

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Úloha S-nitrosoglutathionreduktasy ve vývoji a
obranné reakci rajčete *Solanum lycopersicum* cv.
Micro-Tom**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Zuzana Žvátorová

Studijní program: N1406 Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.**

Rok: 2016

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

V Olomouci dne

Zuzana Žvátorová

Děkuji svému školiteli Doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, za poskytnutí potřebné literatury a čas věnovaný při zpracování experimentální i teoretické části diplomové práce.

Děkuji kolektivu Katedry biochemie za cenné rady a pomoc při experimentální činnosti, především pak Mgr. Lucii Činčalové, Ph.D a Mgr. Tereze Tiché za jejich pomoc a cenné rady při zpracování experimentální části diplomové práce.

Také bych chtěla poděkovat pracovišti prof. E. Vierling z UMA Amherst v USA za poskytnutí materiálu potřebného pro vypracování experimentální části.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Zuzana Žvátarová
Název práce	Úloha S-nitrosoglutathionreduktasy ve vývoji a obranné reakci rajčete <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt:

Diplomová práce byla zaměřena na posttranslační modifikace proteinových cysteinů reaktivními formami kyslíku a dusíku. Mezi nejdůležitější modifikace patří S-nitrosylace, která produkuje S-nitrosothioly, látky sloužící jako zásobní nebo transportní formy oxidu dusnatého (NO) *in vivo*. Na kontrole hladiny S-nitrosothiolů se podílí řada enzymů, jako je thioredoxin, protein-disulfidisomerasa, karbonylreduktasa, a další. Za klíčový enzym je považována i S-nitrosoglutathionreduktasa, která se nepřímo podílí na regulaci posttranslačních modifikací proteinů pomocí S-nitrosylace. V závěru teoretické části práce jsou také shrnuty poznatky o rajčeti *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom a jeho odolnosti na biotické a abiotické stresové podmínky.

Experimentální část byla zaměřena na charakterizace posttranslační regulace aktivit rostlinných GSNOR *in vitro* a na studium enzymu GSNOR během vývoje rajčete *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom a reakce rostlin na stresové podmínky. Pro práci *in vitro* byly připraveny rekombinantní proteiny SIGSNOR, AtGSNOR a jeho tři mutanti, C284S, C271S, C10S. Všechny byly exprimovány v *E. coli* jako N-terminální proteiny nesoucí 6xHis-Tag a purifikovány metodou chelatační chromatografie. Byly stanoveny základní kinetické parametry purifikovaných proteinů a sledován vliv mutací cysteinových zbytků na specifickou aktivitu enzymu a jeho inhibici působením H₂O₂ a donorů NO.

Během vývoje rostlin Micro-Tom byla stanovena aktivita i hladina relativní exprese pomocí RT-PCR. Nejvyšší exprese GSNOR byla pozorována u stonků a květů, zatímco nejvyšší aktivita u stonků a zelených plodů. Analýza metodou biotinového switche prokázala významné rozdíly v hladině S-nitrosylovaných proteinů u mutanta nahG. Během působení teplotního stresu na *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom došlo k poklesu aktivity, k nárůstu hladiny exprese, která se výrazně snížila po 24 hod. U mutantní rostliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom nahG došlo také k poklesu aktivity během působení teplotního stresu, výraznější pokles exprese u něj nastal také ve 24 hod. Během teplotního stresu došlo k významným změnám parametrů glutathionového redoxního systému.

Klíčová slova	S-nitrosoglutathionreduktasa, S-nitrosylace, <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom, teplotní stres
Počet stran	96
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Zuzana Žvátorová
Title	Role of S-nitrosogluthione reductase in development and defence responses of tomato <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Microtom
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2016

Abstract

The thesis was focused on posttranslational modifications of protein cysteines by reactive oxygen and nitrogen species. Among the most important modifications belongs the S-nitrosylation, which produces S-nitrosothiols. S-nitrosothiols are used as storage or transport forms of nitric oxide (NO) *in vivo*. A number of enzymes is involved in the control of levels of S-nitrosothiols (thioredoxine, protein disulfide isomerase, carbonyl reductase, and others). The key enzyme is considered to be S-nitrosogluthione reductase, which is indirectly involved in the regulation of post-translational modifications of proteins via S-nitrosylation. There is a summarized knowledge of tomato *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom and his resistance to biotic and abiotic stress conditions included at the end of the theoretical work.

The experimental part was focused on the characterization of post-translational regulation of the activity of plant GSNOR *in vitro* and on the study of the enzyme GSNOR during the development of tomato *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom and the responses of plants to stress conditions. Recombinant proteins SIGSNOR, AtGSNOR and its three mutants, C284S, C271S, and C10S were prepared for studies *in vitro*. All of them were expressed in *E. coli* as N-terminal protein carrying a 6xHis-Tag and proteins were purified by the method of chelating chromatography.. Basic kinetic parameters of the purified protein were determined and effects of mutations of selected cysteine residues to a specific activity of the enzyme and its inhibitory by H₂O₂ and donors NO were monitored.

The activity and the level of relative expression of GSNOR were determined during the development of Micro-Tom plants. The level of relative expression was measured by RT-PCR. The highest expression of GSNOR was observed in stems and flowers, while the highest activity was at the stems and green berries. Analysis by the biotin switch method demonstrated significant differences in the level of S-nitrosylated proteins in the mutant nahG. During the action of temperature stress on *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom plants the activity of GSNOR was reduced. The level of expression increased, but after 24 hours significantly decreased. Activity also decreased in mutant plants of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom nahG during exposure to heat stress. Significant changes were not seen in the level of expression, but pronounced reduction was observed after 24 hours. During heat stress significant changes were measured of the parameters of the glutathione redox system.

Keywords	S-nitrosogluthione reductase, S-nitrosylation, <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom, heat stress
Number of pages	96
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Současný stav řešené problematiky	4
2.1	Modifikace cysteinů	4
2.1.1	Persulfidace	4
2.1.2	Alkylace	5
2.1.3	S-nitrosylace proteinů	5
2.1.4	Mechanismy S-nitrosylace	5
2.1.5	Katabolismus S-nitrosothiolů.....	7
2.2	Rostlinná S-nitrosogluthathionreduktasa	8
2.2.1	Struktura a molekulární vlastnosti GSNOR.....	9
2.2.2	Sekvence	10
2.2.3	Substrátová specifita a kinetické vlastnosti GSNOR.....	11
2.2.4	Lokalizace GSNOR.....	11
2.2.5	Aktivita GSNOR během vývoje rostlin	12
2.2.6	Úloha GSNOR v reakcích rostlin na stresové podmínky	13
2.3	Další enzymy katabolismu S-nitrosothiolů	15
2.3.1	Thioredoxin.....	15
2.3.2	Protein disulfidisomerasa	16
2.3.3	Karbonylreduktasa	16
2.3.4	Xanthinoxidasa.....	17
2.3.5	Superoxiddismutasa	17
2.3.6	Glutathionperoxidasa	17
2.3.7	γ -Glutamyltranspeptidasa.....	18
2.4	<i>Solanum lycopersicum</i> cv Micro-Tom	18
2.4.1	Odolnost Micro-Tom na biotické a abiotické stresy	20
3	Experimentální část.....	24
3.1	Materiál a přístroje	24
3.1.1	Přístroje a vybavení.....	24
3.1.2	Chemikálie	24
3.2	Biologický materiál	25
3.2.1	<i>Solanum lycopersicum</i> cv Micro-Tom.....	25
3.3	Experimentální metody	26
3.3.1	proteinu GSNOR ze <i>Solanum lycopersicum</i> a <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
3.3.2	Extrakce a purifikace rostlinného materiálu	28
3.3.3	Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR.....	28

3.3.4	Stanovení proteinů	29
3.3.5	Stanovení glutathionu (GSH a GSSG).....	29
3.3.6	SDS PAGE	30
3.3.7	Western blot	30
3.3.8	Stanovení nitrosylovaných proteinů metodou Biotin-Switch	31
3.3.9	Stanovení exprese GSNOR.....	34
4	Závěr	37
5	Literatura	39
6	Seznam použitých symbolů a zkratek	51

Cíle práce

Vypracování literární rešerše na téma rostlinných S-nitrosoglutathionreduktas (GSNOR), jejich vlastností a funkce v opodvědi rostlin na stresové podmínky

Příprava a charakterizace rekombinantních GSNOR z *Arabidopsis* včetně mutantních forem se záměnou vybraných cysteinů za seriny

Charakterizace posttranslační regulace aktivit rostlinných S-nitrosoglutathionreduktas *in vitro*.

Studium enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy během vývoje rajčete *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom a reakce rostlin na stresové podmínky

1 Úvod

Rostlina může na napadení patogenem reagovat různými způsoby a její odolnost může mít různé příčiny. Rostliny se kvůli svému způsobu života musely adaptovat na různé stresové podmínky prostředí. Rostlina disponuje řadou obranných mechanismů, které mohou být konstitutivní nebo indukované.

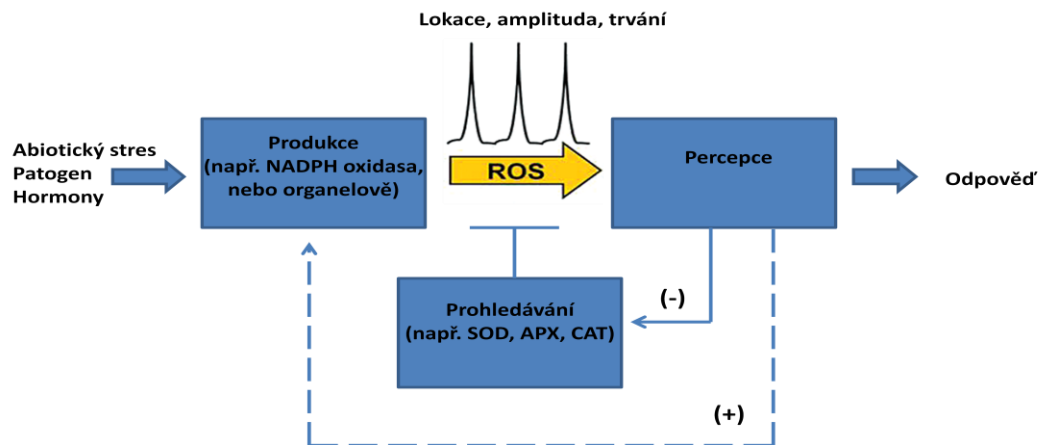
Mezi pasivní obranné mechanismy patří kromě anatomických a morfologických vlastností rostliny i antimikrobiální látky, které jsou v rostlině obsaženy i před napadením patogenem tzv. fytoanticipiny. Tyto mechanismy tvoří první obrannou linii při napadení mikroorganismy.

Prvními aktivními obrannými mechanismy u rostlin po napadení patogenem je tvorba iontových kanálů, reaktivních forem kyslíku a dusíku a aktivace fosforylačních kaskád, které jsou následovány aktivací exprese specifických genů a syntézou proteinů. Po napadení rostlin houbovými patogeny, které uvolňují do hostitele specifické látky – elicitory, se indukuje syntéza fytoalexinů. Což jsou nízkomolekulární obranné antimikrobiální a antifungální látky, většinou se jedná o fenolické struktury. Další skupinou látek účastnících se obranných reakcí rostlin jsou PR proteiny, které jsou indukované infekcí viry, viroidy, ale i bakteriemi a houbovými patogeny.

Dalším důležitým obranným mechanismem je hypersenzitivní reakce (HR), která se charakterizuje rychlou nekrotizací v místě napadení patogenem. V tomto mechanismu jsou zahrnuty dvě fáze. První z nich je indukce programované buněčné smrti okolních buněk, aby se zamezilo šíření patogenu do dalších částí rostliny. Za druhé se u rostlin vyskytuje systémová rezistence, široká fyziologicky podmíněná imunita, která je výsledkem HR a aktivace genů, které jsou spojené s obranným mechanismem. Získaná systémová rezistence (SAR), která je nejvýznamnější, zajišťuje širokou rezistenci vůči virům, bakteriím i houbovým patogenům. Endogenním signálem pro systémovou rezistenci je kyselina salicylová (SA), která aktivuje geny související s patogenezí, PR geny. Kyselina salicylová inhibuje katalasu, čímž napomáhá vzniku superoxidových radikálů. Dále SA účinkuje s dalšími signály, jako jsou kyselina jasmonová, etylén a elektrický potenciál. Indukovaná systémová rezistence (ISR) je druhým typem systémové rezistence. Důležitými signály u této rezistence jsou kyselina jasmonová a etylén. Kyselina jasmonová aktivuje především geny obranných reakcí rostlin.

Pokud dojde k indukci hypersenzitivní reakce pomocí elicitorů, nastanou rychlé metabolické změny. Tyto změny zahrnují změnu aktivity ATPasy v cytoplazmě, která za fyziologických podmínek udržuje transmembránový potenciál, při HR dojde k snížení pH cytoplazmy a uvolnění Ca^{2+} iontů. Ca^{2+} ionty působí jako sekundární poslové a aktivují obranné reakce rostliny následované dalšími biochemickými ději, které vedou k buněčné smrti (Řepková, 2013).

Již zmíněné reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou velmi silnými oxidanty, které mohou reagovat téměř se všemi složkami živých buněk, což vede k vážnému poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Aby se zabránilo tomuto oxidačnímu stresu, obsahují rostlinné řadu enzymatických a neenzymatických antioxidantů, které za normálních podmínek odstraňují přebytečná oxidační činidla (Bailey-Serres a Mittler, 2006; Halliwell a Gutteridge, 2007; Barceló a Laura, 2009; Sies, 2014). V poslední době se však ukazuje, že ROS jsou důležitou složkou signalizační sítě (oxidační signalizace, redoxní zabezpečení) a rostliny je využívají pro jejich rozvoj a pro reakce na změny prostředí. Účinné antioxidantní systémy pravděpodobně potlačují toxicitu ROS a umožňují jejich využití pro převod signálu. ROS tedy hrají významnou roli v rostlinách, kde jsou využívány jako klíčové regulátory různých procesů: růst, vývoj reakce na biotické a abiotické podněty, metabolismus rostlin a programovaná buněčná smrt (Obr. 1, del Río a Puppo, 2009; Mittler *et al.*, 2011; Inzé *et al.*, 2012; Sandalio *et al.*, 2012; Baxter *et al.*, 2014). Ukázalo se, rostlinné buňky mohou zahájit a zesilovat produkci ROS za účelem signalizace. Velmi důležitá pro zahájení signálních kaskád je lokalizace produkce ROS v chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech. ROS vytváří v rostlinných buňkách mnoho podnětů, vyvolání signální transdukce, nebo speciální buněčné odpovědi (Bailey-Serres a Mittler, 2006).



Obr. 1: ROS signalizace v rostlinných buňkách. Zjednodušený model ukazuje, jak se ROS v rostlinných tvoří kvůli mnoha podnětům, mohou vyvolat signální události produkující specifické buněčné odpovědi. Ovládání těchto molekul je zprostředkováno rovnováhou mezi jejich produkcí a degradací různými antioxidantními systémy, jak jsou SOD, katalasy, askorbátperoxidasy atd. (upraveno podle del Río, 2015).

Oxid dusnatý, hlavní představitel již zmíněných RNS, má důležitou funkci jako inter- a intracelulární signální molekula účastnící se růstu a vývoje rostlin. NO reguluje různé procesy indukci transkripce genů nebo aktivaci sekundárních posílů (Besson-Bard *et al.*, 2008; Gaupels *et al.*, 2011). NO se podílí i na dalších fyziologických a patologických procesech, které zahrnují klíčení semen, růst pylové láčky, dřevnatění buněčné stěny, kořenovou organogenezi, kvetení, zrání plodů, stárnutí a biotický a abiotický stres (Giba *et al.*, 2007; Wendehenne a Hancock, 2011; Puppo *et al.*, 2013; Nasir Khan *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014).

ROS a RNS hrají klíčovou roli jako signální molekuly v reakci na biotické stresy v rostlinách. Po napadení patogenem dochází k jejich rychlé nadprodukci, což často vede k programované buněčné smrti (PCD) (Wang *et al.*, 2013). NO může v přítomnosti kyslíku reagovat s glutathionem za vzniku S-nitrosoglutathionu (GSNO), který slouží jako mobilní nádrž pro NO (Ortega-Galisteo *et al.*, 2012; Barroso *et al.*, 2013; Corpas *et al.*, 2013a; Xu *et al.*, 2013; Kubienová *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014). Na druhé straně RNS peroxyinitrit (ONOO^-) je silný antioxidant, který je tvořen rychlou reakcí mezi O_2^- a NO (Radi, 2013). V důsledku přítomnosti NO a GSNO v rostlinných tkáních a generování ONOO^- , mohou v rostlinách probíhat důležité kovalentní posttranslační modifikace, jako např. S-nitrosylace a nitrace (Romero-Puertas *et al.*, 2013; Corpas *et al.*, 2013b). Pomocí S-nitrosylace jsou inhibovány např. katalasy a glykolát oxidasy v peroxisomech, což by mohlo regulovat buněčnou úroveň klíčových signálních molekul, jako je H_2O_2 (Ortega-Galisteo *et al.*, 2012).

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Modifikace cysteinů

Cystein v proteinech (R-SH) podstupuje řadu enzymatických a neenzymatických modifikací, často závislých na ionizaci cysteinu za vzniku thiolátu (R-S-) v důsledku změny pH okolí. Tyto změny thiolové skupiny cysteinu umožňují změnu jak struktury proteinů, tak i jejich biologické funkce. Tyto úpravy zahrnují kromě S-nitrosylace i sulfenylaci, tvorbu disulfidových můstků, tvorbu vyšších oxidačních stupňů síry, persulfidaci, alkylaci, arylaci, a další (Go *et al.*, 2015).

