 3.3.8 Imunolokalizace GSNOR v příčných řezech listů

Rostliny byly stresovány teplotou 40 °C po dobu 2 h. Po 2 a 3 h po inkubaci byly připraveny příčné řezy pro imunolokalizaci GSNOR. Řezy byly připraveny i pro kontrolní nestresované rostliny. Pomocí skalpelu byl z listu kontrolních či stresovaných rostlin vyřezán segment o velikosti asi 5x5 mm, jehož středem vedl hlavní cévní svazek listu. Segmenty listů byly fixovány v 4% paraformaldehydu (w/v) v 0,1 mol·l<sup>-1</sup> K-fosfátovém pufru (pH 7,4). Po 3 h inkubace při laboratorní teplotě byly řezy přemístěny do 4% roztoku agarosy o teplotě 38 °C. Do ztuhnutí agarosy byly řezy udržovány v kolmé poloze a poté byly vyřezány krychličky o velikosti asi 1 cm<sup>3</sup>. Krychličky byly přilepeny vteřinovým lepidlem na podložku pro umístění vzorku pro řezání na vibratomu. Pomocí vibratomu (Leica VT1000S) poté byly vytvořeny řezy o tloušťce 100 μm. Pomocí štětečku byly řezy odebírány do košíčků se sítkem v 12 jamkové mikrotitrační destičce s TBSA-BSAT puftrem (pH 7,6). Tímto puftrem byl také neustále udržován vlhký povrch kvádru agarosy a žiletky vibratomu.

Řezy byly inkubovány přes noc při 4 °C v roztoku s primární protilátkou (polyklonální králičí anti-SIGSNOR, ředění v TBSA-BSAT pufru 1:100). Poté byly řezy 3x promyty 3,5 ml TBSA-BSAT po dobu 10 min. Jako sekundární protilátka byla použita fluorescenčně značená kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční značkou DyLight488 (ředění v TBSA-BSAT 1:1000). Inkubace probíhala 2 h při 4 °C. Poté byly řezy 3x promyty 3,5 ml TBSA-BSAT po dobu 10 min. Excitační a emisní vlnová délka této fluorescenční značky je 493 a 518 nm. Jako negativní kontrola byly použity řezy, u nichž byl vynechán krok inkubace s primární protilátkou, a byly pouze inkubovány se sekundární protilátkou. Po posledním promytí byly řezy přemístěny na podložní sklíčko do kapky roztoku 10 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,4) a glycerolu v poměru 1:1. Na řezy bylo položeno krycí sklíčko. Aby nedocházelo k vypařování roztoku a preparát se volně nepohyboval, byl vytvořen trvalý preparát pomocí bezbarvého rychleschnoucího laku na nehty, kterým byly přetřeny okraje krycího sklíčka. Za použití hranolu U-MWB2 byly mikroskopicky pozorovány fluorescenční signály vzorků, kontrol a negativních kontrol.

### Použité roztoky:

- TBSA-BSAT (pH 7,6): 5 mol·l<sup>-1</sup> Tris; 0,9% NaCl; 0,05% NaN<sub>3</sub>; 0,1% BSA, 0,1% Triton X-100

### **3.3.9 Lokalizace ROS, NO a RSNO**

Příčné řezy listů rajčete Micro-Tom připravené na vibratomu (viz. podkapitola 3.3.8) byly vloženy do košíčků se sítkou v 12 jamkové mikrotitrační destičce a poté byly inkubovány s pracovními roztoky pro detekci NO, ROS nebo RSNO. Jednotlivé postupy jsou uvedeny v Tab. 10, 12 a 14. Z připravených pracovních roztoků byly připraveny roztoky pro inkubaci vzorků bezprostředně před samotnou detekcí (Tab. 9, 11 a 13). S roztoky se pracovalo za co nejnižšího osvětlení.

Po posledním promytí byly řezy přeneseny do kapky 10 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,4) pufru na podložní sklíčko, překryty krycím sklíčkem a jeho okraje byly přetřeny bezbarvým lakem. Za použití hranolu U-MWB2 na fluorescenčním mikroskopu byl sledován fluorescenční signál.

### Lokalizace ROS:

Tab. 9 Příprava inkubačních roztoků pro detekci ROS.

Inkubační roztoky	20 mmol·l <sup>-1</sup> askorbát sodný (ml)	20 μmol·l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> DCF (ml)	Tris pufr (ml)
A (10 mmol·l <sup>-1</sup> askorbát sodný)	1	-	1
B (10 mmol·l <sup>-1</sup> askorbát sodný + 10 μmol·l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> DCF DA)	1	1	-
C (10 μmol·l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> DCF DA)	-	1	1

Tab. 10 Detekce ROS v řezech listů umístěných v 12 jamkové mikrotitrační destičce.

Jamky	Vzorek/kontrola	Negativní kontrola	Čas inkubace (min)
1	Tris pufr (3 ml)	Roztok A	20
2	-	Tris pufr (3 ml)	2
3	-	Tris pufr (3 ml)	2
4	-	Tris pufr (3 ml)	2
5	Roztok C	Roztok B	10
6	Tris pufr (3 ml)	Tris pufr (3 ml)	2
7	Tris pufr (3 ml)	Tris pufr (3 ml)	2
8	Tris pufr (3 ml)	Tris pufr (3 ml)	2



Lokalizace NO:

Tab. 11 Příprava inkubačních roztoků pro detekci NO.

Inkubační roztoky	400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cPTIO (ml)	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DAF-FM DA (ml)	Tris pufr (ml)
D (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cPTIO)	1	-	1
E (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cPTIO + 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DAF-FM DA)	1	1	-
F (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DAF-FM DA)	-	1	1

Tab. 12 Detekce NO v řezech listů umístěných v 12 jamkové mikrotitrační destičce.

Jamky	Vzorek/kontrola	Negativní kontrola	Čas inkubace (min)
1	Tris pufr (3 ml)	Roztok D	20
2	-	Tris pufr (3 ml)	2
3	-	Tris pufr (3 ml)	2
4	-	Tris pufr (3 ml)	2
5	Roztok F	Roztok E	30
6	Tris pufr (3 ml)	Tris pufr (3 ml)	2
7	Tris pufr (3 ml)	Tris pufr (3 ml)	2
8	Tris pufr (3 ml)	Tris pufr (3 ml)	2

Lokalizace RSNO:

Tab. 13 Příprava inkubačních roztoků pro detekci RSNO.

Inkubační roztoky	1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NEM ( $\mu\text{l}$ )	10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTPA ( $\mu\text{l}$ )	5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Af-M ( $\mu\text{l}$ )	$\beta$ -merkapt ethanol ( $\mu\text{l}$ )	Tris pufr ( $\mu\text{l}$ )
G (10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NEM + 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTPA)	20	20	-	-	1960
H ( $\beta$ -merkapt ethanol)	-	-	-	1,4	1999
I (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Af-M)	-	-	4	-	1996

Tab. 14 Detekce RSNO v řezech listů umístěných v 12 jamkové mikrotitrační destičce.

Jamky	Vzorek/kontrola	Negativní kontrola	Čas inkubace (min)
1	Roztok G	Roztok G	10
2	Tris pufr (3 ml)	Tris pufr (3 ml)	2
3	Tris pufr (3 ml)	Tris pufr (3 ml)	2
4	Tris pufr (3 ml)	Tris pufr (3 ml)	2
5	Roztok H	Roztok H	10
6	Tris pufr (3 ml)	Tris pufr (3 ml)	2
7	Tris pufr (3 ml)	Tris pufr (3 ml)	2
8	Tris pufr (3 ml)	Tris pufr (3 ml)	2
9	Roztok I	-	30
10	Tris pufr (3 ml)	-	2
11	Tris pufr (3 ml)	-	2
12	Tris pufr (3 ml)	-	2

Použité roztoky:

- Tris pufr: 10 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,4)
- 20 mmol·l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>DCF DA: 4 μl 10 mmol·l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>DCF DA v DMSO, 1996 μl Tris pufru
- 20 mmol·l<sup>-1</sup> askorbát sodný: 4 μl askorbátu sodného, 1996 μl destilované vody
- 400 μmol·l<sup>-1</sup> cPTIO: 3,2 μl 250 mmol·l<sup>-1</sup> cPTIO v DMSO, 1997 μl Tris pufru
- 20 μmol·l<sup>-1</sup> DAF-FM DA: 8 μl 5 mmol·l<sup>-1</sup> DAF-FM DA v DMSO, 1992 μl Tris pufru
- 1 mol·l<sup>-1</sup> NEM: 200 μl 10 mol·l<sup>-1</sup> N-ethylmaleimidu, 1800 μl ethanolu
- 10 mmol·l<sup>-1</sup> DTPA: 2 μl DTPA, 1998 μl 1 mol·l<sup>-1</sup> HCl
- 5 mmol·l<sup>-1</sup> Af-M: 1 μl Alexa Fluor® 488 C<sub>5</sub>Maleimid, 1991 μl DMSO

## 4 Výsledky

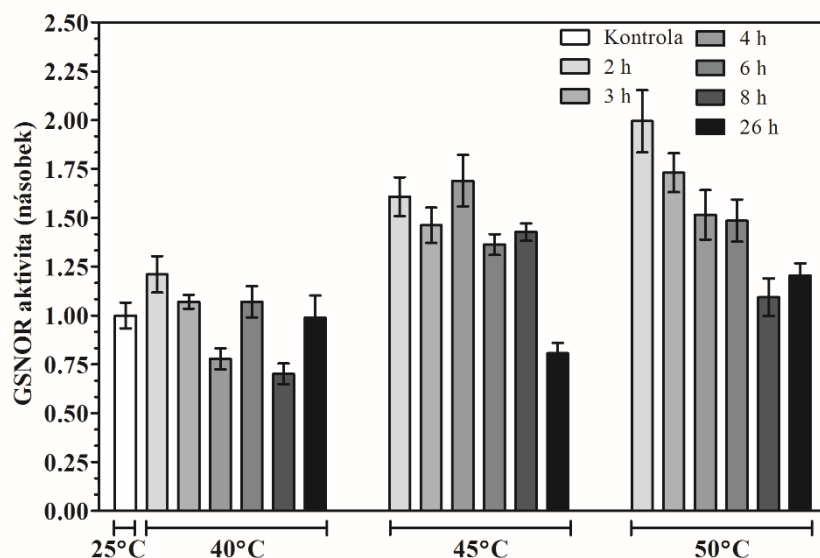
### 4.1 Spektrofotometrické stanovení aktivity enzymů zapojených do metabolismu RNS a ROS

U rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom byl indukován teplotní stres (TS) inkubací dvě hodiny při teplotách 40, 45 a 50 °C. Byly sledovány změny v aktivitě vybraných enzymů zapojených v metabolismu RNS a ROS, které hrají významnou roli v obranné reakci rostlin vystavených vysokým teplotám. Byla detekována enzymová aktivita GSNOR, APX a NADPH oxidasy.

#### 4.1.1 Aktivita GSNOR

GSNOR je jedním z hlavních enzymů, který se podílí na udržování hladiny NO a RNS v rostlinné buňce. Jeho reduktasovou aktivitou je metabolizován GSNO, který tvoří významnou zásobu NO *in vivo* (Hill *et al.*, 2010). Změny v enzymové aktivitě GSNOR byly pozorovány v časech 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h inkubace rostlin při 40, 45 nebo 50 °C.

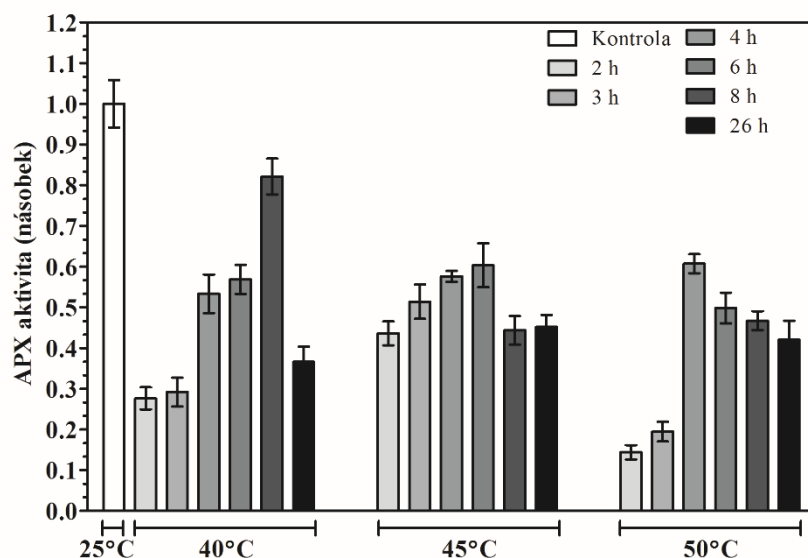
Na Obr. 17 je uvedeno grafické vyhodnocení spektrofotometrického měření enzymové aktivity GSNOR. Hodnoty aktivit (stanovené v jednotkách  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$  na 1 g čerstvé váhy) byly vztaženy k průměru hodnot aktivit GSNOR stanovených pro kontrolní vzorek inkubovaný při 25 °C. Po aplikaci TS byl pozorován intenzivní nárůst GSNOR aktivity v čase 2 h po ukončení působení TS. Nejvyšší změny aktivity byly zaznamenány v případě vystavení rostlin teplotě 50 °C. V průběhu obranné reakce vyvolané působením TS bylo pozorováno následné snížení GSNOR aktivity, které se nejintenzivněji projevilo u rostlin stresovaných teplotou 50 °C.



Obr. 17 Stanovení GSNOR aktivity v průběhu obranné odpovědi modelové rostliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na působení teplotního stresu. GSNOR aktivita byla stanovena 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozici rostlin TS při 40, 45 nebo 50 °C h. Reduktasová aktivita GSNOR byla měřena při 340 nm, koenzym 0,2 mmol·l<sup>-1</sup> NADH, substrát 0,4 mmol·l<sup>-1</sup> GSNO. Aktivita GSNOR (nmol·min<sup>-1</sup>) byla přepočtena na 1 g čerstvé váhy a poté vztažena ke kontrolnímu nestresovanému vzorku.