Interakce R-S- s kovovými ionty je běžný strukturní prvek a vazebný motiv i pro nukleové kyseliny a komponenta katalytického místa enzymů. R-S je předmětem oxidace ([O]) na Cys sulfenát (R-SO) pomocí H_2O_2 a dalších dvouelektronových oxidantů. Thiol (R-SH) také prochází změnou s disulfidem (R1-SS-R1) za tvorby jiného thiolu (R1-SH) a disulfidu (R1-SS-R) v procesu výměny thiol-disulfid. K nerovnovážnému ustálenému stavu oxidace specifického R-SH dochází v důsledku přítomnosti nízké nanomolární koncentrace H_2O_2 v buňkách. R-SO reaguje s R-SH nebo GSH za tvorby příslušných disulfidů (R-SS-R, R-SSG). Mnoho R-SO může podstoupit hyperoxidaci na sulfinát (R-SO₂) a sulfonát (R-SO₃) v přítomnosti nadbytku oxidačního činidla. R-S také reaguje s NO prostřednictvím různých způsobů přenosu NO⁺ iontu za vzniku odpovídajícího nitrosothiolu (R-SNO). R-SO se sirovodíkem (SH) může tvořit cysteinový persulfid (R-SS), který může být oxidován na cysteinový thiosulfát (R-SSO₃). Alternativně může R-SO reagovat s primárním aminem vedlejší aminoskupiny nebo samostatné biomakromolekuly za vzniku sulfenamidu (R-SNRH), který může být dále oxidován na sulfinamid (R-S(O)NRH) a sulfonamid (R-S(O)₂NRH), což často vede k tvorbě cyklické intramolekulární struktury (Obr. 2, Go *et al.*, 2015).

2.1.1 Persulfidace

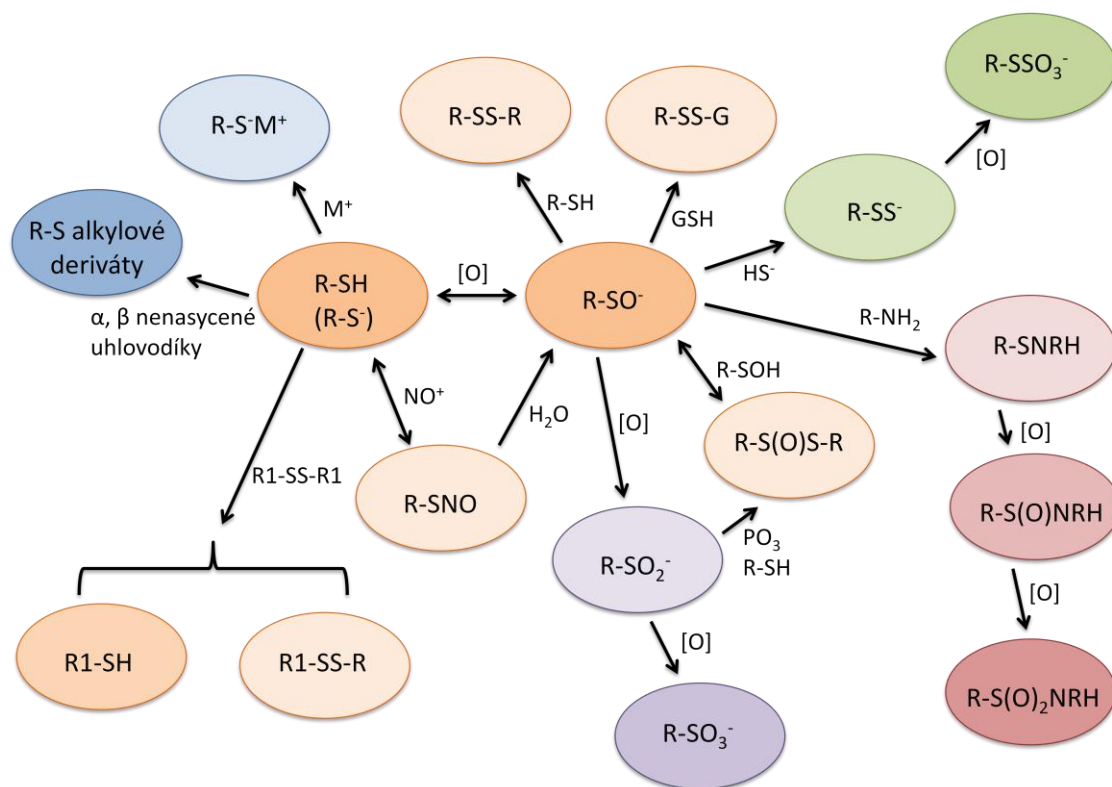
Proteinový persulfid je derivátem sirovodíku, který je produkován z Cys střevními mikroorganismy pomocí merkaptopyruvátsulfotransferasy, cystathionin β -synthasy (CBS) a cystathionin γ -lyasy (CGL) (Gadalla *et al.*, 2010; Kolluru *et al.*, 2013). Tvorba persulfidu interferuje s normální reaktivitou proteinového Cys v podstatě stejným způsobem jako S-nitrosylace nebo sulfenace (Francoleon *et al.*, 2011), ale na rozdíl od nich je vysoce nukleofilní sulfan více reaktivní vůči elektrofilům (Ono *et al.*, 2014). Mezi proteiny podléhající persulfidaci patří například GAPDH (Mustafa *et al.*, 2009).

2.1.2 Alkylace

Mnoho modifikací Cys je za normálních *in vivo* podmínek nevratných. Mezi ně patří například modifikace endogenně odvozených reaktivních lipidů, které poskytují odpověď na stres (Higdon *et al.*, 2012). Také reaktivní aldehydy tvoří významnou a dobře známou frakci trvalých změn Cys (Fritz *et al.*, 2013). Mnoho α/β nenasycených aldehydů, jako je např. 4-hydroxynonenal, je měkkými elektrofilů, které reagují s měkkými nukleofily a jsou převážně regulovány Cys thioláty *in vivo* (LoPachin *et al.*, 2012; LoPachin *et al.*, 2009).

2.1.3 S-nitrosylace proteinů

Pojem S-nitrosylace označuje reakci, při níž dochází k tvorbě vazby S-NO pomocí nitrosylace cysteinového thiolu (Stamler *et al.*, 1992a). S-nitrosylace je tedy reverzibilní modifikace cysteinových thiolů v proteinech, kdy dochází ke koordinačně kovalentní vazbě mezi nitrosylovou skupinou (NO radikálem) a sírou –SH skupiny cysteinu (Lancaster, 2008).



Obr. 2: Funkční modifikace cysteinu (Cys) (Upraveno podle Go *et al.*, 2015).

2.1.4 Mechanismy S-nitrosylace

S-nitrosylace je posttranslační modifikace místně specifická podobně jako fosforylace, ale je méně stabilní. Jedná se o reakci, která probíhá bez enzymové katalýzy, kdy

dochází k reverzibilní kovalentní vazbě mezi -NO skupinou a -SH skupinou na cílovém proteinu (Hess *et al.*, 2011).

Obecně je známo, že reakcí radikálu *NO s kyslíkem nedochází k tvorbě nitrosothiolu (Pryor *et al.*, 1982, Wink *et al.* 1994), avšak tato reakce je pro S-nitrosylaci nezbytná, protože dochází k vytvoření vyšších oxidů dusíku, z nichž je pro S-nitrosylaci typický N₂O₃ (Wink *et al.*, 1993; Hogg, 2003a). Tato reakce *NO s O₂ bývá upřednostňována v membránovém prostředí, kde se nachází vyšší koncentrace obou reaktantů (Liu *et al.*, 1998a). Může také docházet k částečné disociaci N₂O₃ na NO⁺ a NO₂⁻, což podporuje reakci NO⁺ s nukleofilním atomem síry (Arnelle *et al.*, 1995; Hogg *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1998b). Dalším nitrosylačním činidlem je dusitan, který v kyselém prostředí tvoří kyselinu dusitou, avšak její výskyt je omezen za fyziologických podmínek pouze na velmi kyselé prostředí (Stamler *et al.*, 1992b; Singh *et al.*, 1996).

Nitrosothioly mohou přednostně vznikat z více ionizovatelných cysteinů, u nichž může být thiolátový anion stabilizovaný acidobazickými interakcemi se sousedními skupinami náležícími přilehlým zbytkům v primární sekvenci, nebo jen v přítomnosti trojrozměrné struktury (Stamler *et al.*, 1997; Ascenzi *et al.*, 2000; Pérez-Mato *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2003). V důsledku těchto acidobazických interakcí by mohlo pK_a různých cysteinových zbytků hrát důležitou roli pro určení výskytu S-nitrosylace.

Jak již bylo uvedeno, S-nitrosylace je dosaženo pomocí nekatalyzované chemické reakce, proto se specifčnost reakce nemůže spoléhat na rozpoznání cílové struktury enzymem. Místo toho tato reakce závisí pouze na chemické reaktivitě mezi nitrosylačním činidlem a cílem (Martínez-Ruiz *et al.*, 2004). Pro tuto specifčnost bylo identifikováno několik faktorů:

a) reaktivita cílového proteinového rezidua

Už bylo řečeno, že více ionizovatelné cysteiny jsou přednostně nitrosylovány. Dalšími kandidáty pro nitrosylaci jsou i cysteiny v hydrofóbním prostředí. Tedy reakční prostředí určuje reaktivitu Cys rezidua. Chemická specifčnost je určena na atomové úrovni (Nathan *et al.*, 2003).

b) koncentrace

Výskyt reakce je určen koncentrací zúčastněných reaktantů (nitrosylační činidlo a protein) (Schmidt *et al.*, 1996; Stuehr *et al.*, 2001). V tomto bodě je klíčovým krokem

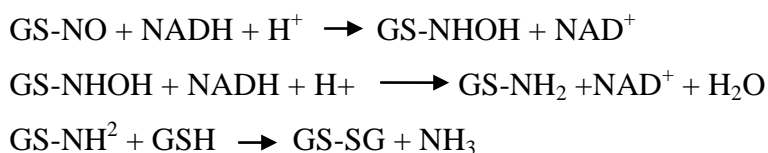
produkce NO a souvisejících RNS. Důležitá je také lokální koncentrace biochemických činidel (Mannick *et al.*, 2002). Řada S-nitrosylovaných proteinů se nachází v blízkosti enzymů syntetizujících NO (Matsumoto *et al.*, 2003). Důležitá je také stabilita vazby, která je v tomto případě značně labilní. Stejně jako u syntézy, tak i ke štěpení vazby může dojít bez přítomnosti specifických enzymů (Gaston *et al.*, 1999).

2.1.5 Katabolismus S-nitrosothiolů

S-nitrosothioly mohou snadno uvolňovat NO, protože vazba S-NO je silně polarizovaná a není příliš stabilní. RSNO se nejčastěji rozkládají na NO a příslušné disulfidy. K jejich rozkladu dochází jak enzymovou tak i neenzymovou cestou.

V roztocích má na stabilitu RSNO vliv řada faktorů kromě pH, světla, teploty, také přítomnost kyslíku a kationtů přechodných kovů (Ignaro *et al.*, 1999, Hogg *et al.*, 1999, Stamler *et al.*, 2002, Singh *et al.*, 1996). Heterolytickým štěpením vazby S-NO vzniká nitrosoniový (NO^+) nebo nitroxylový (NO^-) iont, které ale nejsou za fyziologických podmínek nijak významné. Důležitější homolytické štěpení probíhá s mnohem nižší energií, touto reakcí vzniká NO a disulfid. K homolytickému rozkladu RSNO dochází na UV světle, kdy dochází ke vzniku radikálů NO^\bullet a RS^\bullet . Některé RSNO mohou být štěpeny za katalýzy Cu^+ ionty. V tomto případě může být rozklad potlačen použitím chelatačních činidel (Singh *et al.*, 1996). Kromě Cu^+ iontů mohou vazbu S-NO rozkládat i další ionty kovů, jako jsou Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} a Cr^{3+} . RSNO je pomocí rtuti rozkládán, a tato reakce je použita ve spektrofotometrické metodě pro stanovení RSNO. S-nitrosothioly jsou rozkládány v prostředí cytosolu zde přítomnými reduktanty (Rafikova *et al.*, 2002).

Klíčovým enzymem katabolismu GSNO a zároveň i všech RSNO je S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR). Tento enzym katalyzuje ireverzibilní NADH-dependentní přeměnu GSNO, při které vzniká glutathiondisulfid a amoniak:



Rozklad S-nitrosylovaných proteinů může také probíhat transnitrosační reakcí mezi S-nitrosothiolem a thioredoxinem. Kromě těchto již zmíněných enzymů se na rozkladu RSNO podílejí také thioredoxiny, karbonylreduktasa, XOD, SOD, disulfidisomerasa,

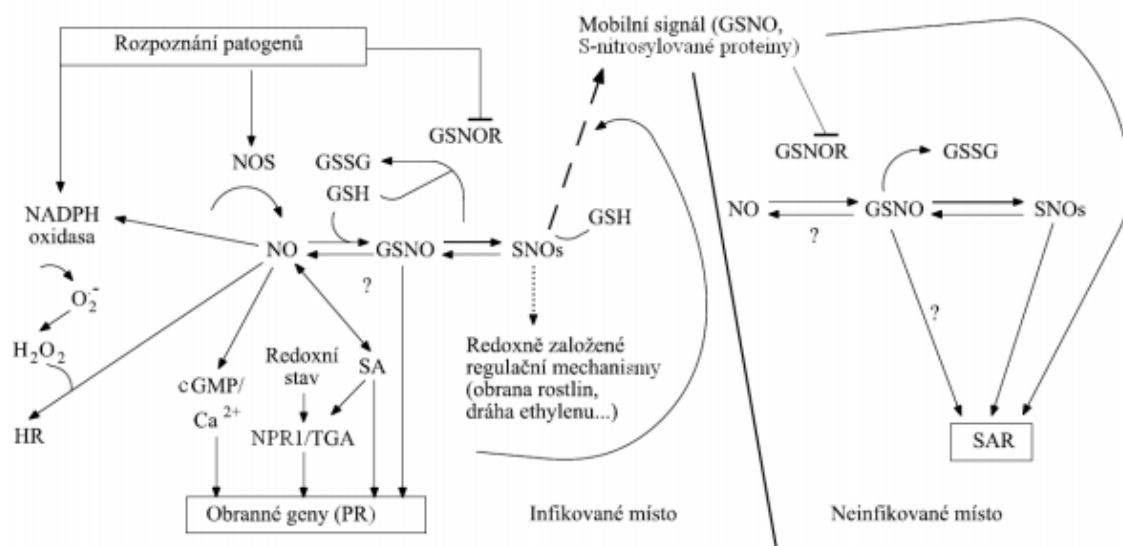
křenová peroxidasa, cytochromy P450, hemoglobiny a katalasa. Všechny enzymy podílející se na katabolismu RSNO jsou podrobněji popsány níže.

2.2 Rostlinná S-nitrosoglutathionreduktasa

První popsaná S-nitrosoglutathionreduktasa byla izolována z hovězích a kuřecích jater a byla označena jako formaldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.1.) (Strittmatter a Ball, 1955). Další charakterizovanou formaldehyddehydrogenasou byla lidská pocházející z také z jater (Uotila a Koivusalo, 1974) a pak následovaly charakterizace enzymu z dalších zdrojů. U živočichů poukazují strukturální a funkční aspekty na to, že GSNOR hraje zásadní roli v buněčné signalizaci (Foster *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2009).

U rostlin byl tento enzym poprvé popsán u *Arabidopsis thaliana* (Martinez *et al.*, 1996). Řada výsledků potvrzuje významnou roli GSNOR při odpovědi rostliny na abiotický stres. Jedná se jak o stres způsobený mechanickým poškozením (Díaz *et al.*, 2003), tak teplotní stres (Corpas *et al.*, 2008), nebo oxidační stres způsobený toxicitou těžkých kovů (Barroso *et al.*, 2006).

Zjistilo se také, že GSNOR je důležitá a široce používaná složka signálních sítí pro rezistenci rostlin proti patogenům. Jelikož je oxid dusnatý a S-nitrosothioly významné signální molekuly, které se účastní regulace imunitních odpovědí u rostlin, lze tedy předpokládat, že změny v koncentraci RSNO vlivem GSNOR povedou u rostlin k modulaci obranných reakcí na patogeny (Obr. 3, Malik *et al.*, 2011).



Obr. 3: Hypotetický model role GSNOR v obranné reakci rostlin v místě infekce patogenem a systémově získané rezistenci (SAR) ve vzdálených částech rostliny (Převzato z Kubienová *et al.* 2013a)

2.2.1 Struktura a molekulární vlastnosti GSNOR

GSNOR patří do rodiny alkoholdehydrogenas třídy III, což je vysoce konzervovaná skupina enzymů. Původně byl tento enzym označován jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.1) kvůli své schopnosti katalyzovat NAD^+ a glutathion-dependentní oxidaci formaldehydu (Koivusalo *et al.*, 1989). Později bylo zjištěno, že se enzym podílí na oxidaci hydroxylové skupiny S-(hydroxymethyl)glutathionu, který vzniká jako spontánní adukt formaldehydu a glutathionu. A výsledkem je vznik S-formylglutathionu. Došlo tedy k překlasifikování enzymu na S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasu (EC 1.1.1.284). V dnešní době je nejčastěji používán název S-nitrosoglutathionreduktasa, protože v živých buňkách spíše kontroluje hladinu GSNO. Hlavní reakcí katalyzovanou GSNOR je tedy NADH-dependentní redukce S-nitrosoglutathionu za vzniku různých produktů v závislosti na prostředí. Především však vede k tvorbě oxidovaného glutathionu a amoniaku (Jensen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001; Staab *et al.*, 2008).

GSNOR je homodimerní enzym obsahující dvě 40 kDa podjednotky. Každý monomer se skládá z katalytické a koenzymové domény a ze dvou atomů zinku, z nichž jeden má katalytickou funkci, druhý plní funkci pouze strukturní (Engeland *et al.*, 1993; Sanghani *et al.*, 2003a). Aktivní místo katalytického zinku je koordinováno dvěma cysteiny (Cys 177 a Cys 47), jedním histidinem (His69) a buď Glu70, nebo jednou molekulou vody. Tento atom zinku vystupuje jako Lewisova kyselina, a proto dokáže aktivovat alkoholy nebo ostatní substráty během katalýzy (Sanghani *et al.*, 2000).

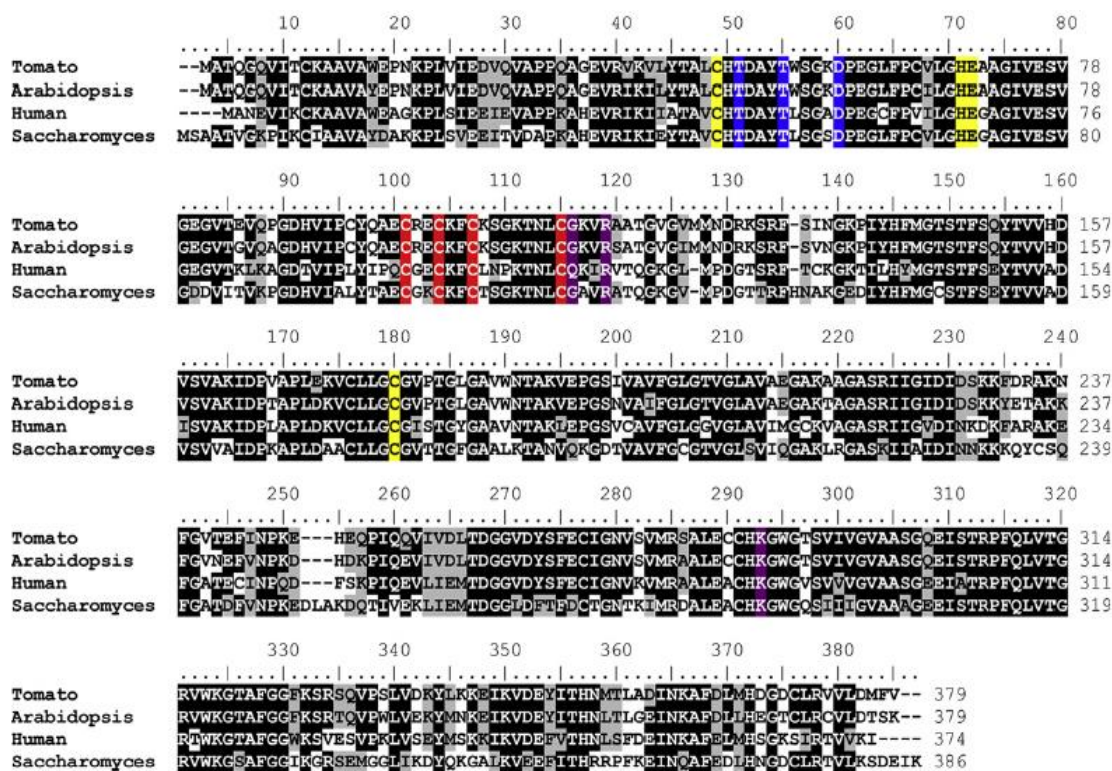
Celková struktura SIGSNOR je velmi podobná lidské (61% sekvenční identita enzymů). Na rozdíl od lidské má rajčatová a ostatní rostlinná GSNOR o pět aminokyselin více a obsahuje další dvě N-koncová a C-koncová rezidua. Vstupy pro obě aktivní místa jsou lokalizovány na stejné straně dimeru, zatímco obě koenzym-vázající místa se nachází na opačných stranách dimeru. Katalytická doména obsahuje rezidua 1-177 a 327-379, menší NAD^+ -vázající Rossmannův zářez obsahuje rezidua 178-326 a tvoří hlavní část podjednotkového rozhraní. Obě domény vázající koenzym jsou orientovány tak, aby šest β -skládaných listů z každé domény vytvořilo 12-vláknový pseudokontinuální β -skládaný list. Vazebná místa jsou velice konzervovaná a nachází se ve velké štěrbině mezi katalytickou a koenzym-vázající doménou. Rezidua jsou lokalizována ve dvou flexibilních smyčkách přes štěrbinu.

Přesná hodnota molekulové hmotnosti pro rajčatovou GSNOR 86 kDa byla stanovena pomocí MALDI-TOF hmotnostního spektrometru. Hodnota T_{50} , při které je

zachována 50% původní aktivity enzymu po třiceti minutové inkubaci, byla naměřena při 55 °C. Teplotní optimum reduktasové reakce při pH 8 bylo stanoveno při 50 °C (Kubienová *et al.*, 2013b).

2.2.2 Sekvence

cDNA (1140pb) pro GSNOR v rajčeti kóduje protein složený z 379 aminokyselin s předpokládanou molekulovou hmotností 42,5 kDa. SIGSNOR vykazuje 90% sekvenční identitu s ostatními rostlinnými GSNOR z *Arabidopsis thaliana* a *Zea mays* (GenBank přístupová čísla CAA57973 a CAA71913). Vykazuje také vysokou homologii se sekvencemi GSNOR u savců a kvasinek. Ukázalo se, že s lidskou (EMBL přístupové číslo M30471) je SIGSNOR identická ze 67% a s kvasinkovou (GenBank přístupové číslo NM_001180228) se shodují v 61% (Obr. 4) (Kubienová *et al.*, 2013b).



Obr. 4: Aminokyselinová sekvence GSNOR. Porovnání sekvencí GSNOR ze dvou rostlin *Solanum lycopersicum* (GU296438), *Arabidopsis thaliana* (CAA57973), dále *Homo sapiens* (M30471) a *Saccharomyces cerevisiae* (NM_001180228) bylo provedeno pomocí MUSCLE v3.8 (Edgar *et al.*, 2004). Identické aminokyseliny jsou označeny černě, podobné šedě (byla použita prahová hodnota 60%). Čtyři cysteiny (Cys99, Cys102, Cys105, Cys113) vázající strukturní atom zinku jsou označeny červeně. Cys177 a Cys47, His69 a Glu70, které se zapojují do vazby katalytického zinku, jsou vyznačeny žlutě. Rezidua zapojená do vazby HMGSH jsou vybarvena modře a ta, která tvoří tzv. anion-vázající kapsu, mají barvu fialovou (Převzato z Kubienová *et al.*, 2013b).

2.2.3 Substrátová specifita a kinetické vlastnosti GSNOR

Struktura aktivního místa GSNOR je odlišná od klasických enzymů z rodiny alkoholdehydrogenas třídy I. Aktivní místo je podstatně větší, s rozšířeným vstupem pro substrát do vazebné domény, a to z důvodu jeho větší vzdálenosti od reziduí 53-59 a 113-120. Vazebné místo je uzpůsobeno k vazbě větších substrátů (GSNO, HMGS, alkoholy s dlouhým řetězcem a ω -hydroxy-mastné kyseliny). Důležitou roli pro vazbu HMGS a GSNOR hraje kladný náboj Arg 114 (Staab *et al.*, 2009a; Sanghani *et al.*, 2003b).

GSNOR se specificky účastní katalýzy oxidace alkoholů s delším řetězcem, mezi které patří např. cinnamylalkohol, farnesol a geraniol, na příslušné aldehydy. Jako kofaktor se této reakce účastní NAD^+ . Z těchto alkoholů se mnohem účinněji oxidují alkoholy s řetězcem delším než 4 uhlíky (Staab *et al.*, 2009b). Mnohem nižší katalytickou aktivitu vykazuje tento enzym u zmíněných ω -hydroxy-mastných kyselin (Achkor *et al.*, 2003). Další reakcí, které se účastní kofaktor NAD^+ , je i oxidace již popsaného S-(hydroxymethyl)glutathionu. Dehydrogenasová reakce HMGS probíhá nejlépe při pH 8,0, zatímco oxidace alkoholů probíhá nejlépe při pH 10,0 (Kubienová *et al.*, 2013b).

Nejdůležitějším substrátem GSNOR je podle posledních poznatků GSNO, která probíhá nejlépe při pH 8,0. Katalytická účinnost redukce GSNO je 15-20x vyšší než u oxidace HMGS.

Hodnota K_M pro GSNO a HMGS se nachází v rozmezí 10^{-5} - 10^{-6} . Enzym vykazuje vyšší reakční rychlost v reduktasovém režimu s GSNO. U reakcí alkoholů s dlouhým řetězcem lze vyšší reakční rychlosti dosáhnout velmi vysokými koncentracemi substrátu. U ω -hydroxy-mastných kyselin je reakční rychlost závislá na délce alifatického řetězce (Kubienová *et al.*, 2013b).

2.2.4 Lokalizace GSNOR

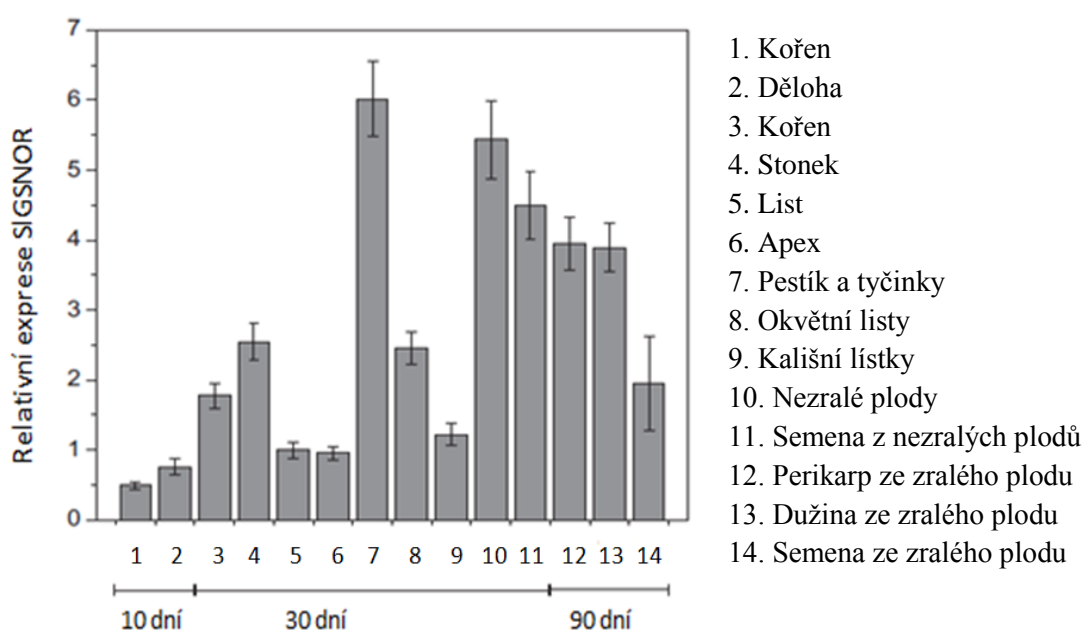
GSNOR je lokalizována převážně v cytoplazmě, ale byly také objeveny jaderné a peroxisomální lokalizace. Přítomnost GSNOR v jádře může regulovat lokální hladinu GSNOR, a tak chránit genetický materiál proti poškození způsobené pomocí NO (Fernández *et al.*, 2003; Reumann *et al.*, 2007). V rámci rostliny je tento enzym lokalizován ve floémových podpůrných buňkách a v xylémovém parenchymu (Espunya *et al.*, 2006; Rusterucci *et al.*, 2007; Vlot *et al.*, 2008). V experimentech prováděných na *Solanum lycopersicum* cv. Amateur bylo ukázáno, že dochází k vysoké

expresi proteinu v reprodukčních orgánech, což naznačuje jeho význam pro vývoj květu a tvorbu plodů (Kubienová *et al.*, 2013b).

2.2.5 Aktivita GSNOR během vývoje rostlin

Aktivita GSNOR je nezbytná pro normální vývoj a plodnost rostlin během optimálních růstových podmínek. V *Arabidopsis* je tento enzym kódován pouze jedním genem. Byla sledována exprese tohoto genu (At5g43940) v *Arabidopsis* a ukázalo se, že enzym je významně exprimován ve všech rostlinných orgánech kromě zralého pylu. Analýza GSNOR proteinu a jeho aktivity pomocí imunolokalizace a histochemie však ukázala, že je tento enzym různě exprimován v závislosti na orgánu rostliny. Nejvyšší exprese byla naměřena v první fázi vývoje, a to v kořenech a listech. U mutantů *Arabidopsis*, u kterých byla exprese GSNOR snížena nebo zvýšena, došlo k vytvoření pouze krátkého kořene, což koreluje se snížením intracelulární úrovně GSH a změnou prostorového rozložení kořene. To vše naznačuje, že GSNOR také hraje důležitou roli v regulaci redoxního stavu (Espunya *et al.*, 2006).

U desetidenních semenáčků *Solanum lycopersicum* cv. Amateur byla exprese genu GSNOR naměřena vyšší v děložních lístcích než u kořenů. U starších rostlin (30 dní) byla již exprese vyšší v kořenech a stonku v porovnání s listy a vzrostným vrcholem (Obr. 5.). Expresse se také zvyšuje v květenství, a to především v pestíku a tyčinkách, a během vývoje plodu a jeho zrání.



Obr. 5: Expresse GSNOR během vývoje rajčete. Profil exprese genu GSNOR v různých orgánech *Solanum lycopersicum* cv. Amateur určená kvantitativní real-time PCR (Převzato z Kubienová *et al.*, 2013b).

2.2.6 Úloha GSNOR v reakcích rostlin na stresové podmínky

U sazenic slunečnice po působení tepelného stresu vysokou teplotou (38 °C po dobu 4 hod.) došlo ke snížení aktivity GSNOR a exprese jeho genu v hypokotylu a současně byl tento stav doprovázen akumulací SNO (Chaki *et al.*, 2007). V důsledku toho došlo ke zvýšení nitrace proteinových tyrosinů, což je považováno za marker nitrosativního stresu (Corpas *et al.*, 2007). Z toho vyplynulo, že GSNOR reguluje hladinu S-nitrosothiolů, potenciálních zdrojů NO, který je nezbytný právě pro nitraci tyrosinů (Chaki *et al.*, 2007). Na druhou stranu stejným stresovým podmínkám byly vystaveny sazenice hrachu, ale jejich chování bylo zcela odlišné. Došlo totiž ke zvýšení aktivity GSNOR, stejně jako hladiny SNO (Corpas *et al.*, 2007). GSNOR aktivita byla také studována u rostlin stresovaných chladem. Sazenice hrachu byly inkubovány 48 hod. při 8 °C. Následná analýza aktivity GSNOR v listech ukázala zvýšení účinnosti o 67% ve srovnání s kontrolními rostlinami. Tento pokus byl také doprovázen pětinasobným zvýšením obsahu SNO oproti kontrole (Corpas *et al.*, 2007). U rostlin pepře vystavených nízké teplotě (8 °C) po dobu 24 hod. bylo chování podobné. GSNOR aktivita vzrostla o 32%, i když obsah SNO se snížil o 50%, ovšem doprovázený nárůstem hladiny GSH (Airaki *et al.*, 2011). V práci Kubienová *et al.* byly zkoumány účinky teplotního stresu, ať vysokou nebo nízkou teplotou, na dvou genotypech *Cucumis* a to *C. sativus* cv. Stela a *C. melo* a na *Pisum sativum* cv. Audit. U rostlin *C. sativus* cv. Stela stresovaných teplem došlo po čtyřech hodinách ke zvýšení aktivity GSNOR ve stonku a kořenech, po 24 hodinách došlo k poklesu téměř na hladinu kontrolních rostlin. Naopak aktivita v listech stoupala s dobou působení stresu. U *C. melo* došlo k růstu aktivity v průběhu doby působení stresu, a to zejména ve stonku. U *C. sativum* cv. Stela rostlin stresovaných chladem došlo ke zvyšování aktivity GSNOR s nárůstem doby působení chladu, přičemž nejvýraznější nárůst byl pozorován v kořenu. U *C. melo* a *Pisum sativum* cv. Audit docházelo ke zvýšení aktivity po 4 a 24 hod. působení stresu, zatímco po 48 hod. došlo zase k jejímu poklesu (Kubienová *et al.*, 2014).