#### 4.1.2 Aktivita APX

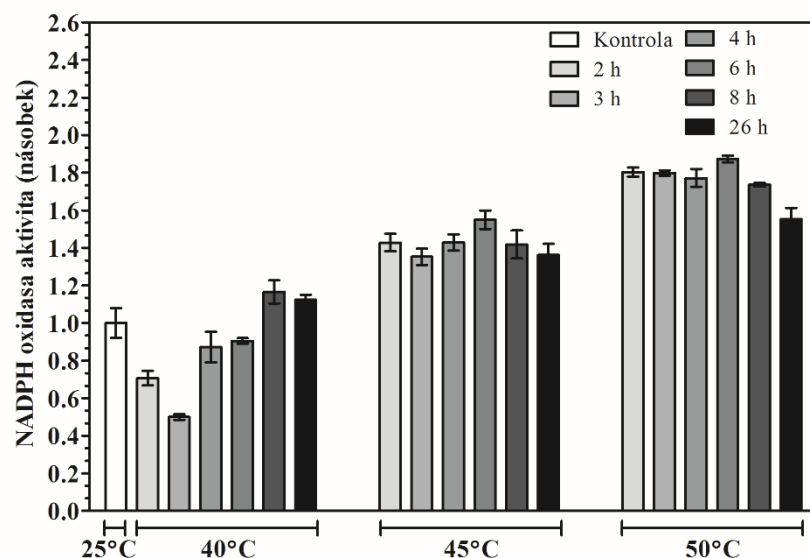
Jedním z enzymů, který se podílí na degradaci ROS, je APX, která je součástí askorbát-glutathionového cyklu (Asada *et al.*, 1992). Grafické vyhodnocení spektrofotometrického stanovení změn aktivity APX je uvedeno na Obr. 18. Hodnoty aktivit (stanovené v nmol·min<sup>-1</sup> na 1 g čerstvé váhy) byly vztaženy k průměru hodnot aktivit APX stanovených pro kontrolní vzorek inkubovaný při 25 °C. APX aktivita byla u rostlin vystavených TS významně nižší v porovnání s kontrolními rostlinami po celou dobu realizace experimentu (tj. během 26 h po ukončení působení stresového faktoru). V případě aplikace TS bylo detekované významné snížení aktivity APX 2 h po aplikaci TS v porovnání s APX aktivitou v kontrolní rostlině. Největší pokles byl zaznamenán v případě působení teploty 50 °C. Následně bylo detekováno postupné zvyšování APX aktivity, které dosáhlo maxima 8 h po TS při působení teploty 40 °C. V případě působení teploty 45 °C bylo maximum APX aktivity dosaženo po 6 h a při působení teploty 50 °C již po 4 h po aplikaci TS.



Obr. 18 Stanovení aktivity APX v průběhu obranné odpovědi modelové rostliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na působení teplotního stresu. Vzorky byly odebrány v časech 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozice TS při 40, 45 nebo 50 °C. Aktivita enzymu byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 290 nm. Jako substrát byl do reakce přidán askorbát v koncentraci 1,75 mmol·l<sup>-1</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v koncentraci 0,7 mmol·l<sup>-1</sup>. Aktivita APX (nmol·min<sup>-1</sup>) byla přepočtena na 1 g čerstvé váhy a poté vztažena ke kontrolnímu nestresovanému vzorku.

#### 4.1.3 Aktivita NADPH oxidasy

Produkce ROS je z velké části ovlivněna aktivitou NADPH oxidasy (Lamb & Dixon *et al.*, 1997). Změny v aktivitě NADPH oxidasy po aplikaci TS jsou graficky znázorněny na Obr. 19. Stanovená aktivita (nmol·min<sup>-1</sup> na 1 g čerstvé váhy) byla vztažena k průměru hodnot aktivit NADPH oxidasy stanovených pro kontrolní vzorek inkubovaný při 25 °C. Významný nárůst aktivity NADPH oxidasy inicioval TS při 45 a 50 °C (Obr. 19), kdy byl stanoven nejvyšší nárůst aktivity 6 h od ukončení TS. Naopak v pozdější fázi (8 a 26 h) byl pozorován mírný pokles. V případě vystavení TS při 40 °C byl v rané fázi (2, 3 h) od ukončení TS pozorován pokles aktivity NADPH oxidasy, po 8 h byla detekována mírně zvýšená aktivita NADPH oxidasy v porovnání s kontrolním experimentem.



Obr. 19 Stanovení aktivity NADPH oxidasy v průběhu obranné odpovědi modelové rostliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na působení teplotního stresu. Vzorky byly odebírány v časech 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 hodinové expozici TS při 40, 45 nebo 50 °C. Aktivita enzymu byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 492 nm. Do reakce byl přidán XTT v koncentraci 1 mmol·l<sup>-1</sup> a koenzym NADPH v koncentraci 1 mmol·l<sup>-1</sup>. Aktivita NADPH oxidasy (nmol·min<sup>-1</sup>) byla přepočtena na 1 g čerstvé váhy a poté vztažena ke kontrolnímu nestresovanému vzorku.

## 4.2 Exprese genů zapojených do metabolismu RNS a ROS

Pro studium obranné reakce *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom po vystavení dvouhodinovému TS byla sledována exprese vybraných genů zapojených v metabolismu RNS a ROS metodou semikvantitativní PCR. Pro relativní zhodnocení změn exprese byly denzitometricky vyhodnoceny bandy příslušných PCR produktů po agarosové elektroforéze.

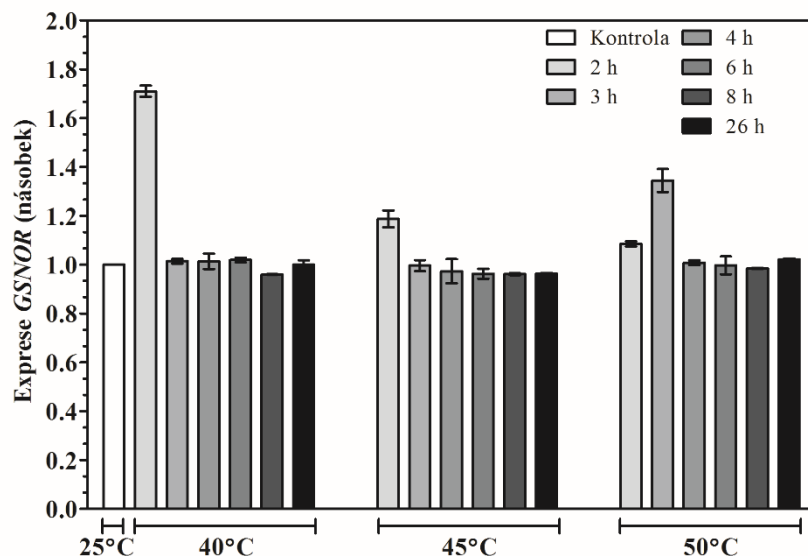
### 4.2.1 Exprese *GSNOR*

Zvýšená exprese *GSNOR* byla detekována v čase 2 h po ukončení TS. Nejintenzivnější změna byla pozorována po působení teploty 40 °C. V případě TS při 50 °C došlo k nejintenzivnějším změnám v expresi *GSNOR* v čase 3 h po ukončení TS. Výsledky exprese *GSNOR* semikvantitativní PCR metodou jsou uvedeny na Obr. 20 (a) a denzitometrické vyhodnocení intenzity bandů po agarosové elektroforéze je graficky znázorněno na Obr. 20 (b).

(a)



(b)

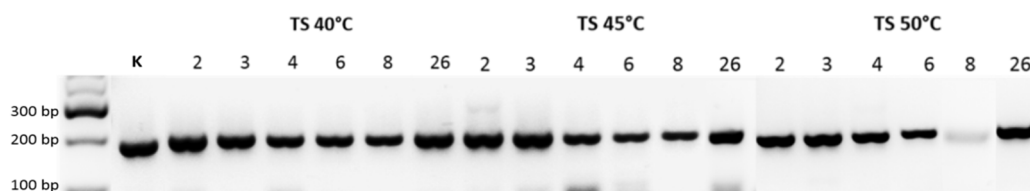


Obr. 20 Stanovení exprese *GSNOR* v průběhu obranné odpovědi modelové rostliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na působení teplotního stresu. Vzorky byly odebrány v časech 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozice TS při 40, 45 nebo 50 °C. (a) Agarosová elektroforéza po PCR. (b) Denzitometrické vyhodnocení intenzity bandů exprimované *GSNOR* v programu ImageJ.

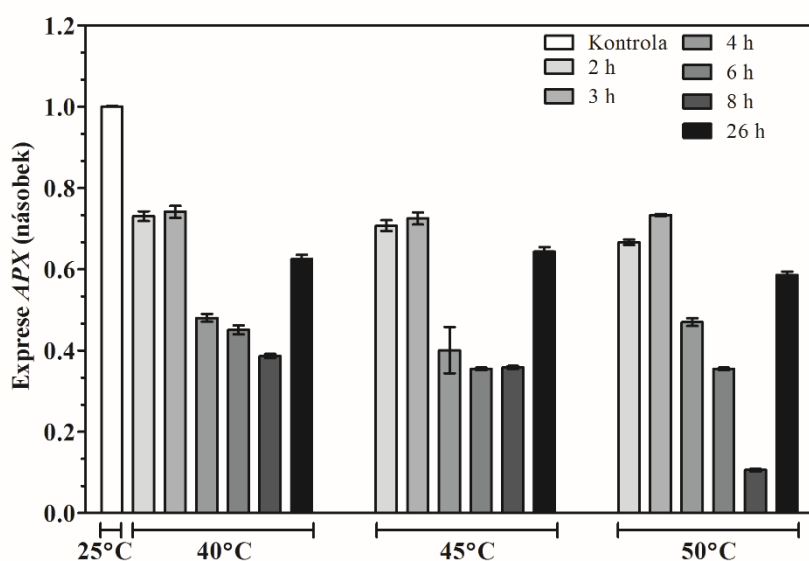
#### 4.2.2 Exprese *APX*

Na Obr. 21 můžeme pozorovat změny v expresi genu *APX* v různých fázích obranné reakce u rostlin rajčete *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po expozici TS. Pokles exprese *APX* byl detekován u rostlin po vystavení TS po celou dobu realizace experimentu (tj. v průběhu 26 h po aplikaci TS). Nejvyšší pokles exprese *APX* byl detekován 8 h po aplikaci stresu. U rostlin 26 h po aplikaci TS bylo naopak zaznamenáno významné zvýšení exprese *APX* v porovnání s rostlinami 8 h po působení TS. Denzitometrické vyhodnocení intenzity detekovaných bandů je graficky znázorněno na Obr. 21 (b). U vzorku vystaveného TS při 50 °C odebraného v čase 8 h došlo zřejmě k chybě při jeho přípravě. Z časových důvodů nebyl tento experiment zopakován.

(a)



(b)



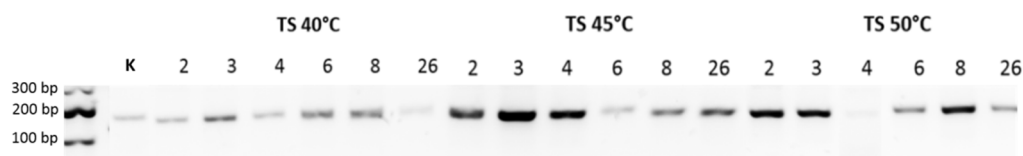
Obr. 21 Stanovení exprese *APX* v průběhu obranné odpovědi modelové rostliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na působení teplotního stresu. Vzorky byly odebírány v časech 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozice TS při 40, 45 nebo 50 °C. (a) Agarosová elektroforéza po PCR, (b) denzitometrické vyhodnocení exprese *APX* pomocí stanovení intenzity bandů v programu ImageJ.

#### 4.2.3 Expresa *NADPH oxidasy*

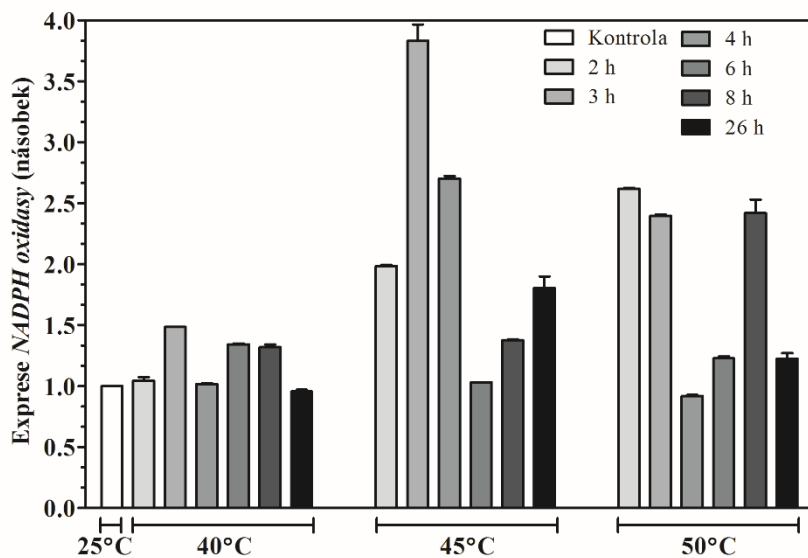
Na Obr. 22 jsou uvedeny výsledky stanovení změn v expresi *NADPH oxidasy* v listech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po expozici TS. K významnějším změnám na úrovni genové exprese *NADPH oxidasy* dochází vlivem teplotního stresu při 45 a 50 °C a to zejména v počáteční fázi obranné reakce (2, 3 h a. 4 h od ukončení TS). Denzitometrické vyhodnocení je znázorněné na Obr. 22 (b).



(a)



(b)

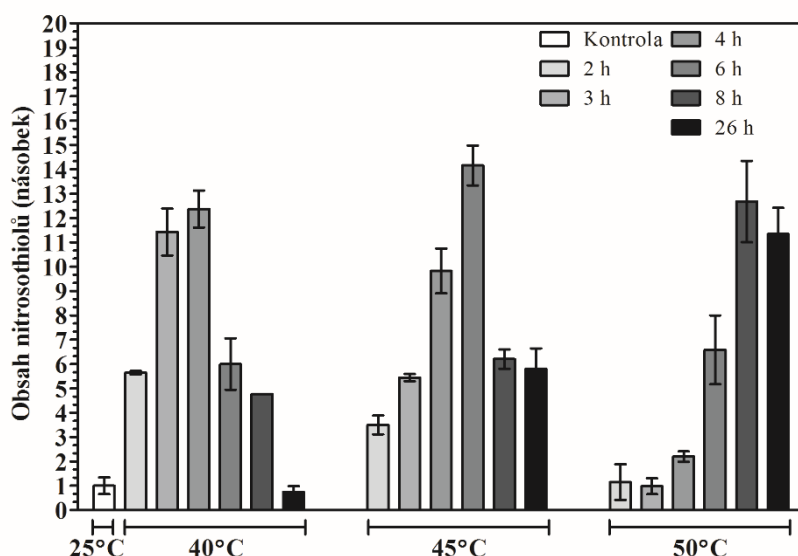


Obr. 21 Stanovení exprese *NADPH oxidasy* v průběhu obranné odpovědi modelové rostliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na působení teplotního stresu. Vzorky byly odebrány v časech 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozice TS při 40, 45 nebo 50 °C. (a) Agarosová elektroforéza po PCR, (b) denzitometrické vyhodnocení exprese *NADPH oxidasy* v programu ImageJ.

Pro kontrolu metody purifikace RNA a PCR byla v průběhu TS sledována exprese housekeeping (provozního) genu *EF-1 $\alpha$* .

#### 4.4 Stanovení koncentrace RSNO

Na Obr. 23 je graficky znázorněn nárůst hladiny RSNO v listech rajčete Micro-Tom v průběhu obranné reakce po vystavení TS při 40, 45 a 50 °C. Nárůst obsahu proteinových RSNO (v  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteinu) byl vztažen jako násobek ke kontrolnímu nestresovanému vzorku. Po aplikaci TS došlo k významnému zvýšení tvorby RSNO. Nejvyšší produkce RSNO byla zaznamenána 4 h po vystavení rostlin teplotě 40 °C, 6 h po vystavení rostlin teplotě 45 °C a 8 h po vystavení rostlin teplotě 50 °C. Po té byl zaznamenán pokles hladiny RSNO ve stresovaných rostlinách. V případě teplotního stresu při 40 °C byla hladina RSNO ve stresované rostlině po 26 h po ukončení TS srovnatelná s kontrolní rostlinou.

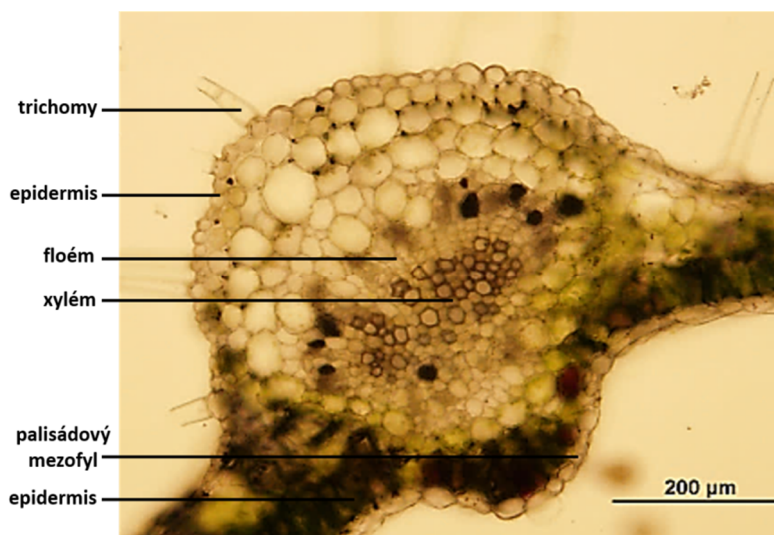


Obr. 23 Stanovení obsahu proteinových RSNO v průběhu obranné odpovědi u modelové rostliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na působení teplotního stresu. Vzorky byly odebírány v časech 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozice TS při 40, 45 nebo 50 °C. Hladina RSNO byla stanovena Savillovou metodou.

#### 4.5 Mikroskopická detekce GSNOR, ROS, NO a RSNO

V řezech listu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom byla pomocí fluorescenční mikroskopie imunohistochemicky detekována přítomnost GSNOR. Dále byly v řezech histochemicky detekovány ROS, NO a RSNO. Rostliny byly vystaveny 2 h působení

teploty 40 °C. Poté byly připraveny příčné řezy listu v časech 2 a 3 h po expozici TS. Obr. 24 je popsána anatomie příčného řezu hlavním cévním svazkem listu.



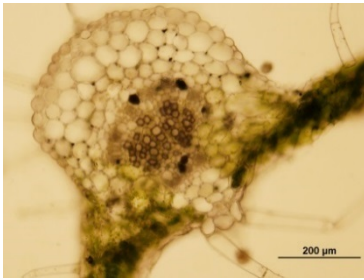
Obr. 24 Anatomie řezu hlavním cévním svazkem listu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Měřítko 200  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5.1 Imunohistochemická detekce GSNOR

Využitím imunohistochemické detekce byla v příčných řezech listu lokalizována GSNOR. Detekce byla realizovaná s využitím králičí primární protilátky anti-SIGSNOR (Kubienová *et al.*, 2013) ředěné 1:100 a anti-králičí sekundární protilátky konjugované s fluorescenční značkou DyLight® 488 (ředění 1:1000). Odpovídající zelený fluorescenční signál byl detekován pomocí fluorescenční mikroskopie. Jako kontrolní vzorky sloužily řezy nestresovaných rostlin. Jako negativní kontrola sloužily řezy, které byly inkubovány pouze se sekundární protilátkou.

V řezech listů připravených 2 h po ukončení TS byl v buňkách cévního svazku detekován fluorescenční signál (Obr. 25). V řezech kontroly a negativní kontroly nebyl detekován žádný signál (Obr. 25).

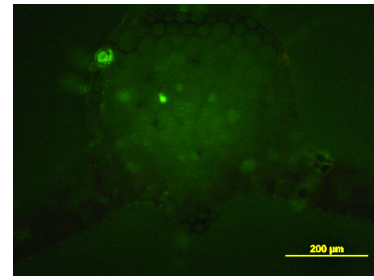
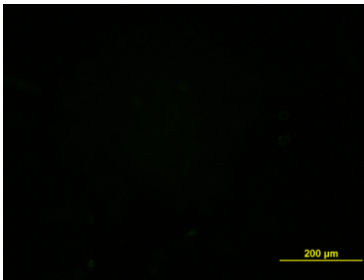
Kontrola



Negativní kontrola

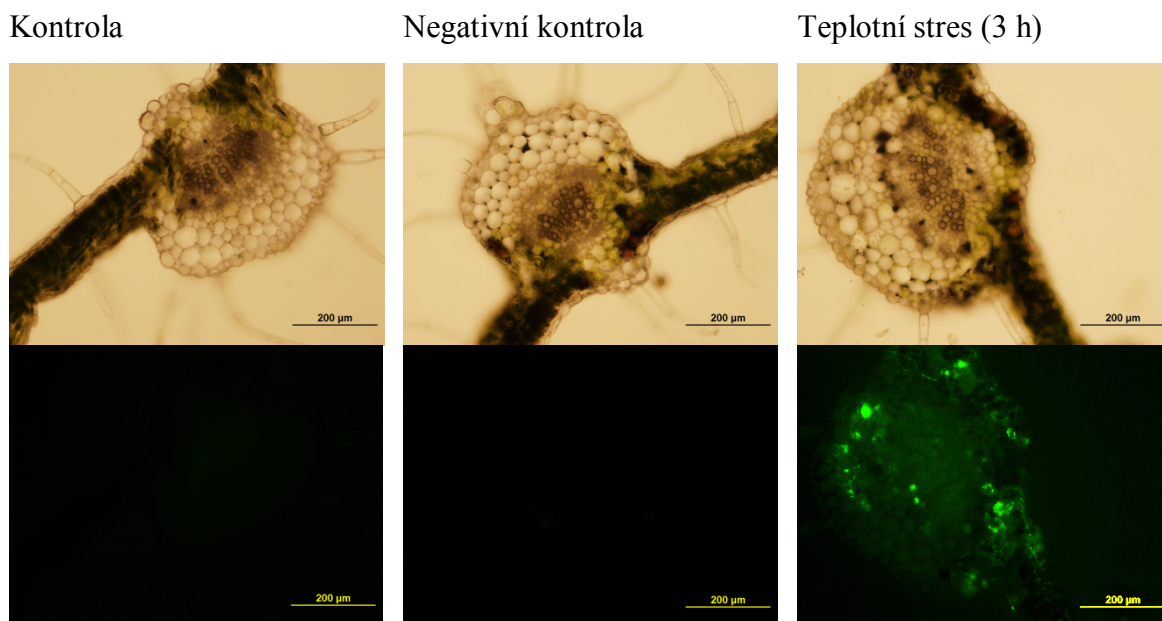


Teplotní stres (2 h)



Obr. 25 Imunolokalizace GSNOR v příčných řezech listu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom 2 h po vystavení TS při 40 °C. Primární protilátka anti-SIGSNOR (1:100), sekundární protilátka konjugovaná s DyLight® 488 (1:1000). První řada obrázků je pořízena ve viditelném světle, druhá řada obrázků znázorňuje detekci signálu s použitím fluorescenčního hranolu U-MWB2. Měřítka 200 μm.

V řezech listů připravených 3 h po ukončení TS byl zaznamenán fluorescenční signál v buňkách cévního svazku (Obr. 26). Největší intenzita signálu byla pozorována především v epidermálních buňkách. V řezech kontroly a negativní kontroly nebyl zaznamenán žádný signál (Obr. 26).

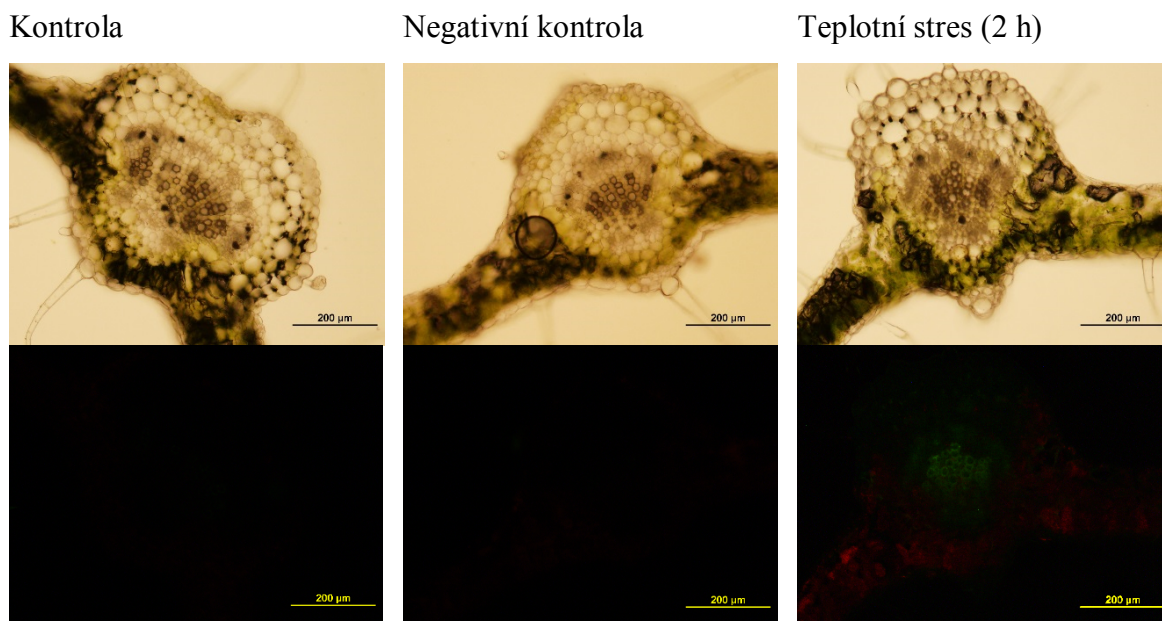


Obr. 26 Imunolokalizace GSNOR v příčných řezech listu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom 3 h po vystavení TS při 40 °C. Primární protilátka anti-SIGSNOR (1:100), sekundární protilátka konjugovaná s DyLight® 488 (1:1000). První řada obrázků je pořízena ve viditelném světle, druhá řada obrázků znázorňuje detekci signálu s použitím fluorescenčního hranolu U-MWB2. Měřítka 200 µm.

#### 4.5.2 Lokalizace RSNO

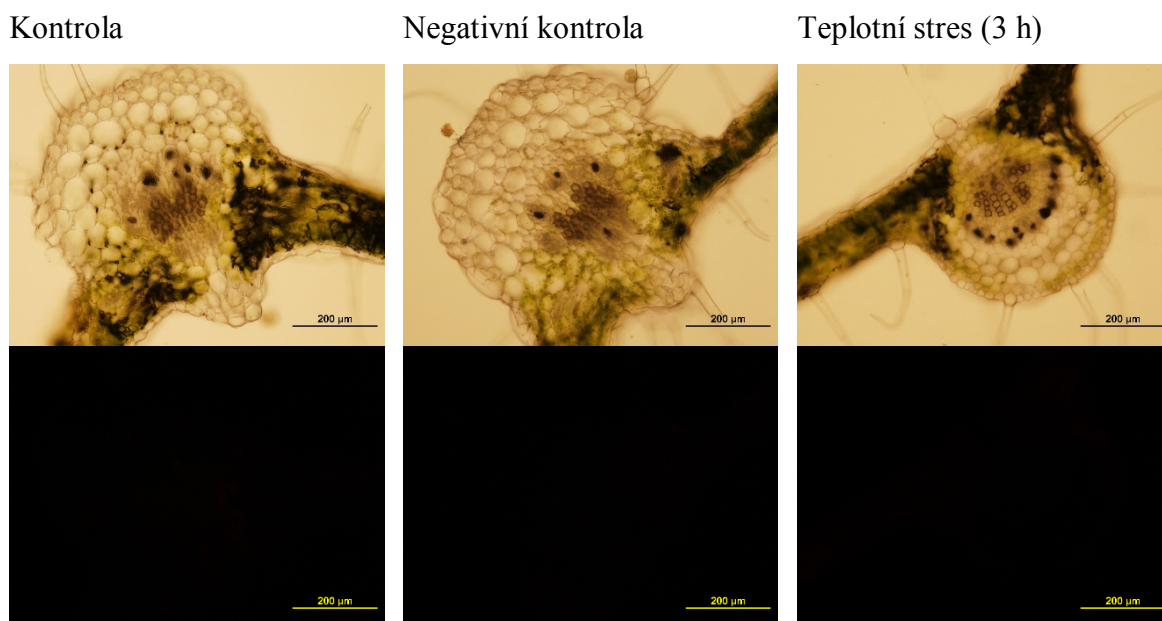
Histochemickou detekcí byly v příčných řezech listu stresovaných rostlin lokalizovány RSNO. Detekce byla realizovaná s využitím fluorescenční sondy Alexa Fluor® 488 C<sub>5</sub> Maleimid (Af-M; 10 µmol·l<sup>-1</sup>). Signál byl zachycen pomocí fluorescenční mikroskopie. Jako kontrolní vzorky sloužily řezy nestresovaných rostlin a jako negativní kontrola sloužily řezy neinkubované s Af-M. V řezech listů připravených 2 h po ukončení TS při 40°C byl zaznamenán velmi slabý signál v buňkách cévního svazku (Obr. 27).





Obr. 27 Lokalizace RSNO v příčných řezech listu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom v čase 2 h po ukončení TS při 40 °C. Fluorescenční sonda Af-M byla použita v koncentraci 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . První řada obrázků je pořízena ve viditelném světle, druhá řada obrázků znázorňuje detekci signálu s použitím fluorescenčního hranolu U-MWB2. Měřítko 200  $\mu\text{m}$ .

U řezů připravených 3 h po vystavení TS při 40 °C nebyl detekován žádný signál (Obr. 28).