U *Arabidopsis* bylo ukázáno, že GSNOR gen je regulován mechanickým poškozením a kyselinou salicylovou (Díaz *et al.*, 2003). Mechanicky poškozené hypokotylы slunečnice vykazovaly down-regulaci GSNOR aktivity, která je důležitým impulzem pro obsah SNO (Chaki *et al.*, 2010). Podobné výsledky byly hlášeny už dříve u mechanicky poškozených listů tabáku, kdy dvě hodiny po poškození došlo ke snížení hladiny mRNA i proteinu GSNOR (Díaz *et al.*, 2003). J Již výše uvedené rostliny

C. sativus cv. Stela, *C. melo* a *P. sativum* cv. Audit byly také vystaveny mechanickému poškození stonku nebo listu. Oba dva typy poškození vyvolaly zvýšení aktivity GSNOR. Poškození stonku vyvolalo postupné zvyšování aktivity daného enzymu v čase, a to ve stonku i v kořenu, zatímco u poškozených listů *C. sativum* cv. Stela došlo po 24 hod. ke snížení aktivity. Všechny testované orgány *P. sativum* cv. Audit ukazovaly nárůst aktivity po 24 hod. ve srovnání s hodnotami po 4 hod. Výrazné změny v aktivitě GSNOR v čase byly pozorovány v poškozených listech *C. sativum* cv. Stela. Aktivita enzymu v kořenech rostla od 4 hod. do 24 hod. po poškození, ale aktivita v listech rostla pouze do 4 hod po poškození a po 24 hod. se snižovala téměř až na kontrolní hodnoty (Kubienová *et al.*, 2014).

U rostlin hrachu byl oxidační stres vyvolán během pěstování přidáním 50 μmol kadmia. Při analýze se zjistilo, že došlo k 31% snížení jak GSNOR aktivity, tak i exprese transkriptu. To vše bylo navíc ještě doprovázeno sníženým obsahem SNO, GSH a GSNO (Barroso *et al.*, 2006). Na druhou stranu u semenáčků *Arabidopsis*, které byly pěstovány v přítomnosti 0,5 mM arsenu, sice došlo k významnému zkrácení kořenů, ale aktivita GSNOR naopak vzrostla současně i s hladinou NO (Leterrier *et al.*, 2011).

Byl také studován vliv světla na aktivitu GSNOR u rostlin. Rostliny hrachu byly pěstovány za normálních světelných podmínek, pouze ve tmě a rostliny kultivované ve tmě a následně přenesené na světlo. U všech testovaných rostlin nedošlo k žádné změně aktivity v kořenech a postupně docházelo k jejímu poklesu v průběhu experimentu nezávisle na světelných podmínkách. Na druhou stranu velký vliv světla na aktivitu GSNOR byl pozorován u hypokotylu. U rostlin pěstovaných pouze ve tmě došlo k významnému snížení účinnosti enzymu v porovnání s rostlinami pěstovanými na světle. Po přechodu rostlin pěstovaných ve tmě na světlo došlo k pomalému nárůstu aktivity GSNOR v hypokotylu, nárůst však nebyl nijak výrazný. Až po 168 hod, kdy již rostliny byly kultivovány při 12 hod světelné periodě, došlo k výraznému zvýšení aktivity ve srovnání s rostlinami, které nadále rostly ve tmě (Kubienová *et al.*, 2014).

Mutace genu AtGSNOR1 u *A. thaliana* moduluje hladinu tvorby buněčného SNO, který reguluje různé formy odolnosti vůči onemocnění rostlin. Transgenní *A. thaliana* se sníženým množstvím GSNOR vykazuje vyšší rezistenci proti patogenu *Peronospora parasitica*, který zřejmě koreluje s vyššími hladinami intracelulárních SNO (Rustérucci *et al.*, 2007, Hong *et al.*, 2008). U kultivaru slunečnice odolného vůči

Plasmodium halstedii byla inverzní korekce mezi GSNOR aktivitou a distribucí hladiny GSNO nalezena v infikovaném hypokotylu (Leterrier *et al.*, 2011).

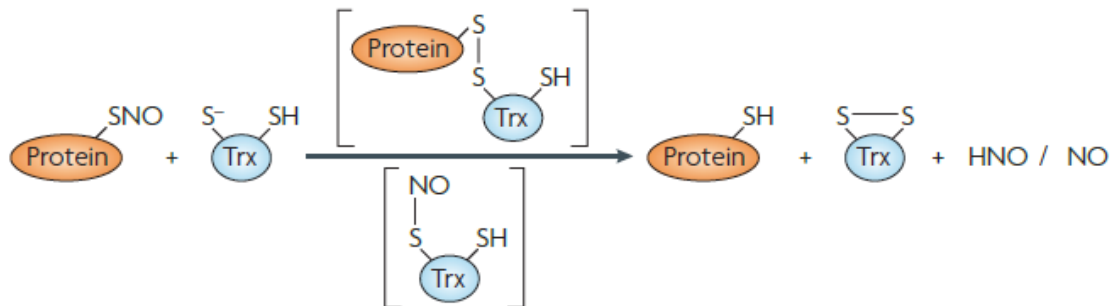
2.3 Další enzymy katabolismu S-nitrosothiolů

2.3.1 Thioredoxin

Thioredoxin (Trx), thioredoxinreduktasa (TrxR, EC 1.8.1.9) a NADPH tvoří thioredoxinový systém. Thioredoxinreduktasa je specifický dimerní 70 kDa flavoprotein, vyskytující se u bakterií, rostlin a hub, který obsahuje redoxní aktivní místo pro disulfid/dithiol. U vyšších eukaryot je thioredoxinreduktasa větší (112-130 kDa) a jedná se o selen-dependentní dimerní flavoprotein s širokou substrátovou specifitou. Všechny savčí TrxR jsou homologní ke glutathionreduktasám a obsahují konzervativní C-koncové prodloužení obsahující sekvenci cystein-selenocystein, která tvoří aktivní místo pro selenenylsulfid/selenothiol. (Arnér a Holmgren, 2000).

Trx a TrxR jsou zapojeny do důležitých buněčných procesů a mají klíčovou roli v ochraně před oxidativním stresem. (Lillig *et al.*, 2007). Bylo dokázáno, že Trx v buňkách s vysokou koncentrací NO donorů byl schopen zvrátit jejich inhibiční účinky na protein (Nikitovic *et al.*, 1998; Kahlos *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1998). Trx/TrxR je také schopen přímo rozdělit GSNO *in vitro* (Nikitovic *et al.*, 1996).

Ve všech organismech obsahují Trx proteiny konzervativní sekvenci Cys-Gly-Pro-Cys aktivního místa, které je nezbytné pro funkci enzymu jako disulfidoxidoreduktasy (Obr. 6.; Lillig *et al.*, 2007). První práce o mechanismu rozkladu SNO zprostředkovaného Trx uváděly, že Trx nebo TrxR mohou podporovat rozklad GSNO, který je doprovázen snížením NO (Nikitovic *et al.*, 1996). Další studie dokazují, že spíše Trx protein interaguje přímo s SNO (Stoyanovsky *et al.*, 2005). Produktem této navrhované reakce je spíše nitroxyl (HNO) než samotný NO (Arnelle *et al.*, 1995). Nejnovější poznatky naznačují, že by denitrosylace mohla probíhat přes disulfidový meziprodukt vytvořený ze substrátu a Trx (Benhar *et al.*, 2008) nebo alternativně prostřednictvím převodu NO skupiny (Stoyanovsky *et al.*, 2005).



Obr. 6: Biochemický mechanismus proteinové denitrosylace. Existují dva reakční mechanismy denitrosylace v přítomnosti Trx. První mechanismus vytvoří intramolekulární disulfidový meziprodukt a druhý je pomocí transnitrosylace. Sterické efekty a geometrie nitrosothiolů napomáhají určit mechanismus, který bude u daného nitrosothiolu převládat (převzato z Benhar *et al.*, 2009).

2.3.2 Protein disulfidisomerasa

Protein disulfidisomerasa (PDI, EC 5.3.4.1) je oxidoreduktasa patřící do rodiny Trx. Jedná se o 55 kDa multifunkční protein v endoplasmatickém retikulu, který se podílí na skládání proteinů obsahující disulfid (Freedman *et al.*, 1994). Katalyzuje tvorbu, přeskupení a rozbití disulfidové vazby, která je často krokem, který omezuje rychlost složení nově vzniklého proteinu (Givol *et al.*, 1965; Creighton *et al.*, 1993; Creighton *et al.*, 1995; Darby *et al.*, 1994). Dále PDI také tvoří podjednotku dvou oligomerních proteinů, prolyl-4-hydroxylasa (Pihlajaniemi *et al.*, 1987) a mikrosomální triglycerid-transferový protein (Gordon *et al.* 1995 a Lamberg *et al.* 1996).

Na povrchu buněk podporuje PDI přenos NO z extracelulárních SNO na intracelulární thioly, což naznačuje, že PDI je nezbytný pro přenos NO bioaktivity z extracelulárního prostředí do cytosolu (Zai *et al.*, 1999). Nicméně zůstává nejasné, zda je tento přenos zprostředkován přímo PDI, nebo alternativním membránovým proteinem, který je modifikován PDI. *In vitro* však bylo dokázáno, že PDI rozkládá GSNO (Sliskovic *et al.*, 2005). Tato reakce pravděpodobně zahrnuje přenos NO^+ k jednomu vicinálnímu thiolu aktivního místa PDI podjednotky, následované tvorbou nitroxyl-disulfidového meziproduktu a výsledným produktem je oxidovaná PDI a NO.

2.3.3 Karbonylreduktasa

Karbonylreduktasa (EC 1.1.1.184) patří do rodiny dehydrogenas a reduktas s krátkým řetězcem, které jsou známé jako aldo-keto reduktasy. Jsou to NADPH-dependentní cytosolické enzymy se širokou substrátovou specifitou pro mnoho endogenních a xenobiotických karbonylů.

Lidská karbonylreduktasa 1 efektivně redukuje GSNO *in vitro* pomocí mechanismu, který je podobný tomu u NADH-dependentní GSNOR. Pravděpodobně se podílí na 30% NADPH-dependentní GSNO reduktasové aktivity u A459 buněk adenokarcinomu plic (Bateman *et al.*, 2008).

2.3.4 Xanthinoxidasa

Xanthinoxidasa (XOD, EC 1.17.3.2) je flavin obsahující enzym, který se vyskytuje u různých druhů a ve všech živočišných tkáních. Jedná se o velký 270 kDa protein obsahující dvě flavinové molekuly navázané jako FAD, dále dva atomy molybdenu, které tvoří aktivní místa enzymu, a osm atomů železa, které společně se sírou vytváří [2Fe-2S] klastry. XOD katalyzuje oxidativní hydroxylaci purinových substrátů ve svém molybdenovém centru. Tyto reakce generují reaktivní formy kyslíku: superoxidový radikál (O_2^-), nebo peroxid vodíku.

Cys-NO a GSNO jsou pomocí XOD rozkládány za přítomnosti purinového substrátu. Za aerobních podmínek používá XOD jako donory elektronů Cys-NO, nebo v případě jeho snížení GSNO a kyslík. Touto reakcí by mohl vznikat peroxyinitrit, vzhledem k reakci O_2^- s NO (Trujillo *et al.*, 1998). Vysoké hodnoty K_M pro SNO naznačují, že tato reakce by musela být rozložena na menší části, aby byla za fyziologických podmínek možná.

2.3.5 Superoxiddismutasa

Forma superoxiddismutasy (SOD, EC 1.15.1.1) bohaté na měď a zinek katalyzuje intracelulární i extracelulární přeměnu O_2^- na peroxid vodíku a O_2 . Jde o 63 kDa dimerní metaloprotein obsahující dva atomy mědi a zinku v každé podjednotce.

Zn/Cu SOD může být schopna katalyzovat rozklad GSNO a Cys-NO za vzniku volného NO. Okado-Matsumoto a Fridovich připisují denitrosylační účinek SOD mědi. Dokonce se předpokládalo, že SOD může katalyzovat S-nitrosylační reakce zahrnující především hemoglobin (Romeo *et al.*, 2003)

2.3.6 Glutathionperoxidasa

Savčí glutathionperoxidasa (GPX 1, EC 1.11.1.9) je homotetramerní enzym obsahující selen, který chrání buňku před oxidativním poškozením prostřednictvím snižování peroxidů.

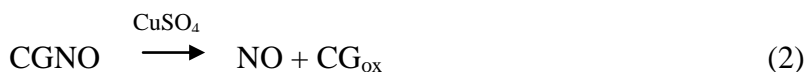
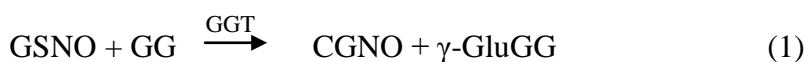
In vitro je GPX 1 schopna katalyzovat redukci GSNO, a to i v nepřítomnosti thiolů, které by mohly odrážet SNO-lyasovou aktivitu selenocysteinu (Hou *et al.*, 1996), což je

v souladu se schopností enzymu potencovat inhibiči funkce krevních destiček pomocí SNO (Freedman *et al.*, 1995).

2.3.7 γ -Glutamyltranspeptidasa

γ -Glutamyltranspeptidasa (GGT, EC 2.3.2.2) je heterodimerní glykoprotein, který je ukotven na povrchu cytoplasmatické membrány rostlin i živočichů. GGT katalyzuje transfer γ -glutamové skupiny z dárce (glutathionu) za vzniku meziprojektu acyl-enzym, který dále reaguje s akceptorovým substrátem obsahující volnou aminoskupinu za vzniku nové γ -glutamyl-isopeptidové vazby a regenerace enzymu (Keillor *et al.*, 2005).

Byla studována kinetika GGT v přítomnosti GSNO jako substrátu a glycin-glycinu jako akceptoru. GGT je schopen hydrolyzovat γ -glutamylovou část GSNO, čímž se získal S-nitrosocysteinyl-glycin (CGNO) a γ -glutamyl-GG. Nastal ovšem problém při spektrofotometrickém měření, kdy GSNO i CGNO absorbovaly při stejné vlnové délce 334 nm. Reakce (2) je velmi rychlá oproti reakci (1), a tak bylo možno pozorovat pokles absorbance (Angeli *et al.*, 2009):

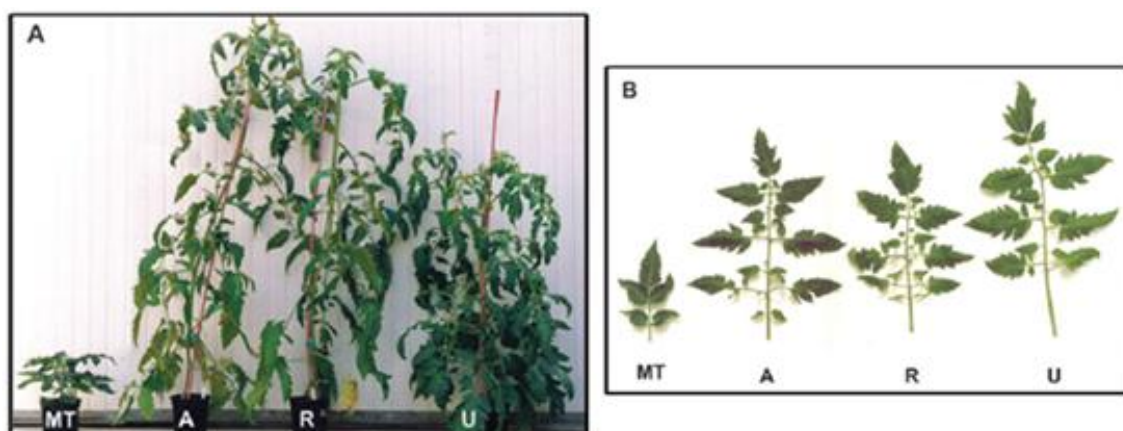


Hogg *et al.* demonstrovali, že GGT stimuluje uvolnění NO z GSNO v přítomnosti přechodného kovu (Hogg *et al.*, 1997). Enzymatický mechanismus však nevedl k uvolnění NO v přítomnosti chelatačního činidla v reakčním médiu. To lze vysvětlit rozdílnou stabilitou GSNO ve srovnání s CGNO vůči katalytickému rozkladu Cu ionty. Rozklad CGNO pomocí Cu (II) je velmi rychlý, v rozmezí 5 s, zatímco rozklad GSNO je o 3-4 řády pomalejší (Noble *et al.*, 2000).

2.4 *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom

Kultivar Micro-Tom vznikl křížením dvou kultivarů rajčat Florida Basket a Ohio 4013-3. Projevuje se trpasličím fenotypem s malými, červeně zrajícími plody (Obr. 7; Marti *et al.*, 2006). Jeho malý vzrůst, krátký životní cyklus (70-90 dní), malý genom (350Mpb) a tím pádem snadná transformace jsou hlavními důvody, proč byl Micro-Tom navržen jako nový rostlinný modelový organismus pro studium regulace

a vývoje červených bobulovitých plodů (Meissner *et al.*, 1997; Eyal a Levy, 2002). Micro-Tom je také schopen růst při vysoké hustotě více než 1300 rostlin/m².



Obr. 7: Porovnání fenotypu různých kultivarů rajčete. (A) celé rostliny v období kvetení (2 měsíce staré), (B) pátý list ze stonku. MT – Micro-Tom, A - Ailsa Craig, R - Rutgers, a U - UC-82 (převzato z Martí. *et al.*, 2006).

Nejprve se předpokládalo, že trpasličí fenotyp Micro-Tomu je způsoben mutacemi dvou hlavních recesivních genů: „*dwarf (D)*“ a „*miniature (MNT)*“ (Meissner *et al.*, 1997). Následné alelové testy potvrdily mutaci D genu (Lima *et al.*, 2004). Určený fenotyp Micro-Tom také odpovídá mutaci v genu „*self-pruning (SP)*“.

SP patří do rodiny CETS regulačních genů, které kódují 23 kDa modulátorové proteiny, které určují potenciál pro kontinuální růst výhonků apikálního meristému (Pnueli *et al.*, 2001). U SP genu došlo k záměně T za C v poloze 227, což mělo za následek změnu prolinu za leucin v pozici 76 (Pnueli *et al.*, 1998).