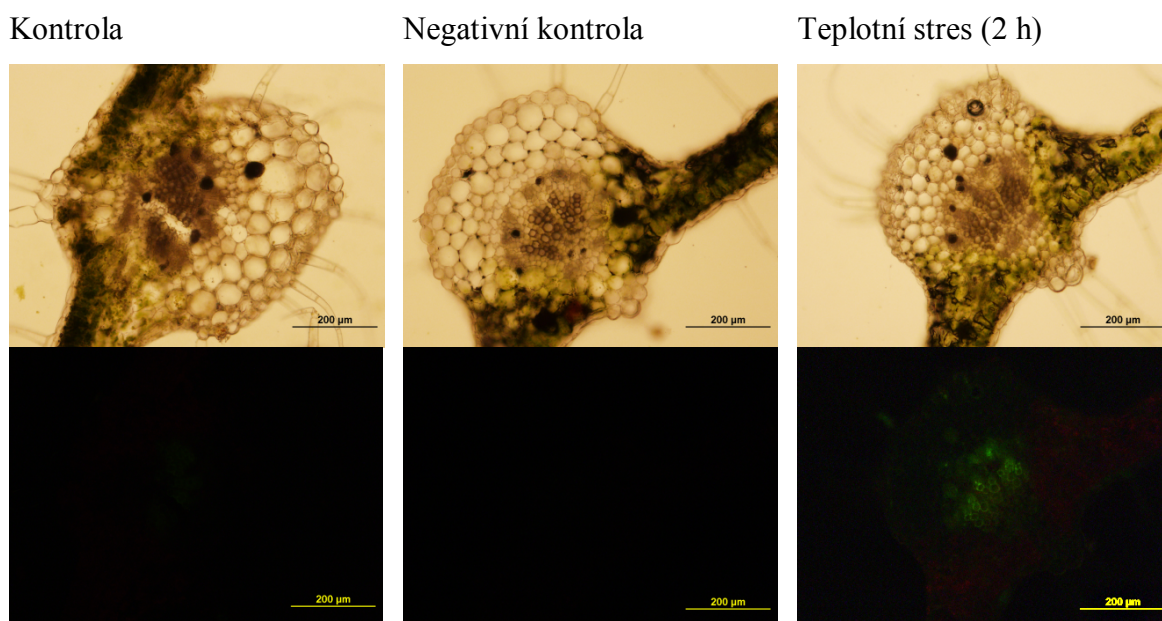


Obr. 28 Lokalizace RSNO v příčných řezech listu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom v čase 3 h po ukončení TS při 40 °C. Fluorescenční sonda Af-M byla použita v koncentraci 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . První řada obrázků je pořízena ve viditelném světle, druhá řada obrázků znázorňuje detekci signálu s použitím fluorescenčního hranolu U-MWB2. Měřítko 200  $\mu\text{m}$ .

### 4.5.3 Lokalizace NO

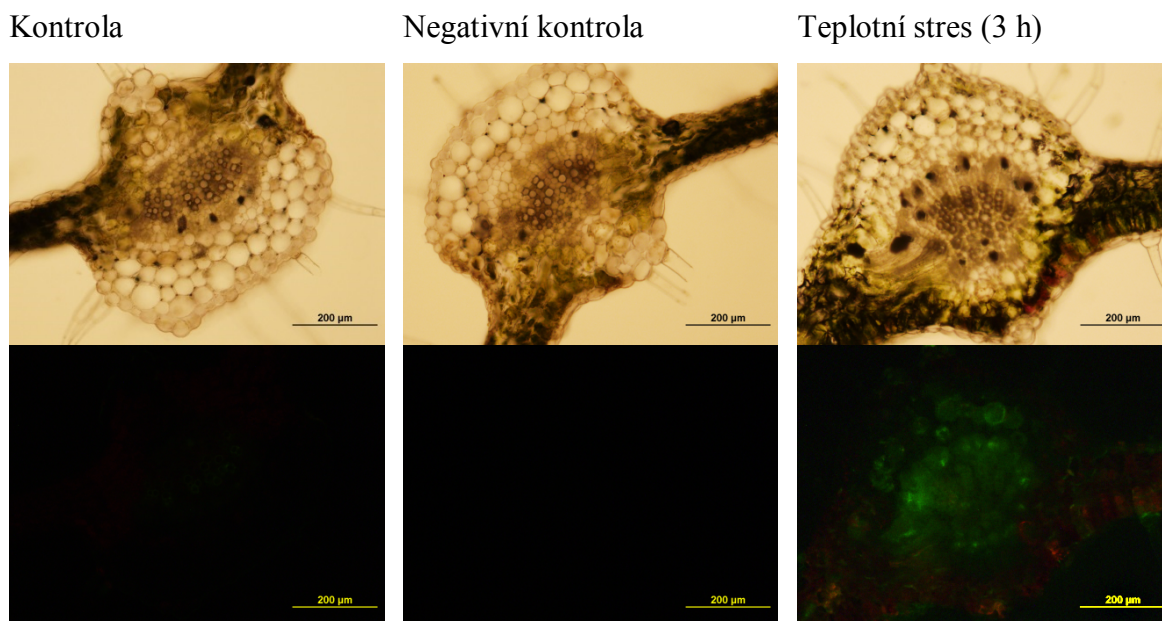
Histochemickou detekcí použitím fluorescenční sondy DAF-FM DA ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byl v příčných řezech listu rajčete cv. Micro-Tom lokalizován NO. Rostliny byly stresovány 2 h při teplotě  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  a příčné řezy listů byly připraveny v časech 2 a 3 h po expozici TS. Jako kontrolní vzorky sloužily řezy nestresovaných rostlin a jako negativní kontrola řezy inkubované 10 min s  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  cPTIO (lapač NO).

U řezů připravených 2 h po vystavení TS při  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  byl zaznamenán velmi slabý signál v xylémových buňkách (Obr. 29).



Obr. 29 Lokalizace NO v příčných řezech listu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom v čase 2 h po ukončení TS při  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Fluorescenční sonda Af-M byla použita v koncentraci  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . První řada obrázků je pořízena ve viditelném světle, druhá řada obrázků znázorňuje detekci signálu s použitím fluorescenčního hranolu U-MWB2. Měřítka  $200 \mu\text{m}$ .

U řezů připravených 3 h po vystavení TS při  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  byl detekován signál v buňkách cévního svazku (Obr. 30). Nejintenzivnější odezvu můžeme pozorovat v buňkách xylému i floému.



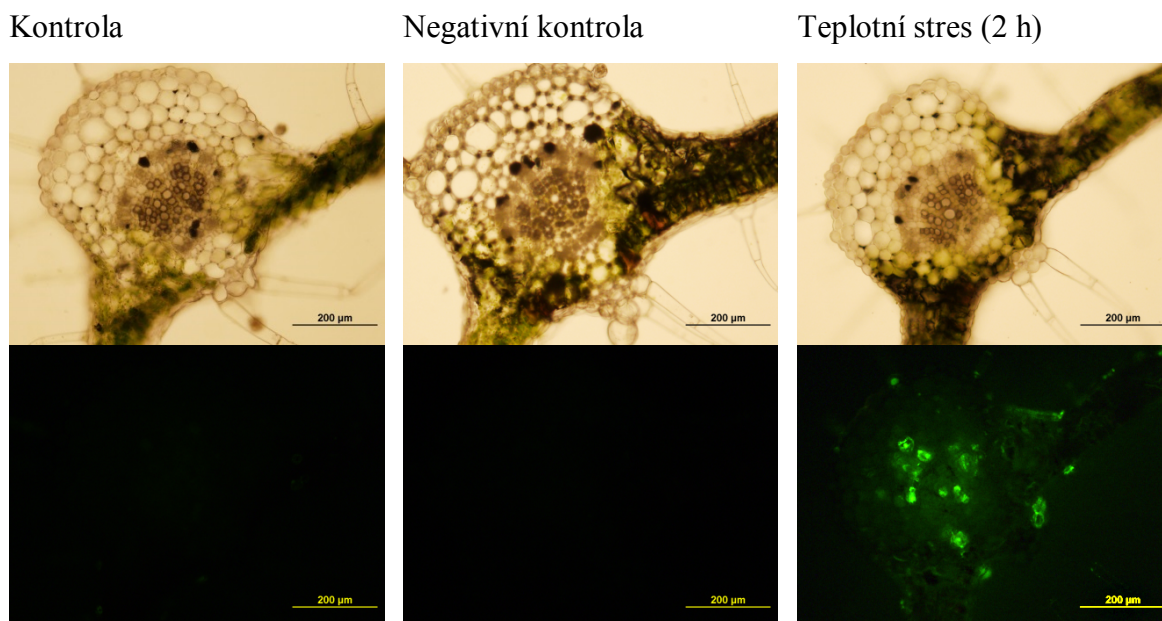
Obr. 30 Lokalizace NO v příčných řezech listu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom v čase 3 h po končení TS při 40 °C. Fluorescenční sonda Af-M byla použita v koncentraci 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . První řada obrázků je pořízena ve viditelném světle, druhá řada obrázků znázorňuje detekci signálu s použitím fluorescenčního hranolu U-MWB2. Měřítko 200  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5.4 Lokalizace ROS

Prostřednictvím histochemické detekce byly lokalizovány ROS v příčných řezech listu rajčete cv. Micro-Tom. Využitím fluorescenční sondy  $\text{H}_2\text{DCF DA}$  v koncentraci 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byl zachycen signál pomocí fluorescenční mikroskopie. Rostliny byly stresovány 2 h při teplotě 40 °C a příčné řezy listů byly připraveny v časech 2 a 3 h po expozici TS. Jako kontrolní vzorky sloužily řezy nestresovaných rostlin a jako negativní kontrola sloužily řezy inkubované s 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  askorbátem.

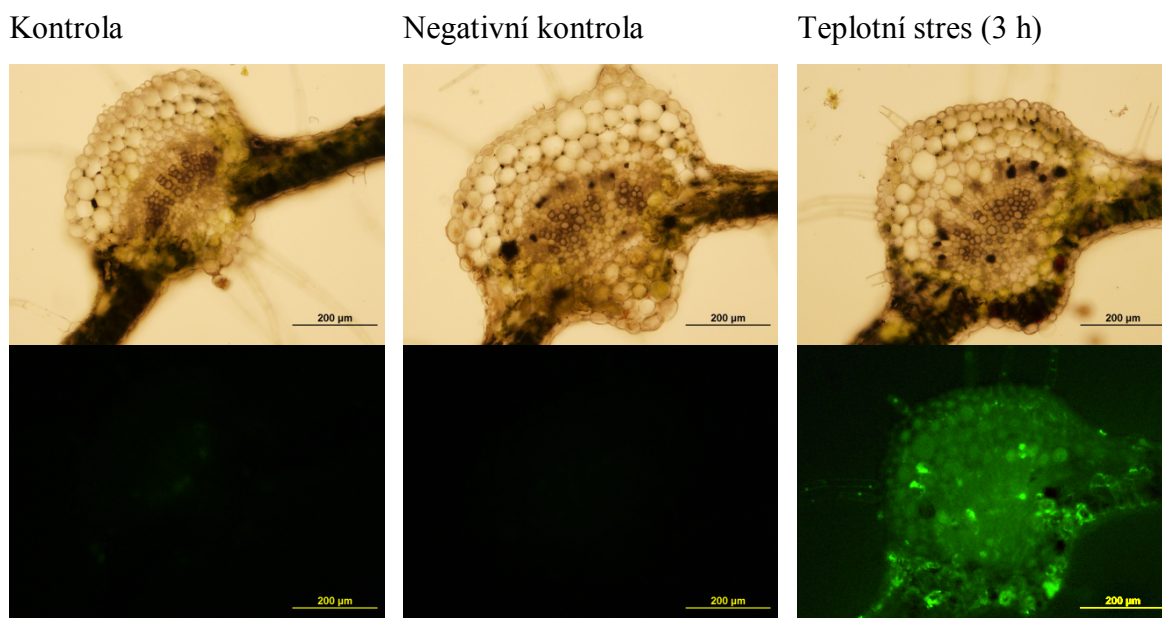
U řezů připravených 2 h po vystavení TS při 40 °C byl detekován slabý signál v buňkách cévního svazku (Obr. 31).





Obr. 31 Lokalizace ROS v příčných řezech listu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom v čase 2 h po ukončení TS při 40 °C. Fluorescenční sonda H<sub>2</sub>DCF-DA byla použita v koncentraci 10 μmol·l<sup>-1</sup>. První řada obrázků je pořízena ve viditelném světle, druhá řada obrázků znázorňuje detekci signálu s použitím fluorescenčního hranolu U-MWB2. Měřítka 200 μm.

V řezech připravených 3 h po vystavení TS při 40 °C byl zaznamenán intenzivnější signál. Přítomnost ROS byla pozorována ve všech buňkách. Slabý signál byl pozorován i u kontrolních nestresovaných rostlin.

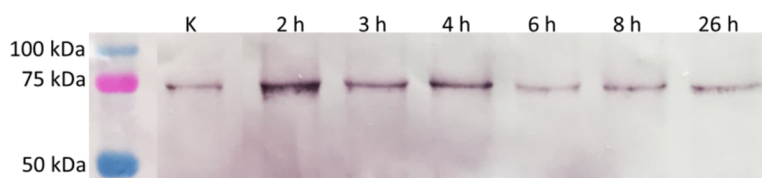


Obr. 32 Lokalizace ROS v příčných řezech listu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom v čase 3 h po ukončení TS při 40 °C. Fluorescenční sonda H<sub>2</sub>DCF-DA byla použita v koncentraci 10 μmol·l<sup>-1</sup>. První řada obrázků je pořízena ve viditelném světle, druhá řada obrázků znázorňuje detekci signálu s použitím fluorescenčního hranolu U-MWB2. Měřítka 200 μm.

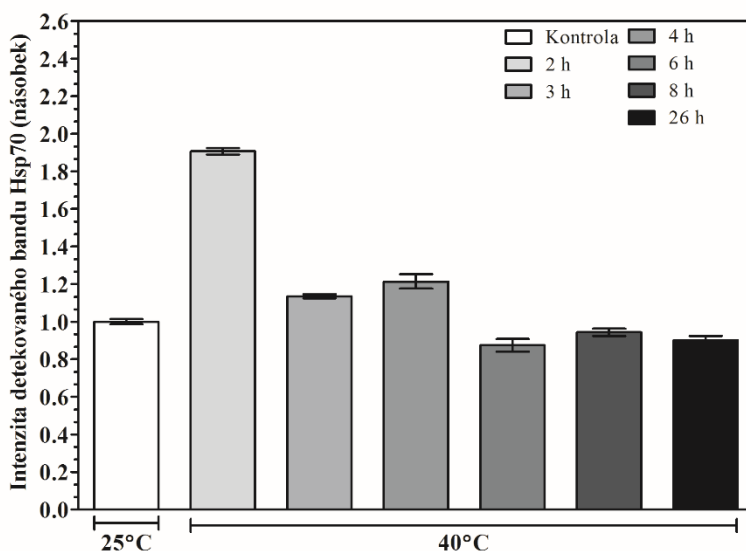
## 4.6 Detekce Hsp70

V rámci obranné reakce vůči vysokým teplotám dochází v rostlinných buňkách ke zvýšené syntéze Hsp proteinů. Významnou skupinou Hsp proteinů indukovaných teplotním stresem jsou Hsp70. V předložené diplomové práci byla provedena imunochemická detekce této skupiny proteinů pomocí metody Western blot (Obr. 33). Pro detekci byly použity listy *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom stresovaných 2 h při teplotě 40 °C. Vzorky byly odebrány v časech 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozice TS při 40 °C. Na Obr. 33 je znázorněna imunohistochemická detekce Hsp70. Intenzita bandů Hsp70 se vzrůstajícím časem po vystavení TS klesá (Obr. 33 (b)), což naznačuje intenzivní syntézu této skupiny proteinů v rané fázi obranné reakce rostlin a naopak, pokles jejich syntézy v pozdější fázi.