Dwarf gen byl izolován transpozonním značkováním (Bishop *et al.*, 1996). Ukázalo se, že kóduje protein P450, který se podílí na katalýze C-6 oxidace 6-deoxocasteronu na castasteron v syntéze brassinosteroidů (Bishop *et al.*, 1999). U rajčat se D gen vyskytuje ve všech orgánech, především pak ve vegetativních a reprodukčních pletivech během vývoje (Montoya *et al.*, 2005). Různé *d* mutace se prezentují jako různé stupně zakrslosti, vrásčitosti listů a fenotyp s tmavě zelenými listy (Nadzhimov *et al.*, 1988; Bishop, 2003). Ukázalo se, že kultivar Micro-Tom je deficientní v biosyntéze BR právě z důvodu mutace v D genu. Mutace D genu obsahuje změnu báze 39 AG v konsenzuální oblasti intronu 8, která vede k nesprávnému sestřihu a produkci transkriptů o 8 a 14 bází kratších než původní wild typ. Tyto transkripty mají předčasné stop kodony. Ty mohou produkovat peptidy, které mají o 23 a 26 méně

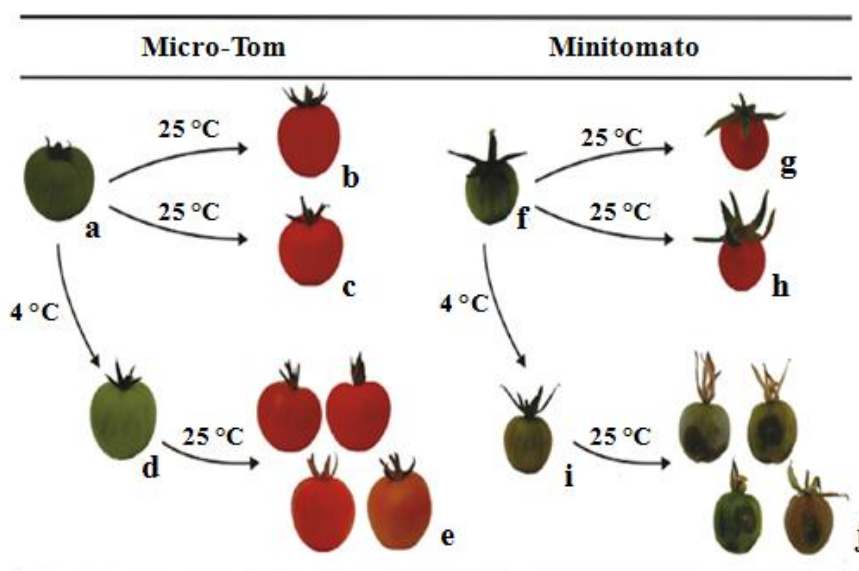
aminokyselin než wild typ. Protože je pravděpodobné, že všechny tři domény proteinu P450 (Bishop *et al.*, 1996) nejsou nijak ovlivněny, nedochází ke snížení funkce enzymu a je tedy generován pouze slabě odlišný fenotyp.

2.4.1 Odolnost Micro-Tom na biotické a abiotické stresy

U rajčat již bylo popsáno kolem 60 vážných onemocnění a více než 110 patogenních druhů včetně rostlinných patogenních hub, bakterií a virů (Jones *et al.* 1991; Kenneth 2001). Původci nejčastějších plísňových onemocnění rajčat jsou *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* *Botryotinia fuckeliana*, *Phytophthora infestans*, *Oidiopsis sicula*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Athelia rolfsii*, *Corynespora cassiicola*. Dalšími původci závažných onemocnění rajčat jsou bakterie *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae pv. tomato* a *Agrobacterium tumefaciens*. Kromě toho mozaikové onemocnění u rajčat (buď s nekrózou nebo bez ní) je vyvolané virem rajčatové mozaiky (ToMV), virem okurkové mozaiky (CMV), bramborovým virem X (PVX), virem aspermie rajčete (TAV) a virem bronzovitosti rajčete (TSWV). Celkem byla u kultivaru Micro-Tom testována odolnost vůči 8 houbovým patogenům (*Alternaria alternata f. sp. lycopersici*, *Athelia rolfsii*, *Botryotinia fuckeliana*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* kmen 1, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* kmen 2, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* kmen 3, *Oidium sp.*, *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum*), 5 bakteriím (*Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1, *Agrobacterium tumefaciens* biovar 2, *Pseudomonas syringae pv. tomato* kmen 0DC3000, *Pseudomonas syringae pv. tabaci* izolát 6605, *Pseudomonas syringae pv. glycinea* kmen 4) a 3 virům (virus rajčatové mozaiky, virus okurkové mozaiky a virus aspermie rajčete). Infekce houbovými patogeny byla potvrzena vývojem symptomů, tvorbou spor a růstem mycelia. Bakteriální infekce byly dokázány měřením množství bakterií v symptomatických rostlinách a akumulace virů byla analyzována imunologicky. Výsledky testů ukázaly, že Micro-Tom je dobrou hostitelskou rostlinou, protože pět z osmi houbových patogenů, pět bakterií a všechny tři viry byly pro tento kultivar patogenní. Na druhé straně Micro-Tom vykazoval hypersenzitivní odolnost proti *Corynespora cassiicola* s tvorbou místní nekrotické léze a nehostitelskou odolnost proti *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* a vůči alespoň dvěma kmenům *Pseudomonas syringae*. Z výsledků také vyplývá, že se kultivar Micro-Tom může

používat jako vynikající model hostitelské rostliny pro studium mechanismů, které probíhají na pozadí interakcí mezi rostlinou a patogenem (Takahashi *et al.*, 2005).

Gonzalez *et al.* provedli studii na kultivarech rajčat Micro-Tom a Minitomato v odolnosti jejich plodů vůči poškození chladem. Plody byly sklizeny v zelené fázi a skladovány čtyři týdny při 4 °C. U kultivaru Minitomato se po čtyřech dnech začaly rozvíjet příznaky chladového poškození, na konci pokusu pouze 10% plodů zčervenalo a 75% plodů se zhoršilo nebo shnilo. Na druhou stranu u kultivaru Micro-Tom 88% plodů zčervenalo a zbytek nedosáhl úplně červené barvy (Obr. 8). Ukázalo se tedy, že plody Micro-Tomu jsou na rozdíl od jiných odrůd rajčat tolerantní k chladu aplikovanému po sklizni (Gonzalez *et al.*, 2015).

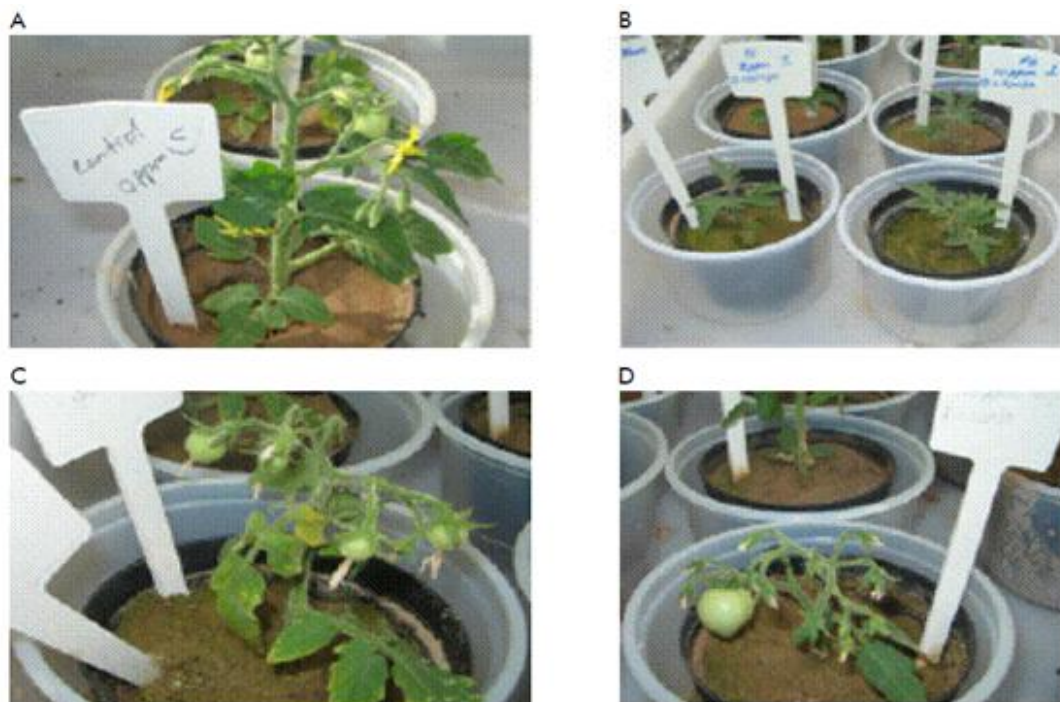


Obr. 8: Posklizňové zchlazení plodů rajčat Micro-Tom a Minitomato. Plody byly sklizeny v zeleném stavu (a, f), skladovány po dobu čtyř týdnů při 4 °C (d, i) a poté se nechaly dozrát při 25 °C. Micro-Tom dozrál do červené barvy (e), zatímco Minitomato vykazovalo poškození chladem (j). Jako kontrola byly použity plody zrající na rostlině (b, g) a plody zrající mimo rostlinu v inkubátoru (c, h) (převzato z Gonzalez *et al.*, 2015).

V práci Knight *et al.* (1992) studovali salinitní stres u hydroponicky pěstovaných rostlin Micro-Tom. Uvádí, že v listech došlo ke zvýšení Na^+ a snížení Ca^{2+} obsahu se zvyšující se koncentrací NaCl v živném roztoku. Zjistilo se, že zvyšující se koncentrace NaCl postupně způsobuje vytlačení Ca^{2+} z buněčné membrány a narušuje tak membránovou koncentraci vápníku (Cabanero *et al.*, 2006). Vliv salinitního stresu byl také studován v závislosti na různých světelných podmínkách: ve tmě, při vysokém osvětlení ($595 \pm 2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a při nízkém osvětlení ($223 \pm 12 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) na vývoj plodů pěstovaných *in vivo* na hydroponicky pěstovaných rostlinách a na *in vitro* plodech

v tkáňových kulturách. Většina ovoce v *in vitro* podmínkách zrála normálně i za salinitního stresu a různých světelných podmínek. Poměr růstu se snížil u rostlin stresovaných vysokou koncentrací solí při nízké i vysoké intenzitě osvětlení. Nicméně se výrazně nelišil mezi danými světelnými podmínkami. Procento sušiny bylo vyšší v *in vitro* plodech při nízkém a i vysokém ozáření oproti kontrolám, zatímco u plodů pěstovaných ve tmě nedošlo k žádné změně. Podobně na tom byly výsledky i u *in vivo* pěstovaných plodů. Kromě toho proporcionální zvýšení procenta sušiny indukované salinitním stresem bylo 1,2 - 1,3 krát vyšší než u kontrol pro oba typy pěstovaných plodů (Zushi *et al.*, 2014). V rámci této studie byl také zkoumán vliv salinitního stresu a světelných podmínek na obsah kyseliny askorbové (ASA) a antioxidantních systémů, které souvisí s ASA, v plodech rajčete Micro-Tom. Plody byly pěstovány v tkáňových kulturách a pro porovnání byla ještě pěstována rajčata hydroponicky. Ta byla stresována 100 mM NaCl v živném roztoku. Plody byly také pěstovány při různých světelných podmínkách a sbírány zralé (červené). Solí indukované změny v koncentraci ASA byly závislé na vysoké intenzitě světla takže, čistá akumulace ASA byla snížena salinitním stresem za vysokého osvětlení jak u plodů kultivovaných *in vivo* tak *in vitro*. Zatímco u plodů pěstovaných ve tmě nebo u *in vitro* plodů pěstovaných při nízkém osvětlení k žádné takovéto změně nedošlo. Vyšší aktivity antioxidantních enzymů, jako jsou askorbátperoxidasa, dehydroaskorbátreduktasa a katalasa, byly stanoveny pouze u plodů pěstovaných při vysokém osvětlení.

Rostliny Micro-Tom byly také podrobeny stresu způsobeného aplikací těžkého kovu. Semenáčky po vývoji prvních opravdových listů byly přesazeny do květináčů s pískem a byly ošetřovány roztoky obsahujícími olovo (5 a 10 mg PbAc₂/kg zeminy), které byly aplikovány dvakrát týdně. V době kvetení a dozrání plodů byly sklizeny listy pro další analýzu. U rostlin pod Pb-stresem byl vidět snížený růst (Obr. 9) a po 35 dnech růstu se na listech začaly objevovat chloróza a nekrotické léze, což dokazuje změnu ve vstřebávání minerálních látek a fotosyntéze. Rostliny ošetřené vyšší koncentrací olova ztratily během 35 dnů všechny listy a měly značně snížený růst (Pérez *et al.*, 2013).



Obr. 9: Růst rostlin za podmínek s různým obsahem olova. (A) kontrolní rostlina bez Pb-stresu, (B) desetidenní semenáčky ošetřené 5 mg (vlevo) a 10 mg (vpravo) PbAc₂/ kg zeminy, (C) 35-denní rostlina ošetřovaná 5 mg PbAc₂/ kg zeminy, (D) 35-denní rostlina ošetřená 10 mg PbAc₂/ kg zeminy (převzato z Pérez *et al.*, 2013).

3 Experimentální část

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); centrifuga CL31R (Thermo Jouan, Francie); centrifuga 6K15 (Sigma, Německo); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); dokumentační zařízení BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP, USA); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); laminární box (Schoeller, ČR); magnetická míchačka (IKA, Německo); mikrodestičkový reader Synergy HT (Bio-Tek, USA), chemiluminiscenční scanner (LI-COR; UK), termostat (Grant, UK); třepačka VXR basic (IKA, Německo); vortex (Stuart, UK); zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA), PCR termocykler (Eppendorf, Německo), přístroj CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA); kolonky PD-10 (GE Healthcare, USA); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); nitroceluloseová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA).

3.1.2 Chemikálie

Acros Organics (USA): glutathion; Triton X-100.

AppliChem (Německo): sušené nízkotučné mléko.

Axon Medchem (Nizozemsko): N6022

Bio-Rad (USA): Coomassie Brilliant Blue R-250, proteinový standard Precision Plus ProteinMT Duo Extra, Turbo blot buffer.

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

Fluka (Švýcarsko): TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin), tris(2-karboxyethyl)fosfin,

Lach-Ner (Česká republika): chlorid sodný, aceton; diethylether; formaldehyd; hydroxid sodný, hydroxid draselný; methanol, kyselina chlorovodíková

Machery-Nagel: NucleoSpin RNA Plant, DNAsa

Merck (Německo): Ponceau S.

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

Penta (Česká republika): etanol

Roche (Švýcarsko): Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesys Kit

Sigma-Aldrich (USA): akrylamid; dihydrogenfosforečnan draselný; dihydrogenfosforečnan sodný; dithiotreitol; dusitan sodný; dodecylsulfát sodný; glycin; glycerol; hovězí sérový albumin; hydrogenfosforečnan draselný dihydrát; hydrogenfosforečnan sodný dihydrát; merkaptoethanol; roztok NBT-BCIP; *N, N'*-methylenbisakrylamid; *N, N, N', N'*-tetramethylethyldiamin; persíran amonný; sekundární kozí protilátka na králičí imunoglobuliny značená alkalickou fosfátasou; Tween-20, butanol, geraniol, imidazol, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid, lysozym, nikotinamidadenindinukleotid redukovaný (NADH), nikotinamidadenindinukleotid oxidovaný (NAD⁺), askorbát, Tris-HCl, oxidovaný glutathion, EDTA Na⁺, katalasa, bromfenolová modř, S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin, Diethylamin, inhibitor proteas, streptomycin

Thermo Scientific (USA): B-PER (bakteriální proteinové extrakční činidlo), SYBER Green.

Top-Bio (Česká republika): DNAsa, RNAsa

Primární polyklonální protilátka na-GSNOR ze *Solanum lycopersicum*: Primární protilátka připravená s využitím rekombinantního proteinu GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur byla poskytnuta Dr. Lucií Činčalovou (Kubienová *et al.*, 2013).

Rekombinantní protein GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur: rekombinantní *E. coli* byla poskytnuta Dr. Lucií Činčalovou.

3.2 Biologický materiál

3.2.1 *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom

Pro experimenty k vývojové studii byly použity vegetativní orgány rajčete Micro-Tom 15 a 30 dní staré, rozmnožovací orgány byly odebírány po 105 dnech, po vyzrání plodů (Obr. 10).

Pro studování vlivu teplotního stresu na aktivitu GSNOR v listech rajčete cv. Micro-Tom byly použity rostliny staré 10 týdnů.

(A)



(B)



Obr. 10: Vývojová stádia rajčete Micro-Tom. (A): 15-denní rostliny, (B): 8 týdenní rostlina.

3.3 Experimentální metody

3.3.1 proteinu GSNOR ze *Solanum lycopersicum* a *Arabidopsis thaliana*

Do 100ml Erlenmayerových baněk bylo přidáno 20 ml Luria/Bertani média (LB) (složení: trypton ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), chlorid sodný ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), kvasničný extrakt ($5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$); pH $7 \pm 0,2$), následně byl přidán 1 ml 20% glukosy a 50 μl streptomycinu ($50 \text{ }\mu\text{g/ml}$). Do takto připraveného média bylo přidáno 5 μl buněčné suspenze transformované *E. coli*. Prekultura se nechala inkubovat přes noc při 37°C na třepačce (200 rpm).