(a)



(b)

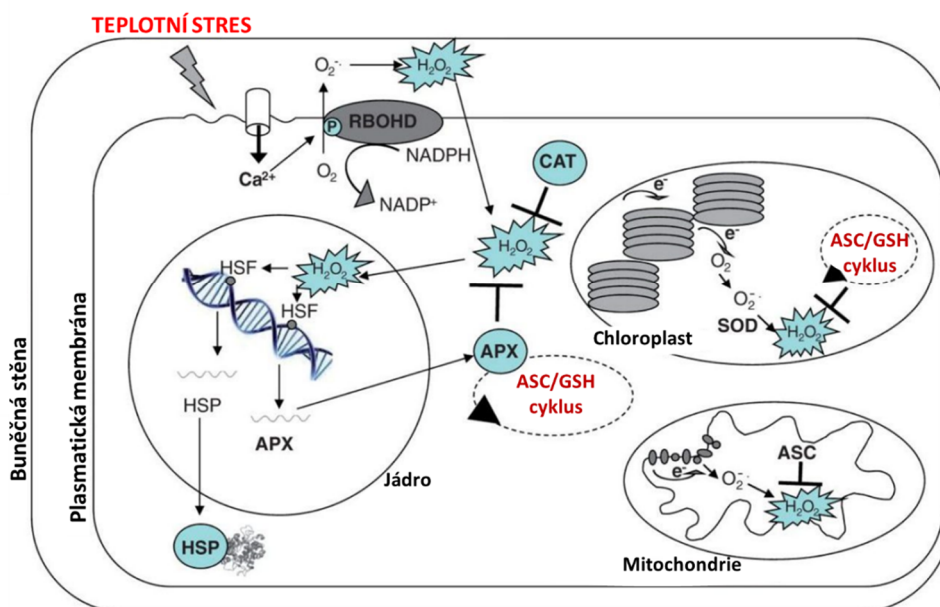


Obr. 33 Detekce Hsp70 v průběhu obranné odpovědi na působení TS u rajčete *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. (a) Imunochemická detekce Hsp70 u vzorků, které byly odebírány v časech 2, 3, 4, 6, 8, 26 h po 2 h expozice TS při 40 °C. Do jamek bylo naneseno 25 µl nepřečištěného extraktu. Primární myší monoklonální anti-Hsp70 protilátka byla ředěna v poměru 1:500, kozí sekundární anti-myší IgG protilátka značená AP byla ředěna 1:1000. (b) Densitometrické vyhodnocení intenzity detekovaného bandu Hsp70 v programu ImageJ.

## 5 Diskuze

Rostliny jsou neustále vystavovány měnícím se okolním podmínkám, které způsobují změny jejich metabolických procesů ve snaze zachovat nejen rovnováhu mezi produkcí a výdejem energie, ale i udržování redoxní rovnováhy (Suzuki *et al.*, 2011). Pokud dochází k trvalému působení nevhodných podmínek okolního prostředí, které narušují normální metabolismus, růst a vývoj rostlin, označujeme tento stav jako stres, který může v závislosti na své intenzitě vyústit až v poškození jednotlivých orgánů či uhynutí rostliny (Boguszewska & Zagdanska, 2012). Jako tzv. abiotický stres je označováno působení extrémních klimatických podmínek (chlad, horko, sucho) či nevhodné složení půdy (zasolení, nedostatek živin, polutanty). U zemědělsky významných plodin dochází pod vlivem těchto podmínek k omezení jejich vegetativního či reprodukčního růstu, což způsobuje nižší výnos a může vést ke značným ekonomickým ztrátám (Lawlor & Cornic, 2002). Extrémní teploty (vysoká teplota či chlad) jsou považovány za nejdůležitější faktory, které limitují růst rostlin (Suzuki *et al.*, 2011; Bitá & Gerats, 2013). Působení vysoké teploty významně ovlivňuje v rostlinných buňkách metabolické pochody (zejména fotosyntézu a respiraci), moduluje hladiny rostlinných hormonů, primárních i sekundárních metabolitů, stabilitu buněčných membrán či narušuje vodní bilanci rostlin (Hemantaranjan *et al.*, 2014). Typickou reakcí rostlin na působení vysoké teploty je tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), exprese řady tzv. heat shock proteinů či jiných stresem-indukovaných proteinů účastnících se obranné reakce (Saidi *et al.*, 2011; Hasanuzzaman *et al.*, 2013a). Vlivem teplotního stresu (TS) dochází k prudké přechodné tvorbě ROS, označované jako tzv. oxidativní stres, jejímž nejtypičtějším projevem je peroxidace nenasycených mastných kyselin zejména v buněčných membránách, oxidativní poškození DNA a RNA či oxidace proteinů (Sharkey, 2005; Suzuki *et al.*, 2012). V experimentální části předložené diplomové práce byl studován vliv expozice TS při 40, 45 a 50 °C po dobu 2 h na obranné mechanismy rajčete *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Rozmezí teplot 38–45 °C je obvykle používáno ve studiích vlivu TS u *Solanum* spp. (Byth *et al.*, 2001; Alamillo *et al.*, 1995; Snyman & Cronjé, 2008; Piterková *et al.*, 2013; Kubienová *et al.*, 2013). Signifikantní změny v produkci Hsp70, jejichž zvýšenou syntézu vyvolává působení TS, byly detekovány po expozici listových disků či celých rostlin genotypů rajčete (*S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*) po inkubaci při 40 °C po dobu 2 h (Piterková *et al.*, 2013; Kubienová *et al.*, 2013). Zvýšená akumulace Hsp70

byla za těchto podmínek pozorována u špenátu, pepře, pomeranče a rajčete *S. lycopersicum* cv. Daniella (Garavaglia *et al.*, 2009, Li *et al.*, 1999, Alamillo *et al.*, 1995). Podobně, v předložené diplomové práci bylo ověřeno, že TS při 40 °C po dobu 2 h má významný vliv na produkci Hsp70 proteinů (Obr. 33).



Obr. 33 Redoxní systémy zapojené v obranné reakci při působení TS. Percepce signálu působení zvýšené teploty na plasmatické membráně aktivuje  $\text{Ca}^{2+}$  kanál s následným zvýšením hladin  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu. Influx  $\text{Ca}^{2+}$  aktivuje NADPH oxidasu (RBOHD) jeho fosforylací, což vede ke zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Při teplotním stresu se produkce ROS zvyšuje také v chloroplastech a mitochondriích. Peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) působí jako druhý posel a v jádře aktivuje expresi obranných genů kódujících např. heat shock proteiny (HSP) či cytosolární askorbátperoxidasu (APX). Další redoxní enzymy, jako je například superoxiddismutasa (SOD), katalasa (CAT) a enzymy askorbát-glutathionového cyklu (ASC-GSH), pracují v různých buněčných kompartmentech, aby udržely příslušné hladiny ROS (převzato z Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

Vlivem TS dochází u rostlin k poškození řady fyziologických procesů (Halliwell, 1996). Hydroxylové radikály mohou potenciálně reagovat se všemi biomolekuly, jako jsou pigmenty, proteiny, lipidy a DNA, a téměř se všemi složkami buněk (Moller *et al.*, 2007; Karuppanapandian *et al.*, 2011a). Singletový kyslík může přímo oxidovat proteiny, polynenasycené mastné kyseliny a DNA (Karuppanapandian *et al.*, 2011b; Huang *et al.*, 2008). TS může indukovat oxidační stres přes peroxidaci membránových lipidů a narušit stabilitu buněčné membrány díky denaturaci

membránových proteinů (Rodríguez *et al.*, 2005; Camejo *et al.*, 2006). Funkční pokles fotosyntetické světelné reakce při TS byl pozorován díky produkci ROS způsobující zvýšený únik elektronů z thylakoidní membrány (Bavita *et al.*, 2012). TS vyvolává akumulaci ROS na vnějším povrchu plasmatické membrány, což může způsobit její depolarizaci a zvýšení aktivity enzymu NADPH oxidasy (Obr. 32) k níž dochází fosforylací prostřednictvím kalcium-dependentních proteinkinás (CDPK) a aktivaci způsobuje přímé navázání  $\text{Ca}^{2+}$  (Miller *et al.*, 2009). V extrémních případech TS může akumulace ROS způsobit programovanou buněčnou smrt (Suzuki *et al.*, 2011). Akumulaci  $\text{H}_2\text{O}_2$  lze potlačit aplikací inhibitoru enzymu NADPH oxidasy u *Arabidopsis* a tabákových buněčných kulturách, což naznačuje, že NADPH oxidasa má ústřední úlohu v signálních dráhách a mechanismech termotolerance (Larkindale *et al.*, 2005; Volkov *et al.*, 2006; Koenigshofer *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2009). K produkci ROS během TS dochází také v mitochondriích, což bylo potvrzeno v tabákových buňkách, u nichž byla TS indukována buněčná smrt a poškození mitochondriálního metabolismu (Vacca *et al.*, 2004; Valenti *et al.*, 2007). Histochemickou detekcí ROS a stanovením aktivity a exprese enzymu NADPH oxidasy jsme prokázali, že vlivem TS dochází k intenzivní produkci ROS a tedy i oxidativnímu stresu v různých časových stádiích obranné reakce *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom (Obr. 31, 32, 19, 22).

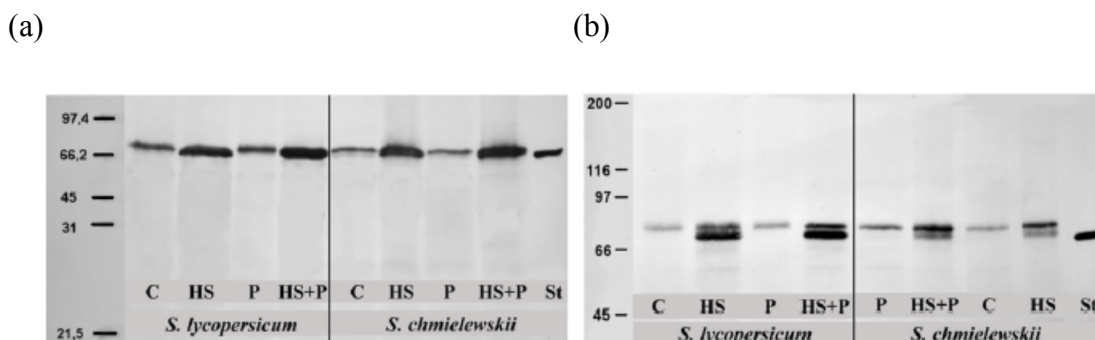
Rostliny mají velmi důmyslně vyvinuty účinné obranné mechanismy pro jejich přežití před oxidačním stresem indukovaným vysokými teplotami. Tolerance rostlin vůči TS bývá často spojena se zvýšením antioxidační kapacity díky enzymatickým i neenzymatickým detoxifikačním systémům (Almeselmani *et al.*, 2006; Babu *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 1997; Dat *et al.*, 1998). Aktivita řady antioxidačních enzymů je citlivá vůči teplotě. Chakraborty a Pradhan (2011) uvádí, že katalasa (CAT), askorbátperoxidasa (APX) a superoxidodismutasa (SOD) vykazují zvýšení své enzymové aktivity při TS v rozsahu 35-40 °C u semenáčků čočky, avšak při teplotě 50 °C jejich aktivita klesá. V případě peroxidasy (POX) a glutathionreduktasy (GR) byl pozorován pokles aktivity v rozmezí TS od 20 do 50 °C. Vlivem TS došlo ke snížení aktivity antioxidačních enzymů a zvýšení produkce malondialdehydu (MDA) v listech rýže (Hurkman *et al.*, 2009). U čiroku, vystavenému TS 40/30 °C, den/noc, došlo ke zvýšení poškození buněčné membrány a obsahu MDA o 110% a 75%, což bylo doprovázeno zvýšeným obsahem  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (124 % a 43 %) (Mohammed & Tarpley, 2010). U pšenice exponované 33 °C po dobu 2 dní došlo k inhibici růstu kořenů, která byla

korelována se silným oxidačním stresem, což je patrné z výrazného zvýšení (68 %) produkce  $O_2^-$  v kořenových buňkách. Obsah MDA také vzrostl o 27 % v 2 dny po expozici TS v počátečních stádiích vývoje semenáčků a tento trend pokračoval i v pozdějších fázích vývoje, kdy byl pozorován nárůst obsahu MDA o 58 % (Savicka & Škute, 2010). V listech dvou genotypů pšenice s rozdílnou tolerancí vůči TS bylo zjištěno, že TS způsobil akumulaci GSH a zvýšil aktivitu enzymů podílejících se na jeho syntéze a došlo tak ke zvýšení poměru GSH/GSSG (Kocsy *et al.*, 2002). Balla *et al.*, 2009 rovněž demonstroval význam antioxidačního enzymatického systému při obraně vůči TS (35/20 °C, den/noc) v zrnech pšenice ozimé. Aktivita enzymů glutathion-S-transferasy (GST), APX a CAT byla zvýšená, což svědčí o zvýšené toleranci vůči TS. Dále bylo zjištěno, že zvýšená tolerance odrůd pšenice koreluje s nárůstem hladiny antioxidantů askorbátu (AsA) a GSH. Rani *et al.*, 2013 exponovali 5 denní termotolerantní genotyp brukve sítinovité BPR-542-6 a citlivý genotyp NPJ-119 TS při 45,0 ± 0,5 °C. Pozorovali zvýšení aktivity SOD, POX, CAT, APX a GR vlivem TS, které bylo výrazně vyšší u tolerantního genotypu. Vyšší bazální aktivita všech antioxidačních enzymů s výjimkou CAT byla nalezena u tolerantního genotypu. Po 24 h byly rostliny opět kultivovány za normálních podmínek (25,0 ± 0,5 °C) a byl pozorován pokles aktivity SOD a CAT. Nicméně u obou genotypů docházelo ke zvýšení aktivity POX a GR. Aktivita APX vykazovala rozdílný trend, u tolerantního genotypu se zvyšovala, u citlivého genotypu naopak začala klesat. Kumar *et al.*, 2012 studovali reakci na TS u různých genotypů rýže a kukuřice se zaměřením na úlohu antioxidačního obranného systému. Pozorovali, že exprese CAT, APX a GR byla vyšší u genotypů kukuřice ve srovnání s genotypy rýže, zatímco u SOD nedošlo po expozici 45/40 °C k žádným změnám exprese. Hladiny antioxidantů AsA a GSH byly vyšší u kukuřice vystavené teplotám 45 a 40 °C. V listech modelových rostlin rajčete *S. lycopersicum* byly sledovány změny aktivity antioxidačních enzymů u semenáčků kultivovaných v režimu 38/28 °C den/noc po dobu 7 dní a současně byl sledován vliv exogenně aplikovaného spermidinu (Spd) (Sang *et al.*, 2016). TS výrazně inhiboval růst rostlin a byl snížen i obsah chlorofylu. Exogenní aplikace 1 mM Spd na listy zmírnila inhibici růstu vyvolaného TS. Vlivem TS byly výrazně zvýšeny hladiny MDA,  $H_2O_2$  i produkce  $O_2^-$ , které byly sníženy aplikací Spd. Aktivity i exprese enzymů SOD, POX, CAT, APX, GR, MDAR a DHAR byly významně sníženy působením TS. Byly rovněž stanoveny zvýšené hladiny AsA, GSSG. Po aplikaci Spd bylo pozorováno zvýšení aktivity i exprese antioxidačních enzymů, hladiny antioxidantů i endogenních polyaminů



v listech rajčete vystavených TS. Tyto výsledky naznačují, že Spd ovlivňuje endogenní hladiny polyaminů a zmírňuje poškození buněk díky oxidačnímu stresu, a to zvyšováním antioxidační kapacity (Sang *et al.*, 2016). Výsledky stanovení APX aktivity i exprese ukazují, že vlivem TS dochází u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom k poklesu antioxidační funkce APX a tím i k většímu rozvoji oxidativního stresu (Obr. 18, 21).

Je známo, že TS způsobuje denaturaci nebo agregaci proteinů, což může vést až k buněčné smrti. Další z obranných reakcí rostlin je zvýšení exprese heat shock proteinů (Hsp) (Lindquist & Craig, 1988; Parsell & Lindquist, 1993). U vyšších rostlin je produkce Hsp indukována teplotami okolo 38 – 40 °C (Iba, 2002). Nejdůležitější třídu Hsp představují Hsp70. Podílí se na ochraně proteinů před agregací, jsou zapojeny do skládání a tvorby nativní konformace řady proteinů. Také se účastní transportních procesů, usnadňují proteolytickou degradaci nestabilních proteinů v lysozomech či proteasomu (Frydman, 2001; Hartl, 1996; Iba, 2002). Bylo rovněž popsáno zapojení Hsp70 do transportu a translokace proteinů v chloroplastech a mitochondriích (Huang *et al.*, 1999; Zhang & Glaser, 2002) či do mezibuněčného transportu proteinů přes plasmodesmata (Aoki *et al.*, 2002). Na pracovišti KBC PřF UP byl studován vliv krátkodobého TS (40 °C po dobu 2 h) a patogeneze *P. neolycopersici* na produkci signálních molekul NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a Hsp70 u dvou rozdílných genotypů rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. chmielewskii*. Experiment byl realizován na celých rostlinách či listových discích, u nichž byl navíc testován vliv mechanického poškození pletiva na produkci Hsp70 při působení TS. Nárůst produkce Hsp70 byl detekován u listových disků jako důsledek mechanického poškození rostlinného pletiva. Po vystavení TS byl pozorován další významný nárůst produkce Hsp70. Pomocí metody Western blot byl prokázán vliv TS, patogeneze a jejich kombinace a regulační vliv ROS a RNS na expresi Hsp70. Byly detekovány dva proteiny rodiny Hsp70 lišící se svou MW: teplotně-inducibilní protein Hsp72 a konstitutivně exprimovaný protein Hsp75. Mechanické poškození a patogeneze způsobily zvýšení exprese Hsp75, teplotní stres indukoval produkci Hsp72 (Obr. 34). Byla nalezena korelace mezi působením ROS a RNS a expresí Hsp70 (Piterková *et al.*, 2013).



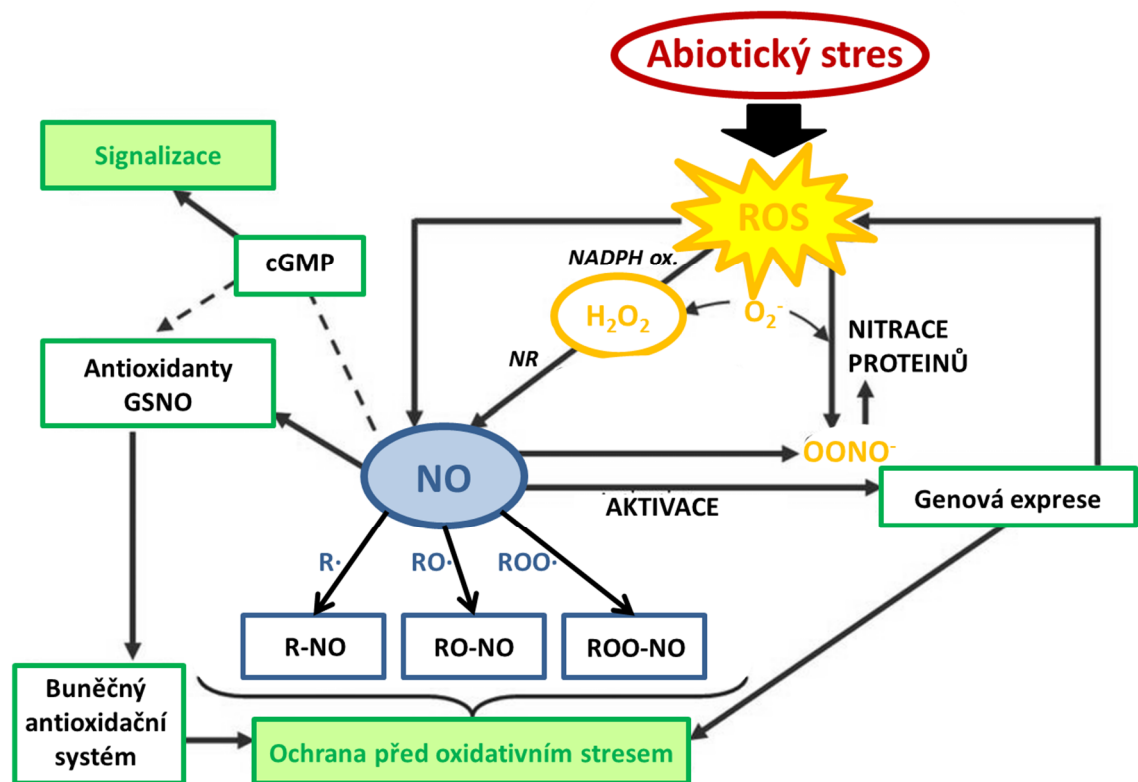
Obr. 34 Analýza exprese Hsp70 metodou Western blot na 10% (A) a 7% (B) polyakrylamidových gelech. V levé části každého blotu jsou uvedeny standardy MW o velikosti 21,5-31-45-66,2-97,4 kDa (A) a 45-66-97-116-200 kDa (B). Byly použity extrakty z listových disků po 24 h od zahájení experimentu. (A) zleva: 1.) kontrola (C) mechanický stres (20 °C), 2.) listový disk vystavený TS (2 h, 40 °C), 3.) listový disk infikovaný *P. neolyopersici* (20 °C), 4.) listový disk vystavený TS a infekci *P. neolyopersici*. St – standard proteinu Hsp70 z hovězího mozku, 1 µg (převzato z Piterková *et al.*, 2013).

V navazující studii realizované na KBC PřF UP byly sledovány změny exprese a hladiny Hsp70 v odpovědi na teplotní stres (4, 10, 20 a 40,5 °C) a infekci *P. neolyopersici* u tří genotypů *Solanum* spp.: *S. lycopersicum* cv. Amateur – náchylný, *S. chmielewskii* – středně rezistentní, *S. habrochaites* f. *glabratum* – vysoce rezistentní genotyp vůči infekci *P. neolyopersici*. Celé rostliny byly vystaveny stresu při 4, 10, 20 a 40,5 °C po dobu 24 h a poté byly infikovány *P. neolyopersici*. Metodami kvantitativní real-time PCR a Western blot s využitím specifické protilátky anti-Hsp70 byl pozorován nárůst exprese i hladiny Hsp70 u všech studovaných genotypů rajčete. Je zajímavé, že v případě chladového stresu byly pozorovány významné změny pouze u náchylného genotypu převážně 24 h po expozici. Podobně, zvýšená hladina Hsp70 byla detekována u náchylného genotypu 24 h po jeho infekci (Kubienová *et al.*, 2013). Detekcí Hsp70 proteinu v listech rajčete *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom vystavených TS (40 °C po dobu 2 h) bylo ověřeno zvýšení produkce Hsp70 proteinů zejména v rané fázi obranné reakce, a to 2 h po ukončení TS (Obr.32). V pozdější fázi obranné reakce (6, 8 a 26 h po ukončení TS) byla detekována srovnatelná hladina Hsp70 s kontrolními nestresovanými rostlinami. Tyto výsledky potvrzují významnou roli Hsp70 v obranných reakcích jako molekulárních chaperonů, které jsou klíčové pro správné posttranslační složení proteinů, dále také stimulují opravné mechanismy a jsou schopny zabránit poškození důležitých proteinů či ztrátě aktivity enzymů (Huang & Xu, 2008).



Společným faktorem mezi reakcemi rostlin na abiotický stres je produkce redoxních aktivních molekul včetně RNS (Mittler 2002), avšak jejich nadměrná akumulace může vést k nitrosativnímu stresu a následnému poškození buňky (Grant & Loake 2000). Regulace homeostázy RNS je tedy důležitým aspektem rezistence vůči abiotickému stresu (Vranová *et al.*, 2002). Důležitou redoxní molekulou je NO, který může být pozitivním i negativním regulátor stresových reakcí. Dvojí působení NO je závislé převážně na jeho lokální koncentraci a prostředí jeho tvorby (Leshem & Haramaty 1996; Mur *et al.*, 2012). Při TS byla pozorována rychlá produkce NO v buňkách listů tabáku (Gould *et al.*, 2003). Zvýšená hladina NO byla detekována u vojtěšky, rýže, pšenice i kukuřice při působení krátkodobého TS (Leshem, 1998; Lamattina *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 2002). V předložené diplomové práci byl NO detekován histochemicky v příčných řezech listů rajčete Micro-Tom. V rané fázi obranné reakce byl detekován velmi slabý signál u stresovaných rostlin (Obr. 29, 30). Intenzivnější produkce NO byla zaznamenána 3 h po vystavení TS při 40 °C v xylémových buňkách (Obr. 30). Vzhledem k tomu, že je NO nestabilní sloučenina, lze předpokládat, že má úlohu signální molekuly, která aktivuje obranné antioxidační mechanismy vůči oxidativnímu stresu vyvolanému TS (Obr. 35) (Neill 2002; Song *et al.*, 2006; Gill *et al.*, 2013).

GSNOR je považována za klíčový enzym katabolismu NO, resp. GSNO, jeho zásobní a transportní formy *in vivo* (Liu *et al.*, 2001; Kubienová *et al.*, 2013). Zapojení GSNOR v mechanismech odpovědi na TS byl prokázán u mutantních rostlin *A. thaliana* s defektním genem *HOT5/GSNOR1*. U mutantu *hot5* byla prokázána zvýšená citlivost vůči vysoké teplotě, zvýšená hladina NO<sub>3</sub><sup>-</sup> i RSNO poukazující na významnou úlohu kontroly intracelulární hladiny RSNO prostřednictvím GSNOR aktivity, což ovlivňuje termotoleranci i regulaci růstu a vývoje u rostlin vystavených vysokým teplotám (Lee *et al.*, 2008). Podobně, zvýšená aktivita GSNOR společně se zvýšenou hladinou RSNO byly stanoveny v průběhu obranné reakce *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom (Obr. 17, 23). Exprese *GSNOR* byla zvýšená pouze v rané fázi obranné reakce, v pozdějších časových intervalech byla její hladina v listech srovnatelná s nestresovanou kontrolou (Obr. 20). V jiné studii, u hypokotylu slunečnice, vlivem TS při 38 °C po dobu 4 h došlo ke snížení GSNOR aktivity i exprese, snížení produkce NO a zvýšení hladiny RSNO (Chaki *et al.*, 2011).



Obr. 35 Možné mechanismy NO-indukované ochrany proti oxidačnímu stresu vyvolanému působením abiotického stresu. NO má ochrannou funkci proti působení oxidačního stresu: 1.) NO reaguje s lipidovými radikály ( $R\cdot$ ,  $RO\cdot$ ,  $ROO\cdot$ ), což zamezuje šíření oxidace lipidů. 2.) NO reaguje s  $O_2^{\cdot -}$  za vzniku peroxydusitanu ( $ONOO^-$ ), nitrčního činidla způsobujícího nitraci proteinů. 3.) NO přímo aktivuje antioxidantní enzymy: superoxidodismutasu (SOD), katalasu (CAT), askorbátperoxidasu (APX), guajakolperoxidasu (GPX) a glutathionreduktasu (GR). 4.) NO přímo aktivuje genovou expresi. Hypotetický mechanismus signální funkce NO představuje signální kaskáda prostřednictvím tvorby cGMP, která není u rostlin stále objasněna (převzato z Gill *et al.*, 2013)

V práci Kubienová *et al.*, 2014 byly sledovány účinky TS ( $42^\circ\text{C}$ , 2 h) po 4 a 24 h od jeho ukončení v listech, stoncích a kořenech modelových rostlin *C. sativus* cv. Stela, *C. melo*, *Pisum sativum* cv. Audit. Aktivita GSNOR byla zvýšená po 4 h ve stonku a kořeni *C. sativus* cv. Stela, v pozdější fázi 24 h po vystavení TS došlo k poklesu GSNOR aktivity na hladinu kontrolních nestresovaných rostlin. Opačný trend byl pozorován v listech, kde se GSNOR zvyšovala s narůstajícím časem od expozice TS. U *C. melo* byl pozorován nárůst GSNOR aktivity ve všech rostlinných orgánech, který byl intenzivnější po 24 h od vystavení TS. V případě *P. sativum* cv. Audit byl pozorován nárůst GSNOR aktivity ve všech rostlinných orgánech v rané fázi obranné reakce, v pozdní fázi po 24 h se GSNOR aktivit mírně snížila v listech, v kořeni

a stonku nedošlo k žádné změně. Tyto výsledky spolu s výsledky předložené diplomové práce podporují hypotézu, kdy je GSNOR aktivita považována za klíčovou při aklimatizaci rostlin na vysoké teploty a podílí se tak na ochraně buněk proti nitrosativnímu stresu způsobeném patofyziologickou hladinou RSNO (Lee *et al.*, 2008). Zvýšený obsah RSNO během TS byl pozorován u hrachu a brukve sítinovité (Corpas *et al.*, 2008, Abat & Deswal 2009). Podobně, ve studii Ziogas *et al.*, 2013 ukázali, že hladiny NO, RSNO a  $O_2^-$  jsou vlivem TS významně zvýšeny v listech citrusu, což je spojeno se sníženým obsahem chlorofylu a ztrátou elektrolytů (Ziogas *et al.*, 2013). Uvedené studie a výsledky diplomové práce naznačují význam homeostázy NO/RNS při aklimatizaci na vysoké teploty. Porucha této homeostázy může bránit detoxifikaci ROS/RNS, což vede k nadměrnému oxidativnímu a nitrosativnímu stresu.