Druhý den byla prekultura centrifugována při 4 000 g po dobu 5min při 20°C . Pelet usazený na dně se po odlití supernatantu resuspendoval v 10 ml LB média s antibiotikem streptomycinem ($50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Resuspendované bakterie byly přelity do sterilní Erlenmayerovy baňky obsahující 190 ml LB média obsahující streptomycin ($50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a inkubovány 90 min. Během inkubace byla měřena optická hustota (OD_{600}) kultury při 600nm. Při dosažení hodnoty 0,5-0,6 bylo ke kultuře přidáno 200 μl 0,5 M isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG). Indukce exprese rekombinantního proteinu po přidavku IPTG probíhala přes noc při 20°C za mírného třepání (200rpm).

Následující den byla kultura centrifugována při 4000 g 20 min při 20°C . Pelet byl resuspendován v 40 ml 0,9% NaCl na vortexu a znovu centrifugován při 4000 g 10 min při 4°C . Bakteriální pelet byl resuspendován v 3 ml lyzačního pufru (Tab 1) a vortexován. Následně bylo přidáno 2,5 ml komerčního roztoku B-PER a znovu vortexováno. Po promíchání následovala 10 min inkubace při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 300 μl zásobního roztoku lysozymu ($50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), po promíchání na vortexu se směs nechala inkubovat 30-60 min při laboratorní teplotě. Dostatečná lýze buněk se projevila gelovatěním roztoku. Poté byly přidány 4 ml vody a opět následovalo promíchání na vortexu, po kterém se ke vzorku přidalo 20 μl zásobního

roztoku RNAsy ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $10 \mu\text{l}$ zásobního roztoku DNAsy1 ($10 \text{ U}\cdot\mu\text{l}$), promíchání se provedlo pouze opakovaným (5x) otočením zkumavky. Výsledná preparát byl inkubován 30 min při 37°C na vodní lázni. Nakonec bylo přidáno $1,2 \text{ ml}$ 1M NaCl a $1,3 \text{ ml}$ 50% glycerolu, a preparát byl centrifugován 30 min na 12000 g při 4°C . Supernatant byl přenesen do nové plastové zkumavky.

Purifikace rekombinantního proteinu byla provedena na kolonkách Cobalt Spin Column. Nejprve byly kolonky promyty $3 \times 5 \text{ ml}$ ekvilibračního pufru (Tab 2) a centrifugovány 1 min při 500 g . Na ekvilibrovanou kolonku byl nanesen supernatant z extrakce, následně byla kolonka se supernatantem inkubována 60 min na rotátoru při 4°C . Následovala centrifugace 1min při 500 g . Kolonka pak byla promyta $3 \times 5\text{ml}$ ekvilibračního pufru. Následovala eluce 3 ml elučního pufru (Tab. 3), se kterým byla kolonka inkubována 30 min na rotátoru při 4°C . Po centrifugaci (1min při 500 g) byl odebrán supernatant (frakce 1), znova byly nanесeny 3 ml elučního pufru a kolonka byla opět inkubována 30min na rotátoru při 4°C . Následnou centrifugací vznikla frakce 2.

U obou frakcí byla následně provedena dialýza na výměnu pufrů.

Tab. 1: Složení lyzačního pufru

	celkový objem 3 ml
50 mM Tris HCl, pH 8	1,25 ml 400 mM (zásobní roztok)
10 mM MgCl₂	250 μl 400 mM (zásobní roztok)
inhibitor proteas (PMSF)	250 μl
Voda	1,25 ml

Tab.2 :Složení ekvilibračního pufru

	výsledná koncentrace
Tris HCl, pH 8	20 mM
NaCl	100 mM
imidazol	250 mM
glycerol	5%

Tab. 3: Složení elučního pufru

	výsledná koncentrace
Tris HCl, pH 8	20 mM
NaCl	100 mM
imidazol	10 mM
glycerol	5%

3.3.2 Extrakce a purifikace rostlinného materiálu

Z rostlinného materiálu byly připraveny extrakty homogenizací v tekutém dusíku. K homogenizovanému materiálu byl přidán extrakční pufr (50 mM Tris, 0,1 mM EDTA Na⁺, 0,2% (v/v) Triton X-100, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) v poměru 2 ml extrakčního pufru na 1 g rostlinného materiálu). Homogenát byl centrifugován 20 min při 16000 g a 4 °C. Supernatant byl následně přečištěn na kolonce NAP-10. Pomocí 3 x 2,5 ml 10 mM Na-Pi, pH 6,8, byla kolonka ekvilibrována. Následně po vsáknutí pufru byl nanesen 0,5 ml extraktu, po vsáknutí byl enzym eluován 1 ml 50mM K-Pi, pH 7,8. Byl jímán 1 ml eluátu. Po ukončení separace byla kolonka promyta deionizovanou vodou (Corpas *et al.*, 2008).

3.3.3 Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR

Aktivita GSNOR byla stanovena pomocí Warburgova optického testu. Tento test je založen na změně absorbance při redoxní přeměně koenzymu NAD⁺/NADH při 340 nm ($\epsilon = 6200 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Aktivita GSNOR byla měřena spektrofotometricky při 340 nm a při 30 °C. Měření bylo provedeno na 96-jamkových mikrodestičkách. Do jednotlivých jamek bylo nanášeno 225 μl reakčního pufru (20 mM Tris, pH 8, 0,5 mM EDTA Na⁺), 15 μl extraktu, 30 μl 20 mM NADH. Reakce byla startována přidávkem 30 μl 4 mM GSNO. V případě blanku bylo GSNO nahrazeno 30 μl deionizované vody.

U měření reduktasové aktivity rekombinantního proteinu GSNOR bylo do každé jamky pipetováno 60 μl reakčního pufru (20mM Tris HCl, pH 8), 20 μl 2mM NADH, 20 μl 4mM NADH a 100 μl naředěného enzymu (2 μl enzymu v 1000 μl reakčního pufru). U měření dehydrogenasové reakce bylo do jednotlivých jamek nanášeno 40 μl Na-fosfátového pufru (0,1 M, pH 8), 30 μl 16 mM NAD⁺, 30 μl 10mM HMGSH a 100 μl naředěného enzymu (2 μl enzymu v 1000 μl reakčního pufru).

Příprava S-nitrosoglutathionu

S-nitrosoglutathion byl připraven podle práce Moora a Mani, 2002. Navážka 614 mg glutathionu (GSH, 2 mmol, MW = 307,3) byla rozpuštěna v 3 ml 0,5 M HCl a vychlazena na ledové lázni. Navážka 138 mg NaNO₂ (2 mmol, MW = 69) byla za stálého míchání přidána k roztoku GSH. Reakční směs se ponechala 40 min na ledové lázni. Vzniklá červená sraženina byla odsáta na filtračním papíře na Büchnerově nálevce. Sraženina byla dále promyta 2x 10 ml ledově vychlazené deionizované H₂O, 2x 10 ml ledově vychlazeného acetonu, 2x 10 ml ledově vychlazeného diethyletheru.

Odsátá sraženina byla seškrábána z filtračního papíru na alobal a nechala se 30 min sušit ve tmě v exikátoru. Vysušený produkt se ihned zamrazil a uschoval při -20 °C.

Příprava S-nitrosocysteinu

Pro přípravu S-nitrosocysteinu bylo rozpuštěno 62 mg L-cysteinu v 5 ml vychlazené 100 mM HCl. Ke směsi bylo dále přidáno 30mg NaNO₂. Vše bylo mícháno na ledu a ve tmě. Výsledným produktem byl 100 mM S-nitrosocystein, který byl ve tmě a na ledu stabilní po dobu dvou hodin.

3.3.4 Stanovení proteinů

Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové

Do jednotlivých jamek 96-jamkové destičky bylo nanášeno 45 µl deionizované vody, 5 µl standardu BSA nebo extraktu, 200 µl pracovního roztoku činidla Bradfordové. Destička byla inkubována 5 min. Následně byla změřena absorbance při 595 nm. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin v rozmezí 0 - 1,5 mg.ml⁻¹.

Činidla pro stanovení a barvení proteinů:

Činidlo Bradfordové: zásobní roztok Coomassie Blue byl naředěn deionizovanou vodou v poměru 1:4.

Zásobní roztok Coomassie Blue: 50 mg Coomassie Blue G250 bylo rozpuštěno v 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné. Vzniklý roztok byl doplněn do 100 ml deionizovanou vodou.

Přímé spektrofotometrické stanovení

U stanovení obsahu rekombinantního proteinu v eluátu bylo použito přímé spektrofotometrické stanovení proteinů v UV oblasti. Vzorek byl měřen při 280 nm a 260 nm (absorbují nukleové kyseliny) a hodnoty byly od sebe odečteny.

3.3.5 Stanovení glutathionu (GSH a GSSG)

Extrakty pro tuto metody byly připraveny homogenizací rostlinného materiálu v dusíku, k rozetřenému vzorku byla přidána 0,1M kyselina chlorovodíková v poměru 1:4. Následovala centrifugace při 13 000 g, při 4°C po dobu 15min.

Pro stanovení glutathionu bylo do každé jamky 96-jamkové destičky napipetováno 100 µl 0,1M Tris pufru, pH 8, následně bylo přidáno 20 µl vzorku extraktu, a 20 µl 5 mM tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP) pro stanovení celkového glutathionu nebo 20 µl pufru pro stanovení pouze redukovaného glutathionu. Destička byla inkubována 20 min. Nakonec bylo přidáno 10 µl 15 mM monochlorobimanu (MCIB). Po 20 min inkubace ve tmě byl změřen nárůst fluorescence (exc. 360 nm/ emise 460 nm).

3.3.6 SDS PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným byla použita pro separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti.

SDS-PAGE byla provedena v 10% dělicím, pH 8,8 a v 4% zaostřovacím gelu, pH 6,8 (Laemmli, 1970). Na počátku elektroforézy bylo nastaveno napětí 120 V pro zaostření zóny proteinů, jakmile bromfenolová modř doputovala na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu, bylo napětí zvýšeno na 180 V. Elektroforéza byla ukončena po vymytí bromfenolové modři z gelu.

Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Vzorek byl smíchán s Laemmliho vzorkovacím pufrém (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 0,2% bromfenolová modř; 5% merkaptoethanol) v poměru 3:1. Následně byla zkumavka se vzorkem inkubována 10 min při 95 °C. Vzorek byl po ochlazení centrifugován 5 min při 6 000 g. Do jednotlivých jamek na připraveném gelu bylo nanášeno 20-35 µl připraveného vzorku v závislosti na velikosti gelu. Byl také nanášen standard molekulové hmotnosti v objemu 5 µl. U standardu nebyla provedena inkubace při 95 °C. Jako standardy byly použity Precision Plus ProteinMT Dual Xtra Standards (Bio-Rad) nebo Western Blot Protein Standard (Serva).

Roztoky pro SDS-PAGE

Elektrodový pufr: 0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 0,1% SDS, pH 8,3

V tab. 4 je uvedeno složení zaostřovacího a dělicího gelu. Z uvedených objemů byly připraveny 2 gely o velikosti 10x10 cm a tloušťce 0,75 mm.

Tab. 4: Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy jsou uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris HCl 1,5 M pH 8,8	Tris HCl 0,5 M pH 6,8	H ₂ O	SDS	TEMED	10% APS
10% dělicí	3,3	2,5		4,1	0,1	0,01	0,1
4% zaostřovací	0,65		1,25	3,05	0,05	0,01	0,1

3.3.7 Western blot

Metoda Western blot je většinou aplikována na gely obsahující elektroforeticky separované proteiny. Ty jsou následně přeneseny na membránu a detekovány specifickými protilátkami pro daný protein.

Proteiny rozdělené metodou SDS-PAGE byly přeneseny z gelu na nitrocelulosoovou membránu pomocí zařízení Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) s nastavením: 2,5 A, 25 V,

doba přenosu byla pouze 10 minut. Na blotovací kazetu bylo postupně naskládány filtrační papíry, membrána, gel a opět filtrační papíry. Transfer proteinů z gelu na membránu byl potvrzen použitím barviva Ponceau S (0,2% Ponceau S; 10% kyselina octová), které bylo následně vymyto destilovanou vodou. Membrána bez barviva byla promyta 3x 10 min 5% roztokem sušeného mléka, v němž se následně nechala blokovat dvě hodiny. Po blokaci byla do mléka přidána primární polyklonální králičí protilátka, se kterou byla membrána inkubována 2 hodiny. Protilátka byla připravena proti rekombinantnímu proteinu GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur, (ředění protilátky bylo 1:1000 v 5% mléku). Následně byla membrána opět promývána v 3x 10 min roztoku Tween 20 v TBS. Po promytí byla k membráně přidána sekundární kozí protilátka s navázanou alkalickou fosfátasou (ředění 1:5000 v 5% mléku). Inkubace se sekundární protilátkou probíhala po dobu 1 hodiny. Následně byla membrána opět promyta v roztoku Tween 20 v TBS (3x 10 min). Pro detekci studovaného proteinu byla využita detekce barevného produktu. Pro vizualizaci byl použit komerční roztok NBT-BCIP, který je substrátem pro alkalickou fosfátasu. Po zobrazení bandů byla membrána vyfotografována dokumentačním systémem Gel DocMT.

Roztoky pro Western blot

Barvicí roztok s Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 10% (v/v) kyselině octové

Blotovací pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,3

TBS pracovní pufr: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5

TBS Tween: 0,15 ml Tween-20 do 300 ml TBS

10% nízkotučné sušené mléko v TBS Tween

Barvicí roztok s NBT-BCIP: připravený komerční roztok NBT-BCIP (Sigma)

3.3.8 Stanovení nitrosylovaných proteinů metodou Biotin-Switch

Metoda Biotin switch (BST) se používá k detekci a identifikaci S-nitrosylovaných proteinů. Jedná se o tříkrokovou metodu, která byla navržena Jaffrey a jeho kolegy v roce 2001.

Ke 0,5 g homogenizovaného rostlinného materiálu byl přidán 1 ml čerstvě připraveného HENT nebo TEGN pufru, reakční směs byla 1 min důkladně vortexována a homogenát byl po dobu 15 min ponechán na ledu. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány při 12 000 g, 4 °C, 10 min, supernatant byl přenesen do nové mikrozkuhavky a opět centrifugován při 12 000 g, 4 °C, 10 min. Supernatant byl opět přenesen do nové mikrozkuhavky. V supernatantu byla stanovena koncentrace proteinů

metodou Bradfordové a byla upravena na koncentraci proteinů 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Objem obsahující 100 μg proteinu byl napipetován do 1,5 ml mikrozkuřavky a byl přidán čerstvě připraveného HENS pufru (v čtyřnásobném množství = 400 μl). Před samotným značením byly vzorky sloužící jako pozitivní kontrola inkubovány s donory NO. Byly použity 0,25 mM GSNO a 0,25 mM nitroprusid sodný (SNP). K blokaci volných SH-skupin byl vzorku přidán S-methylmethanthiosulfonát (MMTS, 0,2 mM) s SDS (2%). Následovala inkubace při 50 °C po 30 minut. Poté byl ke směsi 2x přidán 1 ml vychlazeného acetonu (-20 °C) s následovaným vortexováním. Po 30 min inkubaci při -20 °C byly vzorky centrifugovány při 12 000 g, 4 °C, 10 min. Supernatant byl odstraněn dekantací a ke zbytku byl přidán 1 ml vychlazeného acetonu, opět následovala centrifugace při 12 000 g, 4 °C, 10 min. Supernatant byl přepipetován do nové mikrozkuřavky a pelet byl vysušen ve tmě v chladící komoře po dobu 10 min.

K sedimentu vzorku proteinu byla přidána 1mM kyselina askorbová a ihned 4 mM Biotin HPDP v DMF (Biotin – EZ-LinkTMBiotin-HPDP; Thermo scientific; 21341). Následovala inkubace po dobu 1 hod. K vzorkům sloužícím, jako negativní kontrola bylo přidáno redukční činidlo 0,1 M DTT, které narušuje vazbu protein-biotin-HPDP. Nakonec bylo ke vzorku přidáno 200 μl vychlazeného acetonu (-20 °C) s inkubací přes noc -20°C. Následující den Po inkubaci byly vzorky centrifugovány při 12 000 g, 4 °C, 10 min, supernatant byl odstraněn dekantací, a k peletu byl připipetován 1 ml vychlazeného acetonu. Stěny mikrozkuřavky a povrch peletu byly jemně vypláchnuty vychlazeným acetonem, aby došlo k odstranění zbytků biotin-HPDP. Následovala centrifugace při 12 000 g, 4 °C, 5 min. Pelet byl použit pro následnou analýzu Western blotem a pro afinitní purifikaci.

Použité roztoky:

HENT pufr (zásobní): 100mM HEPES, pH = 7,4 (úprava pomocí 10M NaOH); 10mM EDTA; 0,1mM Neocuprin; 1% Triton-X

HENS pufr (zásobní): 225mM HEPES, pH na 7,2 (úprava pomocí 10M NaOH); 0,9mM EDTA; 0,1mM Neocuprin; 2,5% SDS

TEGN pufr: 500 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8; 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA; 15% glycerol; 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ neocuproin.

Před použitím: 1 tableta Complete mini-EDTA koktejl volného inhibitoru na 10ml HENT pufru

Analýza S-nitrosylovaných proteinů Western blotem

Analýza S-nitrosylovaných proteinů Western blotem se mírně lišila od postupu při detekci GSNOR popsané v kapitole 3.3.7. Separace proteinů pomocí elektroforézy proběhla za neredukujících podmínek. Vzorek proteinu pro elektroforézu byl tedy smíchán s Laemmliho vzorkovacím pufrům bez β -merkaptoethanolu a kvůli labilitě vazby proteinu s biotinem-HPDP nebyl zahříván v termobloku. Separace proteinů proběhla v 12% dělicím gelu o pH 8,8 (tab. 5) a 4% zaostřovacím gelu (tab. 4) o pH 6,8.