## 6 Závěr

Cílem práce bylo studium produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a reaktivních forem dusíku (RNS) v průběhu obranné reakce rajčete *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom vystavenému teplotnímu stresu 40 °C, 45 °C a 50 °C. Z výsledků provedených experimentů, lze usoudit, že:

- Teplotní stres v buňkách způsobil intenzivní nárůst hladiny ROS i NO. Výrazný byl také nárůst hladiny S-nitrosothiolů (RSNO) v pozdějších stádiích obranné reakce.
- V rámci obranné reakce rostlin došlo ke zvýšení exprese a aktivity NADPH oxidasy, čímž došlo k nárůstu hladiny ROS. Snížení exprese a enzymové aktivity APX vedlo ke snížení degradace ROS a indukci oxidativního stresu.
- V počátcích obranné reakce také došlo ke zvýšení aktivity GSNOR, zejména při působení teplot 45 °C a 50 °C. V pozdějších stádiích došlo k poklesu enzymové aktivity, což koresponduje s nárůstem hladiny RSNO. Znatelný nárůst byl pozorován i u exprese *GSNOR*. Při teplotách 40 °C a 45 °C se exprese zvýšila 2 h po vystavení teplotním stresu, při 50 °C došlo ke zvýšení exprese 3 h po vystavení teplotním stresu.
- Teplotní stres indukoval tvorbu molekul, které mohou snižovat následky oxidativního poškození buněk. 2 h po vystavení teplotním stresu došlo ke znatelnému nárůstu hladiny molekulárních chaperonů Hsp70.
- Pro detailnější studii průběhu obranné reakce u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom by bylo vhodné ověřit v rámci navazujících experimentů, zda dochází k regulaci enzymů metabolismu ROS na úrovni 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.
- Alamillo J., Almoguera C., Bartels D., Jordano J. (1995): Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology*, **29**, 1093–1099.
- Almeselmani M., Deshmuk 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.
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Drzewiecka K., Chmielowska-Bak J., Abramowski D., Izbianska K. (2014): Aluminum induces cross-resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Planta*, **239**, 679–694.
- Aoki K., Kragler F., Xoconostle-Cázares B., Lucas W. J. (2002): A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16342–16347.
- Kozi Asada (1992): Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, **85**, 235–241.
- Asai S., Ohta K., Yoshioka H. (2008): MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, **20**, 1390–1406.
- Astier J., Kulik A., Koen E., Besson-Bard A., Bourque S., Jeandroz S., Lamotte O., Wendehenne D. (2012): Protein S-nitrosylation: What's going on in plants? *Free Radical Biology and Medicine*, **53**, 1101–1110.
- Baek K. H., Skinner D. Z. (2012): Production of reactive oxygen species by freezing stress and the protective roles of antioxidant enzymes in plants. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, **1**, 34–40.
- Babu N. R., Devraj V. R. (2008): High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Australian Journal of Crop Science*, **2**, 40–48.
- Balla K., Bencze S., Janda T., Veisz O. (2009): Analysis of heat stress tolerance in winter wheat. *Acta Agronomica Hungarica*, **57**, 437–444.
- Banzet N., Richaud C., Deveaux Y., Kazmaier M., Gagnon J., Triantaphylidés C. (1998): Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *Plant Journal*, **13**, 519–527.
- Bavita A., Shashi B., Navtej S. B. (2012): Nitric oxide alleviates oxidative damage induced by high temperature stress in wheat. *Indian Journal of Experimental Biology*, **50**, 372–378.
- Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., López-Jaramillo J., Padilla M. N., Carreras A., Corpas F. J., Barroso J. B. (2013): 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., Padilla M. N., Corpas J., Barroso J. B. (2016): Antioxidant systems are regulated by nitric oxide – mediated post-translational modifications (NO-PTMs). *Frontiers in Plant Science*, **7**, 152–160.
- Bitá C. E., Gerats T. (2013): Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 273–279.
- Boguszewska D., Zagdanska B. (2012): ROS as signalling molecules and enzymes of plant response to unfavorable environmental conditions, oxidative stress-molecular mechanisms and biological effects. *Oxidative Stress— Molecular Mechanisms and Biological Effects*, (Lushchakand V., H.M. Semchyshyn H. M. eds.), InTech, Janeza Trdine, Croatia, 341–362.
- Boston R. S., Viitanen P. V., Vierling E. (1996): Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, **32**, 191–222.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248–254.
- Bukau B., Horwich A. L. (1998): The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351–366.

- Byth H. A., Kuun K.G., Bornman L. (2001): Virulence-dependent induction of Hsp70/Hsc70 in tomato by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39**, 697–705.
- Camejo D., Jiménez A., Alarcón J. J., Torres W., Gómez J. M., Sevilla F. (2006): Changes in photosynthetic parameters and antioxidant activities following heat–shock treatment in tomato plants. *Functional Plant Biology*, **33**, 177–187.
- Clementi E., Brown G. C., Feelisch M., Moncada S. (1998): Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 7631-7636.
- Corpas F. J., Alché J. D., Barroso J. B. (2013): Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in Plant Science*, **126**, 1-3.
- Corpas F. J., Barroso J. B. (2014): Peroxisomal plant nitric oxide synthase (NOS) protein is imported by peroxisomal targeting signal type 2 (PTS2) in a process that depends on the cytosolic receptor PEX7 and calmodulin. *Febs Letters*, **588**, 2049-2054
- Corpas F. J., Barroso J. B., Carreras A., Quirós M., León A. M., Romero-Puertas M. C., Esteban F. J., Valderrama R., Palma J. M., Sandalio L. M., Gómez M., del Río L. A. (2004): Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology*, **136**, 2722–2733.
- Corpas F. J., Chaki M., Fernández-Ocaña A., Valderrama R., Palma J. M., Carreras A., Barroso J. B. (2008): Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant & Cell Physiology*, **49**, 1711–1722.
- Corpas F. J., Palma J. M., Río L. A., Barroso J. B. (2009): Evidence supporting the existence of l-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytologist*, **184**, 9-14.
- Correa-Aragunde N., Foresi N., Lamattina L. (2015): Nitric oxide is a ubiquitous signal for maintaining redox balance in plant cells: regulation of ascorbate peroxidase as a case study. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 2913–2921.
- Das K., Roychoudhury A. (2014): Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, **2**, 53-58.
- Dat J., Foyer C., Scott I. (1998): Change in salicylic acid and antioxidants during induced thermo tolerance in mustard seedlings. *Plant Physiology*, **118**, 1455–1461.
- Del Río L. A. (2015): ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 2827–2837.
- Demidchik V. (2015): Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, **109**, 212–228.
- Driedonks N., Xu J., Peters J. L., Park S., Rieu I. (2015): Multi-Level Interactions Between Heat Shock Factors, Heat Shock Proteins, and the Redox System Regulate Acclimation to Heat. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 999-1008.
- Di Giacomo, G., Rizza, S., Montagna, C., & Filomeni, G. (2012). Established principles and emerging concepts on the interplay between mitochondrial physiology and S-(De) nitrosylation: implications in cancer and neurodegeneration. *International Journal of Cell Biology*, 2012.
- El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C. (2008): Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling and Behaviour*, **3**, 175–182.
- Eyal E., Levy A. A. (2002): Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 112–117.
- Fares A., Rossignol M., Peltier J. B. (2011): Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **416**, 331–336.
- Farnese F. S., Menezes-Silva P. E., Gusman G. S., Oliveira J. A. (2016): When bad guys become good ones: The key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 471-486.
- Filippou P., Antoniou C., Fotopoulos V. (2013): The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Free Radical Biology and Medicine*, **56**, 172–183.
- 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. *The Plant Cell*, **22**, 3816-3830.
- Freschi L. (2013): Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives *Frontiers in Plant Science*, **398**, 1-22.
- Frydman J. (2001): Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry*, **70**, 603-647.
- Fu S., Meeley R., Scanlon M. J. (2002): Empty pericarp2 encodes a negative regulator of the heat shock response and is required for maize embryogenesis. *Plant Cell*, **14**, 3119-3132.
- Garavaglia B., Garofalo C., Orellano E., Ottado J. (2009): Hsp70 and Hsp90 expression in citrus and pepper plants in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *European Journal of Plant Pathology*, **123**, 91-97.
- Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A. (2003): S-nitrosylation signaling in cell biology. *Molecular Intervention* **3**, 253-263.
- Gong M., Chen S. N., Song Y. Q., Li Z. G. (1997): Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology*, **24**, 371-379.
- Gill S. S., Hasanuzzaman M., Nahar K., Macovei A., Tuteja N. (2013): Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **63**, 254-261.
- Gould K. S., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A., Wendehenne D. (2003): Nitric oxide production in tobacco leaf cells: A generalized stress response? *Plant, Cell and Environment*, **26**, 1851-1862.
- Gow A. J., Buerk D. G., Ischiropoulos H. (1997) A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosohiol *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.
- Grant J. J., Loake G. J. (2000): Update on Signaling Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance. *Plant Physiology*, **124**, 21-29.
- Groß F., Durner J., Gaupels F. (2013): Nitric oxide, antioxidant and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 419.
- Guerra D, Ballard K, Truebridge I, Vierling E (2016): S-Nitrosation of conserved cysteines modulates activity and stability of S-Nitrosogluthathione reductase (GSNOR). *Biochemistry*, **55**, 2452-2464.
- Gupta K. L., Igamberdiev A. U. (2015): Compartmentalization of reactive oxygen species and nitric oxide production in plant cells: an overview. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants*, (Cham:Springer International Publishing), 215-237.
- 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*, **276**, 39872-39878.
- Halliwell B. (2006): Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, **97**, 1634-1658.
- Hartl F. U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-579.
- Hartl F. U., Bracher A., Hayer-Hartl M. (2011): Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, **475**, 324-332.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M., Roychowdhury R., Fujita M. (2013): Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 9643-9684.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M. (2013): Extreme temperatures, oxidative stress and antioxidant defense in plants. *Abiotic Stress—Plant Responses and Applications in Agriculture*; (Vahdati K., Leslie C., eds.), InTech: Rijeka, Croatia, 169-205.
- Hemantaranjan A., Bhanu A. N., Singh M. N., Yadav D. K., Patel P. K., Singh R., Katiyar D. (2014): Heat stress responses and thermotolerance. *Advances in Plants & Agriculture Research*, **1**, 1-12.
- Hoffmann V., Schimrigk S., Islamova S., Hellwig K., Lukas C., Brune N., Pohlau D., Przuntek H., Muller T. (2003): Efficacy and safety of repeated intrathecal triamcinolone acetate

- application in progressive multiple sclerosis patients. *Journal of the Neurological Sciences*, **211**, 81-84.
- Hill B. G., Dranka B. P., Bailey S. M., Lancaster J. R. Jr., 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.
- Hoffmann V., Schimrigk S., Islamova S., Hellwig K., Lukas C., Brune N., Pohlau D., Przuntek H., Muller T. (2003): Efficacy and safety of repeated intrathecal triamcinolone acetonide application in progressive multiple sclerosis patients. *Journal of the Neurological Sciences*, **211**, 81-84.
- Hogg N. (1999): Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radical Biology and Medicine*, **28**, 1478-1486.
- Huang B., Xu C. (2008): Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**, 1230-1237.
- Huang S., Ratliff K. S., Schwarz M. P., Spenner J. M., Matouschek A. (1999): Mitochondria unfold precursor proteins by unraveling them from their N-termini. *Nature Structural & Molecular Biology*, **6**, 1132-1138.
- Hurkman W. J., Vensel W. H., Tanaka C. K., Whitehand L., Altenbach S. B. (2009): Effect of high temperature on albumin and globulin accumulation in the endosperm proteome of the developing wheat grain. *Journal of Cereal Science*, **49**, 12-23.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A. M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M. V., López-Jaramillo J., Barroso J. B. (2011): High temperature triggers the metabolism of S-nitrosothiols in sunflower mediating a process of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin-NADP reductase by tyrosine nitration. *Plant, Cell and Environment*, **34**, 1803-1818.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A. M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M. V., Pedrajas J. R., Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F. J., Barroso J. B. (2011): Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 1803-1813.
- Chakraborty U., Pradhan D. (2011): High temperature-induced oxidative stress in *Lens culinaris*, role of antioxidants and amelioration of stress by chemical pre-treatments. *Journal of Plant Interactions*, **6**, 43-52.
- Cho E. K., Choi Y. J. (2009): A nuclear-localized HSP70 confers thermoprotective activity and drought-stress tolerance on plants. *Biotechnology Letters*, **31**, 597-606.
- Iba K. (2002): Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, **53**, 225-245.
- Igamberdiev A. U., Hill R. D. (2004): Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 2473-2482.
- Jajic I., Sarna T., Strzalka K. (2015): Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species. *Plants*, **4**, 393-411.
- Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D. J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z., Zhu Y., Carpenter E. J., Wong G. K. S., Wendehenne D. (2016): Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Science Signaling*, **9**, 417.
- Jiang M., Zhang J. (2002): Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 2401-2410.
- Joudoi T., Shichiri Y., Kamizono N., Akaike T., Sawa T., Yoshitake J. (2013): Nitrated cyclic GMP modulates guard cell signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **25**, 558-571.
- Karuppanapandian T., Moon J. C., Kim C., Manoharan K., Kim W. (2011): Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, **5**, 709-725.
- Karuppanapandian T., Wang H. W., Prabakaran N., Jeyalakshmi K., Kwon M., Manoharan K., Kim W. (2011): 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**, 168-177.



- Kato H., Takemoto D., Kawakita K. (2013): Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in potato plant. *Physiologia Plantarum*, **148**, 371-386.
- Kharitonov V. G., Sundquist A. R., Sharma V. S. (1995): Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 28158-28164.
- 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.
- Knowles R. G., Moncada S. (1994): Nitric-oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, **298**, 249-258.
- Kocsy G., Szalai G., Galiba G. (2002): Effect of heat stress on glutathione biosynthesis in wheat. *Acta Biologica Szegediensis*, **46**, 71-72.
- Koenigshofer H., Tromballa H. W., Loeppert H. G. (2008): Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production. *Plant Cell and Environment*, **31**, 1771-1780.
- Krasenski J., Jonak C. (2012): Drought, salt and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 1593-1608.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tâche R., Luhová L., Barroso J. B., Petřivalský M. (2013): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosogluthione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie*, **95**, 889-902.
- Kubienová L., Sedlářová M., Vítečková-Wunchová A., Piterková J., Luhová L., Mieslerová B., Lebeda A., Navrátil M., Petřivalský M. (2013): Effect of extreme temperatures on powdery mildew development and Hsp70 induction in tomato and wild *Solanum* spp. *Plant Protection Science*, **49**, 41-54.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Mieslerová B., Petřivalský M. (2014): Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosogluthione reductase in plants. *Planta*, **239**, 139-146.
- Kumar S., Kaur R., Kaur N., Bhandhari K., Kaushal N., Gupta K., Bains T. S., Nayyar H. (2011): Heat-stress induced inhibition in growth and chlorosis in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is partly mitigated by ascorbic acid application and is related to reduction in oxidative stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**, 2091-2101.
- Kültz D. (2005): Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, **67**, 225-257.
- Kwak J. M., Mori I. C., Pei Z. M., Leonhardt N., Torres M. A., Dangi J. L., Bloom R. E., Bodde S., Jones J. D., Schroeder J. I. (2003): NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO*, **22**, 2623-2633.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamattina L., Beligni M. V., Garcia-Mata C., Laxalt A. M. (2001): Method of enhancing the metabolic function and the growing conditions of plants and seeds. US patent 6242384B1.
- Lamb Ch., Dixon R. A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Physiology*, **48**, 251-275.
- Lancaster J. R. (2008): Protein cysteine thiol nitrosation: maker or marker of reactive nitrogen species-induced nonerythroid cellular signaling? *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **19**, 68-72.
- Larkindale J., Hall J. D., Knight M. R., Vierling E. (2005): Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology*, **138**, 882-897.
- Lawlor D.W., Cornic G. (2002): Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment*, **25**, 275-294.
- Lázaro J. J., Jiménez A., Camejo D., Iglesias-Baena I., Martí M. C., Lázaro-Payo A. (2013): Dissecting the integrative antioxidant and redoxsystems in plant mitochondria. Effect of stress and S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 460-469.
- Lee U., Wie C., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E. (2008): Modulation of nitrosative stress by S-nitrosogluthione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **20**, 786-802.