Tab. 5 Složení 12% dělicího gelu používaného pro SDS-PAGE (množství je uvedeno v ml).

typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	1,5M Tris-HCl pH 8,8	H ₂ O	10% SDS	TEMED	10% APS
dělicí 12%	4	2,5	3,4	0,1	0,01	0,1

Po separaci byly proteiny z gelu přeneseny na povrch nitrocelulosové membrány pomocí Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) s následujícím nastavením: 25 V, 2,5 A a dobou přenosu 10 minut. Po kontrole přenosu proteinů na membránu reversibilním barvením s Ponceau S následovala blokáce membrány 1% mlékem v TBST obsahující 1% BSA po dobu 2 hod. Následovně proběhla inkubace s primární monoklonální anti-biotin protilátkou již konjugovanou s alkalickou fosfátasou (ředění 1:10 000) v 1% mléce v TBST přes noc při 4 °C. Nakonec byla membrána promyta 3x 50 ml TBST a proběhlo barvení pomocí NBT-BCIP, viz kapitola 3.3.7.

Afinitní purifikace

Afinitní purifikaci byla uskutečněna na neutravidinové matici, která byla nejprve 2x promyta 100 μ l neutralizačního pufru, přičemž objem neutravidinové matrice závisel na výchozím množství proteinů, (doporučeno: 35 μ l matrice na 250 μ g značených proteinů) Následovala centrifugace 2min při 200 g, 4°C a odstranění supernatantu. Poté byla matrice ekvilibrována 100 μ l neutralizačního pufru s následnou 30 min inkubací na orbitální míchačce. Poté byla opět provedena centrifugace při 200 g a k matici bylo přidáno 100 μ l neutralizačního pufru, tentokrát společně se vzorky. Inkubace vzorků s maticí proběhla za tmy a laboratorní teploty po dobu 1 hod. na orbitální míchačce. Následovala centrifugace při 200 g 1min, při které byl odstraněn supernatant a matrice byla 4x promyta 350 μ l promývacího pufru. K matici bylo přidáno 150 μ l promývacího pufru a následně byla přenesena do prázdných, uzavřených kolonek. Eluce navázaných

proteinů byla provedena přidavkem 100 μ l elučního pufru se 100 mM β -merkaptoethanolem (před použitím byl pufr zahřát na 95°C po dobu 5 minut).

Vypurifikované proteiny byly precipitovány přes noc v acetonu při -20°C. Druhý den následovala centrifugace při 14 000 g, 4°C, 30 min, sediment byl promyt 1 ml vychlazeného acetonu a znova centrifugován při 14 000 g, 4°C, 30 min. Poté byl sediment rozpuštěn v 20 μ l HENS pufru. Proteiny po uvedené afinitní purifikaci byly elektroforeticky separovány za denaturujících podmínek s obsahem SDS. Po separaci proteinů byl gel barven Comassie Blue.

Použité roztoky:

Neutralizační pufr: 20 mM HEPES-NaOH, pH 7,7; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5% (v/v) Triton-X 100

Promývací pufr: 20 mM HEPES-NaOH, pH 7,7; 600 mM NaCl; 1 mM EDTA, 5% (v/v) Triton-X 100

Eluční pufr: 200 mM HEPES-NaOH, pH 7,7; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 100 mM β -merkaptoehanol

3.3.9 Stanovení exprese GSNOR

Izolace a purifikace RNA z rostlinného materiálu

Izolace a purifikace RNA byla prováděna pomocí NucleoSpin RNA plant kitu (Macherey-Nagel). Zamražené rostlinné vzorky byly rozdrceny v tekutém dusíku v předem vysterilizovaných třecích miskách s tloučkem. Do sterilních zkumavek bylo následně přeneseno 100 mg tkáně. Následně bylo k homogenizovaným vzorkům přidáno 350 μ l RA1 a 3,5 μ l β -merkaptoethanolu a bylo vortexováno alespoň 1 min, čímž došlo k lýzy buněk. Vzniklý lyzát byl nanesen na Place NucleoSpin Filt ve sběrné zkumavce a centrifugován 1min při 14 000 g. Filtrát byl přenesen do nové 2 ml zkumavky bez vzniklého peletu na dně sběrné zkumavky a bylo k němu přidáno 350 μ l 70% ethanolu k úpravě podmínek vázání RNA. Lyzát byl přenesen na NucleSpin RNA Plant Column. a centrifugován 30 s při 10 000 g. Kolonka byla umístěna do nové 2 ml sběrné zkumavky. Pro vysušení silikátové membránky bylo na kolonku nanesen 350 μ l MDB (Membrane Desalting Buffer) následované centrifugací 1 min při 14 000 g. Pro štěpení DNA bylo na membránku aplikováno 95 μ l DNase reakční směsi (10 μ l připravené DNase I a 90 μ l DNase reakčního pufru), která byla ponechána na kolonce 15 min při pokojové teplotě. Po inkubaci byla membránka promyta a vysušena. Nejprve bylo nanesen 200 μ l RA2 a centrifugováno 30 s při 10 000 g. Kolonka byla

pak přenesena do nové zkumavky. Poté bylo přidáno 600 μl RA3 a opět následovala centrifugace 30 s při 10 000 g. Filtrát byl odstraněn a bylo provedeno poslední promytí 250 μl RA3 následované centrifugací 2 min při 14 000 g. Nakonec byla kolonka umístěna do nové nuklease-free 1,5ml mikrozkušavky, do které byla RNA vymyta 50 μl RNase-free vody po 1 min inkubaci a následné centrifugaci 1 min při 14 000 g.

Měření koncentrace RNA po izolaci

Koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometricky s využitím měření při vlnových délkách 260, 280 a 320 nm. K měření byla použita destička Take 3 za použití programu Gen5. Jako blank byla použita RNase-free sterilní voda, stejná jako byla použita při rozpuštění RNA v posledním kroku izolace. Objem potřebný pro analýzu každé RNA byl 2 μl .

Reverzní transkripce

Pro přepis mRNA do cDNA byl použit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche). Do mikrozkušavek byl pipetován 1 μl Anchored-oligo (dT)18 primeru, daný objem (koncentrace) vyizolované RNA, který odpovídá 1 μg RNA v reakci a směs byla doplněna sterilní vodou na výsledný objem 11,4 μl v jamce. Mikrozkušavky se směsí byly následně ponechány inkubovat 10 minut při 65 °C v termostatu Bio-Rad. Poté byly vzorky umístěny ihned na led. Ke směsi bylo přidáno 8,6 μl premixu, který byl složen ze 4 μl 5x reakčního pufru, 0,5 μl protector RNase inhibitoru 40 U/ μl , 2 μl směsi deoxynukleotidů každý o koncentraci 10 mM, 1 μl DTT 0,1 M a 1,1 μl reverzní transkriptasy o koncentraci 20 U/ μl . Výsledná směs byla inkubována 30 minut při 45 °C a poté 10 minut při 85 °C. Přepsaná cDNA byla poté uchována při -20 °C.

Real-time PCR

Pro reakci byl připraven premix, který obsahoval 10 μl ABsolute qPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific, USA), 1,75 μl forward primeru (3 μM), 1,75 μl reverse primeru (3 μM), 5,5 μl sterilní vody a 1 μl cDNA, pro jednu reakci. Reakce byla provedena v přístroji CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systém (Bio-Rad) využitím softwaru BioRad CPX Manager. PCR reakce probíhala dle protokolu uvedeného v Tab. 6.

K ověření správného průběhu reakce, vzorků a detekci nespecifických produktů byla využita kontrola křivek tání PCR produktů. Po proběhnutí real-time PCR software automaticky provedl analýzu vzorků a určil hodnoty Ct pro jednotlivé vzorky. Výpočet exprese genů byl následně proveden metodou $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

Tab. 6: Nastavení real-time PCR reakce v programu Biorad CPX Manager

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

V PCR reakci byl stanovován studovaný gen pro GSNOR a jako house-keeping gen byl použit elongační faktor 1 α . Sekvence jejich primerů jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab.7: Sekvence forward a reverse primerů použitých při PCR reakci

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

4 Závěr

V experimentální části byla provedena výchozí studie charakterizující posttranslační regulace aktivit rostlinných S-nitrosoglutathionreduktas *in vitro*.

- Působením H₂O₂ na studované rostlinné GSNOR došlo ke snížení jejich reduktasové i dehydrogenasové aktivity v závislosti na použité koncentraci činidla i na době inkubace s peroxidem vodíku.
- Inhibiční vliv preinkubace enzymu s H₂O₂ byl u SIGSNOR reverzibilní. Po přidání redukčních činidel DTT a TCEP došlo k opětovnému zvýšení aktivity, v případě TCEP i nad hodnoty kontrolní vzorku enzymu nevystaveného působení H₂O₂.
- Preinkubace SIGSNOR i AtGSNOR s různými látkami uvolňujícími NO vedla ke snížení aktivity zkoumaných enzymů.

Z uvedených výsledků vyplývá, že peroxidem vodíku a donory NO dochází k reverzibilním posttranslačním modifikacím, které způsobují inhibici studovaného enzymu GSNOR. Mutace cysteinů v AtGSNOR vedly ke snížení aktivity ve srovnání s wild type proteinem. Mutace měly vliv i na inhibici peroxidem vodíku. Mutace C10S i C271S snižovaly vliv H₂O₂ na aktivitu v závislosti na čase. Mutace C284S zvyšovala vliv H₂O₂ na aktivitu v závislosti na čase.

V rámci experimentů prováděných *in vivo* byla studována hladina, exprese a aktivita během vývoje rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, a také změny těchto parametrů GSNOR v reakci rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom a jeho mutanta nahG na teplotní stres.

- Aktivita i exprese GSNOR se s délkou života rostliny zvyšovala.
- Z vegetativních orgánů byla nejvyšší exprese i aktivita ve stonku, v reprodukčních orgánech rostlin byla nejvyšší hladina exprese v květech, zatímco nejvyšší aktivita byla v zelených nezralých plodech.
- Během teplotního stresu došlo u rostlin Micro-Tom nejprve k nárůstu aktivity, která s délkou působení stresu klesala, zatímco u mutanta nahG docházelo k poklesu aktivity již od začátku působení stresu.
- Relativní exprese u *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom nejprve narůstala během působení teplotního stresu, ale po 24 hod. došlo k výraznému poklesu.

Expresa GSNOR u nahG mutanta pozvolna klesala bez větších rozdílů ve sledovaných hodinách, výraznější snížení nastalo po 24 hod.

- V rostlinách Micro-Tom a mutantních rostlinách nahG došlo působením teplotního stresu ke snížení koncentrace redukovaného GSH. Celková koncentrace GSH u mutanta nahG zůstala téměř konstantní, u rostliny Micro-Tom docházelo k poklesu koncentrace celkového GSH.

Z výsledků práce vyplývá, že regulace exprese a aktivity GSNOR je důležitá pro normální růst a vývoj rostliny *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Výsledky získané v rámci testování vlivu teplotního stresu na rostlinách rajčete rozšiřují dřívější poznatky o zapojení GSNOR do termotolerance rostlin získaných s využitím mutantů *Arabidopsis*.

5 Literatura

- Adimora N. J.; Jones D. P.; Kemp M. L. (2010): A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses. *Antioxidants and Redox Signaling*, **13**, 731–743.
- Adnan H., Antenos M., Kirby G. M. (2012): The effect of menadione on glutathione S-transferase A1 (GSTA1): c-Jun N-terminal kinase (JNK) complex dissociation in human colonic adenocarcinoma Caco-2 cells. *Toxicology Letters*, **214**, 53–62.
- Achkor H., Díaz M., Fernández M. R., Biosca J. A., Parés X., Martínez M. C. (2003): Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **132**, 2248–2255.
- Airaki M., Leterrier M., Mateos R. M., Valderrama R., Chaki M., Barroso J. B., del Río L. A., Palma J. M., Corpas F. J. (2011): Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell Environment*, **35**, 281–295.
- Al-Khouri, A. M., Ma, Y., Togo, S. H., Williams, S., and Mustelin, T. (2005): Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 35195–35202.
- Angeli V., Tacito A., Paolicchi A., Barsacchi R., Franzini M., Baldassini R., Vecoli C., Pompella A., Bramanti E. (2009): A kinetic study of gamma-glutamyltransferase (GGT)-mediated S-nitrosoglutathione catabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **481**, 191–196.
- Arnelle D. R., Stamler J. S. (1995): NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **318**, 279–285.
- Arnér E. S. J., Holmgren A. (2000): Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *FEBS Journal*, **267**, 6102–6109.
- Ascenzi P., Colasanti M., Persichini T., Muolo M., Polticelli F., Venturini G., Bordo D., Bolognesi M. (2000): Re-evaluation of amino acid sequence and structural consensus rules for cysteine-nitric oxide reactivity. *Biological Chemistry*, **381**, 623–627.
- 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.
- Bailey-Serres J., Mittler R. (2006): The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology*, **141**, 311–311.
- Barceló A. R., Laura V. G. R. (2009): Reactive oxygen species in plant cell walls. In: *Reactive oxygen species in plant signaling*. (del Río L.A., Puppo A.eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, 73–93 stran.
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Rodriguez-Serrano M., Esteban F. J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M. C., Valderrama R., Sandalio L. M., Del Río L. A. (2006): Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany*, **8**, 1785–1793.
- Barroso J. B., Valderrama R., Corpas F. J. (2013): Immunolocalization of S-nitrosoglutathione, S-nitrosoglutathione reductase and tyrosine nitration in pea leaf organelles. *Acta Physiologia Plantarum*, **35**, 2635–2640.
- Bateman R. L., Rauh D., Tavshanjian B., Shokat K. M. (2008): Human carbonyl reductase 1 is an S-nitrosoglutathione reductase. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 35756–35762.
- Baxter A., Mittler R., Suzuki N. (2014): ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 1229–1240.
- Benhar M., Forrester M. T., Hess D. T., Stamler J. S. (2008): Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science*, **320**, 1050–1054.
- Benhar M., Forrester M. T., Stamler J. S. (2009): Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10**, 721–732.

- Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D. (2008): New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 21–39.
- Bishop G. J., Harrison K., Jones J. D. G. (1996): The tomato Dwarf gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *The Plant Cell*, **8**, 959–969.
- Bishop G. J., Nomura T., Yokota T., Harrison K., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Jones J. D. G., Kamiya Y. (1999): The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **96**, 1761–1766.
- Bishop G. J. (2003): Brassinosteroid mutants of crops. *Journal of Plant Growth Regulation*, **22**, 325–335.
- Brandes H. K., Larimer F. W., Hartman F. C. (1996): The molecular pathway for the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxin f. *Journal of Biochemical Chemistry*, **271**, 3333–3335.
- Brading P.A., Hammond-Kosack K.E., Parr A., Jones J.D.G. (2000): Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant Journal*, **23**, 305–318.
- Bright, J., Hiscock, S. J., James, P. E., and Hancock, J. T. (2009). Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**, 9–55.
- Buchanan B. B. (1980): Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annual Review of Plant Biology*, **31**, 341–374.
- Cabanero F. J., Martinez-Ballesta M. C., Teruel J. A., Carvajal M. (2006): New evidence about the relationship between water channel activity and calcium in salinity-stressed pepper plants. *Plant Cell Physiology*, **47**, 224–233.
- Cao H., Bowling S. A., Gordon A. S., Dong X. (1994): Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **6**, 1583–1592.
- Clarke S., Mur L. A. J., Wood J. E., Scott I. M. (2004): Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **38**, 432–447.
- Clejan L. A., Cederbaum A. I. (1993): Stimulation by paraquat of microsomal and cytochrome P-450-dependent oxidation of glycerol to formaldehyde. *Biochemical Journal* **295**, 781–786.
- Corpas F. J., del Río L. A., Barroso J. B. (2007): Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends in Plant Science*, **12**, 436–438.
- Corpas F. J., Chaki M., Fernandez-Ocana A., Valderrama R., Palma J. M., Carreras A., Begara-Morales J. C., Airaki M., del Rio L. A., Barroso J. B. (2008): Metabolism of Reactive Nitrogen Species in Pea Plants Under Abiotic Stress Conditions. *Plant and Cell Physiology*, **49**, 1711–1722.
- Corpas F. J., del Río L. A., Barroso J. B. (2013a): Protein tyrosine nitration in higher plants under natural and stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 1–4.
- Corpas F. J., Alché J. D., Barroso J.B. (2013b): Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 126.
- Creighton T. E., Bagley C. J., Cooper L., Darby N. J., Freedman R. B., Kemmink J., Sheikh A. (1993): On the biosynthesis of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Journal of Molecular Biology* **232**, 1176–1196.
- Creighton T. E., Zapun A., Darby N. J. (1995): Mechanisms and catalysis of disulphide bond formation in proteins. *Trends in Biotechnology*, **13**, 18–22.
- Darby N. J., Freedman R. B., Creighton T. E. (1994). Dissecting the mechanism of disulphide bond formation by protein disulphide isomerase. *Biochemistry*, **33**, 7937–7947.
- Dat J. F., Lopez-Delgado H., Foyer Ch. H., Scott I., M. (1998): Parallel Changes in H₂O₂ and Catalase during Thermotolerance Induced by Salicylic Acid or Heat Acclimation in Mustard Seedlings. *Plant Physiology*, **116**, 1351–1357.