- Leshem Y. Y., Haramaty E. (1996): The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *Journal of Plant Physiology*, **148**, 258–263.
- Leshem Y. Y., Wills R. B. H., Ku V. V. V. (1998): Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide (NO) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **36**, 825–833.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J. M., Barroso J. B. (2011): Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, **6**, 789–793.
- Li C., Bonnema A. B., Che D., Dong L., Lindhout P., Visser R. G. F., Bai Y. (2007): Biochemical and molecular mechanisms involved in monogenic resistance responses to tomato powdery mildew. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**, 1161-1172.
- Li Q. B., Haskell D. W., Guy C. L. (1999): Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Molecular Biology*, **39**, 21-34.
- Lima B., Forrester M. T., Jonathan D. T., Stamper S. (2010): S-nitrosylation in Cardiovascular Signaling. *Circulation Research*, **106**, 633-646.
- Lin C. Y., Roberts J. K., Key J. L. (1984): Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. *Plant Physiology*, **74**, 152–160.
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J. (2005): Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **137**, 921-930.
- Lindquist S., Craig E. A. (1988): The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, **22**, 631-677.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J. S. (2001): A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*, **410**, 490–494.
- Lozano-Juste J., Colim-Moreno R., León J. (2011): In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 3501-3517.
- Malik S. I., Hussain A., Yun B. W., Spoel S. H., Loake G. J. (2011): GSNOR-mediated de-nitrosylation in the plant defence response. *Plant Science*, **181**, 540–544.
- Mann M., Jensen O. N. (2003): Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*, **21**, 255-261.
- Marti E., Gisbert C., Bishop G. J., Dixon M. S., Garcia-Martinez J. L. (2006): Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 2037-2047.
- Marti E., Jofre J., Balcazer J. L. (2013): Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PLoS One*, **8**, e78906.
- Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2007): Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovascular Research*, **75**, 220-228.
- Meissner R., Jacobson Y., Melamed S., Levyatuv S., Shalev G., Ashri A., Elkind Y., Levy A. A. (1997): A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal*, **12**, 1465–1472.
- Millar T. M., Stevens C. R., Benjamin N., Eisenthal R., Harrison R., Blake D. R. (1998): Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Letters*, **8**, 225–228.
- Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M. A., Shulaev V. (2009): The Plant NADPH Oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, **2**, 45-51.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**, 405–410.
- Mishra S. K., Tripp J., Winkelhaus S., Tschiersch B., Theres K., Nover L., Scharf K. D. (2002): In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes & Development*, **16**, 1555-1567.
- Mitchell D. A., Morton S. U., Fernhoff N. B., Marletta M. A. (2007): Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 11609-11614.

- Mohammed A. R., Tarpley L. (2010): Effects of high night temperature and spikelet position on yield-related parameters of rice (*Oryza sativa* L.) plants. *European Journal of Agronomy*, **33**, 117–123.
- Molassiotis A., Fotopoulos V. (2011): Oxidative and nitrosative signaling in plants: two branches in the same tree? *Plant Signaling and Behavior*, **6**, 210-214.
- Moller I. M., Jensen P. E., Hansson A. (2007): Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **58**, 459–481.
- Morimoto R. I., Sarge K. D., Abravaya K. (1992): Transkriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 21987-21990.
- Mur L. A. J., Mandon J., Persijn S., Cristescu S. M., Moshkov I. E., Novikova V. (2013): Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants*, **5**, 1–17.
- Neill S. J. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1237–1247.
- Noble D. R., Williams D. Lyn H. (2000): Structure-reactivity studies of the Cu<sup>2+</sup>- catalyzed decomposition of four S-nitrosothiols based around the S-nitrosocysteine/S-nitrosogluthathione structures. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, **4**, 392-398.
- Parsell D. A., Lindquist S. (1993): The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics*, **27**, 437-496.
- Patterson W. R., Poulos T. L. (1995): Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry*, **34**, 4331–4341.
- Penfield S. (2008): Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytologist*, **179**, 615-628.
- Piterková J., Luhová L., Mieslerová B., Lebeda A., Petřivalský M. (2013): Nitric oxide and reactive oxygen species regulate the accumulation of heat shock proteins in tomato leaves in response to heat shock and pathogen infection. *Plant Science*, **207**, 57-65.
- Rafikova O., Rafikov R., Nudler E. (2002): Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 5916-5918.
- Rani B., Dhawan K., Jain V., Chhabra M. L., Singh D. (2007): High temperature induced changes in antioxidative enzymes in *Brassica juncea* (L). *Czern & Coss*, [http://www.australianoilseeds.com/\\_data/pdf\\_file/0003/6861/46\\_High\\_temperature\\_induced\\_changes\\_in\\_antioxidative\\_enzymes\\_in\\_Brassica\\_juncea.pdf](http://www.australianoilseeds.com/_data/pdf_file/0003/6861/46_High_temperature_induced_changes_in_antioxidative_enzymes_in_Brassica_juncea.pdf)
- Rizhsky L, Liang H., Mittler R. (2002): The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiology*, **130**, 1143-1151.
- Rodríguez M., Canales E., Borrás-Hidalgo O. (2005): Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **22**, 1–10.
- Rümer S., Kapuganti J. G., Kaiser W. M. (2009): Oxidation of hydroxylamines to NO by plant cells. *Plant Signaling and Behaviour*, **4**, 853–855.
- Saidi Y., Finka A., Goloubinoff P. (2011): Heat perception and signalling in plants: a tor tuouspath to thermotolerance. *New Phytologist*, **190**, 556–565.
- Sagi M., Fluhr R. (2006): Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology*, **141**, 2336-2340.
- Sakamoto A., Tsukamoto S., Yamamoto H., Ueda-Hashimoto M., Takahashi M., Suzuki H., Morikawa H. (2003): Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species. *Plant Journal*, **33**, 841–851.
- Savicka M., Škute N. (2010): Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija*, **56**, 26–33.
- Saville B. (1958): A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst*, **83**, 670-672.
- Saxena I., Shekhawat G. S. (2013): Nitric oxide (NO) in alleviation of heavy metal induced phytotoxicity and its role in protein nitration. *Nitric Oxide*, **32**, 13-20.
- Shahani N., Sawa A. (2011): Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for S-nitrosylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, **14**, 1493-1504.

- Sharkey T. D., Badger M. R., Von-Caemmerer S., Andrews T. J. (2001): Increased heat sensitivity of photosynthesis in tobacco plants with reduced Rubisco activase. *Photosynthesis Research*, **67**, 147–156.
- Shi J., Zhao Y., Wang Y., Gao W., Ding J., Li P., Hu L., Shao F. (2014): Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*, **514**, 187-192.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. (2002): Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1305-1316.
- Schonhoff C. M., Gaston B., Mannick J. B. (2003): Nitrosylation of cytochrome *c* during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 18265-18270.
- Snyman M., Cronje M. J. (2008): Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 2125–2132.
- Song L., Ding W., Zhao M., Sun B., Zhang L. (2006): Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Science*, **171**, 449–458.
- Stamler J. S. Toone E. J. (2002): The decomposition of thionitrites. *Current Opinion in Chemical Biology*, **6**, 779-785.
- Stöhr C., Strube F., Marx G., Ullrich W. R., Rockel P. (2001): A plasma-membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyzes the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, **212**, 835–841.
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. (2012): ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell and Environment*, **35**, 259–270.
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R. (2011): Respiratory burst oxidases: The engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**, 691–699.
- Suzuki N., Sejima H., Tam R., Schlauch K., Mittler R. (2011): Identification of the MBF1 heat-response regulon of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **66**, 844–851.
- Swift H. R., Williams D. L. H. (1997): Decomposition of S-nitrosothiols by mercury(II) and silver salts. *Journal of the Chemical Society*, **2** **10**, 1933-1935.
- Taiz L., Zeiger E. (2006): *Plant physiology*. 4<sup>th</sup> ed, Sinauer Associates Sunderland, 764 stran.
- Tripathy B. C., Oelmüller R. (2012): Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling Behaviour*, **7**, 1621–1633.
- Uchida A., Jagendorf A. T., Hibino T., Takabe T., Takabe T. (2002): Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science*, **163**, 515–523.
- Vacca R. A., de Pinto M. C., Valenti D., Passarella S., Marra E., De Gara L. (2004): Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiology*, **134**, 1100–1112.
- Valenti D., Vacca R. A., de Pinto M. C., De Gara L., Marra E., Passarella S. (2007): In the early phase of programmed cell death in Tobacco Bright Yellow 2 cells the mitochondrial adenine nucleotide translocator, adenylate kinase and nucleoside diphosphate kinase are impaired in a reactive oxygen species-dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1767**, 66–78.
- Valderrama R., Corpas F. J., Carreras A., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Luque F. (2007): Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters*, **581**, 453-461.
- Vierling E. (1991): The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**, 579-620.
- Volkov R. A., Panchuk I. I., Mullineaux P. M., Schoeffl F. (2006): Heat stress-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, **61**, 733–746.
- Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F. (2002): Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1227–1236.
- Wang W., Vinocur B., Shoseseyov O., Altman A. (2004): Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, **9**, 244-252.
- Wang X., Zhang M. M., Wang Y. J., Gao Y. T., Li R., Wang G. F. (2015): The plasma membrane NADPH oxidase OsRbohA plays a crucial role in developmental regulation and drought-stress response in rice. *Physiologia Plantarum*, **24**, 1–34.

- Yang L., Fountain J. C., Wang H., Ni X., Ji P., Lee R. D. (2015): Stress sensitivity is associated with differential accumulation of reactive oxygen and nitrogen species in maize genotypes with contrasting levels of drought tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 24791–24819.
- 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., Pallas J. A., Loake G. J. (2011): S nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature*, **478**, 264–268.
- Zemojtel T., Frohlich A., Palmieri M. C., Kolanczyk M., Mikula I., Wyrwicz L. S., Wanker E. E., Mundlos S., Vingron M., Martasek P., Durner J. (2006): Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends in Plant Science*, **11**, 524–525.
- Ziogas V., Tanou G., Filippou P., Diamantidis G., Vasilakakis M., Fotopoulos V., Molassiotis A. (2013): Nitrosative responses in citrus plants exposed to six abiotic stress conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, **68**, 118–126.
- Zhang H., Fu X., Jiao W., Zhang X., Liu C., Chang Z. (2005): The association of small heat shock protein Hsp16.3 with the plasma membrane of *Mycobacterium tuberculosis*: dissociation of oligomers is a prerequisite. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **330**, 1055–1061.
- Zhang H., Glaser E. (2002): Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends in Plant Science*, **7**, 14–21.
- Zhao H., Kalivendi S., Zhang H., Joseph J., Nithipatikom K., Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B. (2009): Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radical Biology and Medicine*, **34**, 1359–1368.

## 8 Seznam použitých zkratk a symbolů

Å	Angström
Af-M	Alexy Fluor® 488 C <sub>5</sub> Maleimid
AH <sub>2</sub>	L-askorbát
AA/BIS	Akrylamid- <i>N,N'</i> -bisakrylamid
APS	Persíran amonný
AP	Alkalická fosfatasa
APX	Askorbátperoxidasa
Asa	Askorbát
ASC-GSH	Askorbát-glutathinový cyklus
AtMC3	Metakaspasa 3 u <i>Arabidopsis</i>
AtRBOHD	NADPH oxidasa u <i>Arabidopsis</i>
BSA	Hovězí sérový albumin
CAT	Katalasa
CDKP	Kalcium-dependentní proteinkinasa
cGMP	Cyklický guanosinmono fosfát
CNX1	Kalnexin 1
cPTIO	2-4-karboxyfenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetát
DHAR	Dehydroaskorbátreduktasa
DMF	N,N-dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTPA	Diethylentriaminpentaoctová kyselina
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EF-1 $\alpha$	Elongační faktor-1 $\alpha$
FAD	Flavinadenindinukleotid
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GPX	Glutathionperoxidasa
GR	Glutathionreduktasa
GSH	Redukovaný glutathion
GSNHOH	S-hydroxylaminoglutathion

GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidovaný glutathion)
GST	Glutathin-S-transferasa
H <sub>2</sub> DCF DA	2',7'-dichlorodohydrofluorescein diacetát
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny)- -ethansulfonová kyselina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxid vodíku
Hsf	Heat shock faktory
Hsp	Heat shock proteiny
HSR	Heat shock odpověď
MAPK	Mitogenem aktivované proteinkinasy
MDAR	Monodehydroaskorbátreduktasa
MYB2	Transkripční faktor
NADH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADPH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NBT-BCIP	Nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4- chloro-3-indolyl-fosfátem
NED	N-(1-naftyl)ethylendiamin
NEM	N-ethylmaleimid
NiNOR	Nitrit:NO oxidoreduktasa
NO <sup>-</sup>	Nitroxylový aniont
NO	Oxid dusnatý
NO <sup>+</sup>	Nitrosoniový kationt
NO·	Nenabitý radikál oxidu dusnatého
NO <sub>2</sub>	Oxid dusičitý
NO <sub>2</sub> ·	Radikál oxidu dusičitého
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Dusitanový aniont
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Dusičnanový aniont
N <sub>2</sub> O	Oxid dusný
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Oxid dusitý
N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Dimer oxidu dusičitého
NOS	NO synthasa
NPR1	Nonexpressor of pathogenesis-related proteins 1

NR	Nitrátreduktasa
NtOSAK	Osmotickým stresem aktivovaná proteinkinasa u <i>Nicotiana tabacum</i>
$^1\text{O}_2$	Singletový kyslík
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Superoxidový anion
$\text{OH}^{\cdot}$	Hydroxylový radikál
$\text{OH}^-$	Hydroxylový anion
$^{\cdot}\text{O}_2\text{H}$	Perhydroxylový radikál
$\text{ONOO}^-$	Peroxydusitan
$\text{O}_2\text{NOO}^-$	Peroxydusičnan
$\text{ONOOCO}_2^-$	Nitrosoperoxokarbonát
Ox-PTM	Oxidační posttranslační modifikace
PHT1,3	Fosfátové transportéry
PMFS	Fenylmethylsulfonylfluorid
PrxIIE	Peroxiredoxin IIE
RbohD	Respiratory burst oxidase homolog D
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
POX	Peroxidasa
$\text{RS}^-$	Thiolový anion
RSH	Redukovaný thiol
RSNO	S-nitrosothiol
RSSR	Disulfid
SAR	Systémově získaná rezistence
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SIGSNOR	Rekombinantní GSNOR ze <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Amateur
SOD	Superoxiddismutasa
TGA1	Transkripční faktor 1
THB	Zkrácený hemoglobin
TIR1	Auxinový receptor
TBS	Fyziologický roztok pufrovaný Tris



TS	Teplotní stres
TTBS	Tween v TBS
TEMED	<i>N, N'</i> - tetramethylendiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktasa
XOD	Xanthinoxidoreduktasa
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H- -5-karboxanilid