- Delaney T. P., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weymann K., Negrotto D., Gaffney T., Gut-Rella M., Kessmann H., Ward E., Ryals J. (1994): A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**, 1247–50.
- Delaney T. P., Friedrich L., Ryals J. A. (1995): Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 6602–6606.
- Dewdney J., Reuber T. L., Wildermuth M. C., Devoto A., Cui J., Stutius L. M., Drummond E. P., Ausubel F. M. (2000): Three unique mutants of Arabidopsis identify eds loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. *Plant Journal*, **24**, 205-218.
- Diaz M., Achkor H., Titarenko E., Martinez M. C. (2003): The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Letters*, **543**, 136-139.
- Durner J., Klessig D. F. (1999): Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**, 369–374.
- Durrant W. E., Dong X. (2004): Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **42**, 185–209.
- Engeland K., Höög J. O., Holmquist B., Estonius M., Jörnvall H., Vallee B. L. (1993): Mutation of Arg-115 of human class-III alcohol-dehydrogenase - A binding-site required for formaldehyde dehydrogenase-activity and fatty-acid activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 2491-2494.
- Espunya M. C., Díaz M., Moreno-Romero J., Martínez M. C. (2006): Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell Environment*, **29**, 1002–1011.
- Eyal E., Levy A. A. (2002): Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 112–117.
- Fall R., Benson A. A. (1996): Leaf methanol - – the simplest natural product from plants. *Trends in Plant Science*, **1**, 296–301.
- Fares A., Rossignol M., Peltier J. B. (2011): Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **416**, 331-336.
- Feechan A., Kwon E., Yun B. W., Wang Y., Pallas J. A., Loake G. J. (2005): A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, **102**, 8054-8059.
- Feelisch M. (1991): The Biochemical Pathways of Nitric Oxide Formation from Nitrovasodilators: Appropriate Choice of Exogenous NO Donors and Aspects of Preparation and Handling of Aqueous NO Solutions. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **17**, 25-33.
- Fernandez M. R., Biosca J. A., Pares X. (2003) S-nitrosogluthathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localization. *Cell and Molecular Life Science*, **60**, 1013-1018.
- Foster M. W., Hess D. T., Stamler J. S. (2009): Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends in Molecular Medicine*, **9**, 391-404.
- Francoleon N. E., Carrington S. J., Fukuto J. M. (2011): The reaction of H₂S with oxidized thiols : generation of persulfides and implications to H₂S biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **516**, 146-153.
- Freedman R. B., Hirst T. R., Tuite M. F. (1994): Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trend in Biochemical Sciences*, **19**, 331-36.
- Freedman J. E., Frei B., Welch G. N., Loscalzo, J. (1995): Glutathione peroxidase potentiates the inhibition of platelet function by S-nitrosothiols. *Journal of Clinical Investigation*, **96**, 394–400.
- Frunghillo, L., Skelly, M. J., Loake, G. J., Spoel, S. H., and Salgado, I. (2014): Snitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communications*, **5**, 5401.
- Fritz K. S., Petersen D. R. (2013): An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, **59**, 85–91.

- Gadalla M. M., Snyder S. H. (2010): Hydrogensulfide as a gasotransmitter. *Journal of Neurochemistry*, **113**, 14-26.
- Gaffney T., Friedrich L., Verooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J. (1993): Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, **261**, 754–756.
- Gaston B. (1999): Nitric oxide and thiol groups. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1411**, 323–333.
- Gaupels F., Kuruthukulangarakoola G. T., Durner J. (2011): Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**, 707–714.
- Giba Z., Grubišić D., Konjević R. (2007): Seeking the role of NO in breaking seed dormancy. In: *Nitric oxide in plant growth, development and stress physiology*. (Lamattina L., Polacco J. C. eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, 91-111.
- Givol D., De Lorenzo F., Goldberger R. F., Anfinsen C. B. (1965): Disulphide interchange and the three dimensional structure of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **53**, 676-684.
- Glazebrook J. (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **43**, 205–227.
- Go Y. M., Duong D.M., Peng J., Jones D. P. (2011): Protein cysteines map to functional networks according to steady-state level of oxidation. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*, **4**, 196–209.
- Go Y., Chandler J. D., Jones D., P. (2015): The cysteine proteome. *Free Radical Biology and Medicine*, **84**, 227-245.
- Gonzalez C., Ré M. D., Sossi L., Valle E. M., Boggio S. B. (2015): Tomato cv. ‘Micro-Tom’ as a model system to study postharvest chilling tolerance. *Scientia Horticulturae*, **184**, 63-69.
- Gordon D. A., Wetterau J. R., Gregg R. E. (1995): Microsomal triglyceride transfer protein; a protein complex required for the assembly of lipoprotein particles. *Trends in Cell Biology*, **5**, 317-321.
- Gorren A. C. F., Schrammel A., Schmidt K., Mayer B. (1996): Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **330**, 219 – 228.
- Guerra D., Ballard K., Truebridge I., Vierling E. (2016): S-nitrosation of conserved cysteines modulates activity and stability of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR). *Biochemistry*, Just Accepted Manuscript, DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01373.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2007): *Free radicals in Biology and Medicine*. 4th ed, Oxford University Press, Oxford, UK, 900 stran.
- He, J. M., Bai, X. L., Wang, R. B., Cao, B., and She, X. P. (2007). The involvement of nitric oxide in ultraviolet-B-inhibited pollen germination and tube growth of *Paulownia tomentosa* *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, **131**, 273–282.
- Hess D. T., Stamler J. S. (2011): Regulation by S-Nitrosylation of Protein Post-translational Modification. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 4411-4418.
- Hess D. T., Stamler J. S. (2012): Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 4411–4418.
- Higdon A., Diers A. R., Oh J. Y., Landar A., Darley-Usmar V. M. (2012): Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochemical Journal*, **442**, 453–464.
- Hogg N., Singh R. J., Konorev E., Joseph J., Kalyanaraman B. (1997): S-nitrosoglutathione as a substrate for gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemical Journal*, **323**, 477–481.
- Hogg N. (1999): The kinetics of S-transnitrosation – A reversible second-order reaction. *Analytical Biochemistry*, **272**, 257-262.
- Hogg N. (2003a): The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annual Reviews: Pharmacology and Toxicology*, **42**, 585– 600.
- Hogg P. J. (2003b): Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends in Biochemical Sciences*, **28**, 210 – 214.

- Holmes A. J., Williams D. L. H. (2000): Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transaction*, **2**, 1639 – 1644.
- Hong J. K., Yun B., Kang J., Raja M. U., Kwon E., Sorhagen K., Chu Ch., Wang Y., Loake G. J. (2008): Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 147-154.
- Hou, Y., Guo, Z., Li, J., Wang, P. G. (1996): Seleno compounds and glutathione peroxidase catalyzed decomposition of S-nitrosothiols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **228**, 88–93.
- Chaki M. (2007): *Function of reactive nitrogen species in sunflower (Helianthus annuus) in response to abiotic and biotic stresses*. Ph.D. Thesis. University of Jaén, Spain.
- 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. (2010): Mechanical wounding induces a nitrosative stress by downregulation of GSNO reductase and a rise of S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 1803-1813.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A., Carreras A., Gomez-Rodriguez M. V., Pedrajas J. R., Begara-Morales J. C., Sanchez-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.
- Chiadmi M., Navaza A., Miginiac-Maslow M., Jacquot J-P., Cherfils J. (1999): Redox signalling in the chloroplast: structure of oxidized pea fructose-1,6-bisphosphate phosphatase. *EMBO Journal*, **18**, 6809–6815.
- Ignaro L. J. (1999): Nitric oxide: A unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Bioscience Reports*, **19**, 51-71.
- Ignarro L. J., Lippton H., Edwards J. C., Baricos W. H., Hyman Al. L., Kadowitz P. J., Gruetter C. A. (1981): Mechanism of Vascular Smooth Muscle Relaxation by Organic Nitrates, Nitrites, Nitroprusside and Nitric Oxide: Evidence for the Involvement of S-Nitrosothiols as Active Intermediates. *Department of Pharmacology, Biochemistry and Surgery*, **238**, 273.
- Inzé A., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., van Breusegem F. (2012): A subcellular localization compendium of hydrogen peroxide-induced proteins. *Plant, Cell and Environment*, **35**, 308–320.
- Ischiropoulos H. (2003): Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**, 776-783.
- Jaffrey S. R., Snyder S. H. (2001): The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated. *Proteins Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, **86**, pI1.
- Jensen D. E., Belka G. K., Du Bois G. C. (1998): S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemical Journal*, **331**, 659-668.
- Jones J. B., Jones J. P., Stall R. E., Zitter T. A. (1991): *Compendium of tomato diseases*. APS Press, St. Paul, MN, USA, 73 stran.
- Kahlos K., Zhang J. L., Block E. R., Patel J. M. (2003): Thioredoxin restores nitric oxide-induced inhibition of protein kinase C activity in lung endothelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **254**, 47-54.
- Kanski J., Schoneich C. (2005): Protein nitration in biological aging: Proteomic and tandem mass spectrometric characterization of nitrated sites. *Methods in Enzymology*, **396**, 160-171.
- Keillor J.W., Castonguay R., Lherbet C. (2005): Gamma-glutamyl transpeptidase substrate specificity and catalytic mechanism. *Glutathion Transferases and Gamma-GLutamyl Transpeptidase; Methods in Enzymology*, **401**, 449–467.
- H. R. Kenneth (2001): *Westcott's plant disease handbook*. 6th ed, Kluwer, Boston, MA, USA, 1007 stran.
- Klebanoff S.J. (2005): Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, **77**, 598–625.

- Knight, S. L., Rogers R. B., Smith M. A. L., Spomer L. A. (1992): Effect of NaCl salinity on miniature dwarf tomato 'Micro-Tom.' I. Growth analysis and nutrient composition. *Journal of Plant Nutrition*, **15**, 2351–2327.
- Koivusalo M., Baumann M., Uotila L. (1989): Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class-III alcohol-dehydrogenase. *FEBS Letters*, **257**, 105–109.
- Kolluru G. K., Shen X., Kevil C. G. (2013) A tale of two gases : NO and H₂S, foes or friends for life? *Redox Biology*, **1**, 313–318.
- Komiyama T, Fujimori K. (1997): Kinetic studies of the reaction of S-nitroso-L-cysteine with L-cysteine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **7**, 175–180.
- Kotak S., Larkindale J., Lee U., von Koskull-Doring P., Vierling E., Scharf K. D. (2007): Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 310–316.
- Kowaluk E. A., Fung H. L. (1990): Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for in vitro vascular relaxation by S-nitrosothiols. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **255**, 1256–1264.
- Krimm I., Goyer A., Issakidis-Bourguet E., Miginiac-Maslow M., Lancelin J. M. (1999): Direct NMR observation of the thioredoxin-mediated reduction of the chloroplast NADP-malate dehydrogenase provides a structural basis for the relief of autoinhibition. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 34539–34542.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2013a): S-nitrosogluthionreduktasa: klíčový enzym regulace S-nitrosylace. *Chemické listy*, **107**, 202–208.
- Kubienova L., Kopečný D., Tylichova M., Briozzo P., Skopalova J., Šebela M., Navratil M., Tache R., Luhova L., Barroso J. B., Petrivalsky M. (2013b): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosogluthione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochemie*, **95**, 889–902.
- 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.
- Kubienová L., (2013c): *Studium produkce reaktivních forem dusíku a enzymů jejich metabolismu u rostlin*. Disertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Lamattina L., García-Mata C., Graciano M., Pagnussat G. (2003): Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology*, **54**, 109–136.
- Lamberg A., Juahainen M., Metso J., Ehnholm C., Shoulders C., Scott J., Pihlajaniemi T., Kivirikko K. I. (1996). The role of protein disulphide isomerase in the microsomal triacylglycerol transfer protein does not reside in its isomerase activity. *Biochemical Journal*, **315**, 533–536.
- Lancaster J. R., Jr. (2008): Protein cysteine thiol nitrosation: maker or marker of reactive nitrogen species-induced nonerythroid cellular signaling? *Nitric Oxide*, **19**, 68–72.
- Larkindale J., Knight M. R. (2002): Protection against Heat Stress-Induced Oxidative Damage in *Arabidopsis* Involves Calcium, Abscisic Acid, Ethylene, and Salicylic Acid. *Plant Physiology*, **128**, 682–695.
- Larkindale J., Huang B. (2004): Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *Journal of Plant Physiology*, **161**, 405–413.
- Larkindale J., Mishkind M., Vierling E. (2005): Plant responses to high temperature. In: *Plant Abiotic Stress*. (Jenks MA, Hasegawa PM eds), Blackwell Publishing, Oxford, UK, 100–144.
- Larkindale J., Vierling E. (2008): Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiology*, **146**, 748–761.
- Lee U., Wie C., Fernández B.O., Feelisch M., Vierling E. (2008): Modulation of nitrosative stress by S-nitrosogluthione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**, 786–802.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J. M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2011): Function of S-nitrosogluthione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling a Behavior*, **6**, 789–793.

- Lillig Ch., Holmgren A. (2007): Thioredoxin and related molecules – From biology to health and disease. *Antioxidant and Redox Signaling*, **9**, 25-47.
- Lima J. E., Carvalho R. F., Neto A. T., Figueira A., Peres L. E. P. (2004): Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle, and improved in vitro shoot regeneration. *Plant Science*, **167**, 753–757.
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J. (2005): Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in Arabidopsis. *Plant physiology*, **137**, 921-930.
- Liu X., Miller M. J., Joshi M. S., Thomas D. D., Lancaster Jr J. R. (1998a): Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 2175-2179.
- Liu Z., Rudd M. A., Freedman J. E., Loscalzo J. (1998b): S-transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **284**, 526 – 534.
- 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.
- Liu H. T., Liu Y. Y., Pan Q. H., Yang H. R., Zhan J. C., Huang W. D. (2006): Novel interrelationship between salicylic acid, abscisic acid, and PIP₂-specific phospholipase C in heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 3337-3347.
- Locato V., Gadaleta C., De Gara L., De Pinto M. C. (2008): Production of reactive species and modulation of antioxidant network in response to heat shock: a critical balance for cell fate. *Plant Cell and Environment*, **31**, 1606–1619.
- LoPachin R. M., Gavin T., Petersen D. R., Barber D. S. (2009): Molecular mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal and acrolein toxicity : nucleophilic targets and adduct formation. *Chemical Research in Toxicology*, **22**, 1499–1508.
- Lopachin R. M., Gavin T., Decaprio A., Barber D. S. (2012): Application of the Hard and Soft, Acids and Bases (HSAB) theory to toxicant–target interactions. *Chemical Research in Toxicology*, **25**, 239-251.
- Lopez-Delgado H., Dat J. F., Foyer Ch. H., Scott I. M. (1998): Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *Journal of Experimental Botany*, **49**, 713-720.
- 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.
- Mannick J. B., Schonhoff C. M. (2002): Nitrosylation: the next phosphorylation? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **408**, 1 – 6.
- 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.
- Martinez M. C., Achkor H., Persson B., Fernandez M. R., Shafqat J., Farres J., Jornvall H., Pares X. (1996): Arabidopsis formaldehyde dehydrogenase - Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class P and liver class I alcohol dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry* **241**, 849-857.
- Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2004): S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovascular Research*, **62**, 43-52.
- Mathews, W. R., and Kerr, S. W. (1993): Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **267**, 1529-1537.
- Matsumoto A., Comatas K. E., Liu L., Stamler J. S. (2003): Screening for nitric oxide-dependent protein– protein interactions. *Science*, **301**, 657–661.
- 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.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., van Breusegem F. (2011): ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, **16**, 300–309.

- Montoya T., Nomura T., Yokota T., Farrar K., Harrison K., Jones J. G. D., Kaneta T., Kamiya Y., Szekeres M., Bishop G. J. (2005): Patterns of Dwarf expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. *The Plant Journal*, **42**, 262–269.
- Moore K. P., Mani A. R. (2002): Measurement of protein nitration and S-nitrosothiol formation in biology and medicine. *Methods of Enzymology* **359**, 256-268.
- Mustafa A. K., Gadalla M. M., Sen N., Kim S., Mu W., Gazi S. K., Barrow R. K., Yang G., Wang R., Snyder S. H. (2009): H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Science Signaling*, **2**, 72.
- Nadzhimov U. K., Jupe S. C., Jones M. G., Scott I. M. (1988): Growth and gibberellin relations of the extreme dwarf dx tomato mutant. *Physiologia Plantarum*, **73**, 252–256.
- Nagy P., Winterbourn C.C. (2010): Redox Chemistry of Biological Thiols. In: *Advances in Molecular Toxicology*. Vol 4, Elsevier; San Diego, USA, 183–222.
- Nakamoto H., Vigh L. (2007): The small heat shock proteins and their clients. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**, 294-306.
- Nasir Khan M., Mohammad F., Mobin M., Ali Saqib M. (2014): Tolerance of plants to abiotic stress: a role of nitric oxide and calcium. In: *Nitric oxide in plants: metabolism and role in stress physiology*. (Nasir Khan M., Mobin M., Mohammad F., Corpas F. J. eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, 225-242.
- Nathan C. (2003): Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *The American Society for Clinical Investigation*, **111**, 769–778.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2001): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental botany*, **53**, 1237-1247.
- Nikitovic D., Holmgren A. (1996): S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 19180-19185.
- Nikitovic D., Holmgren A., Spyrou G. (1998): Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **242**, 109-112.
- Noble D.R., Williams D.L.H. (2000): Structure-reactivity studies of the Cu²⁺-catalyzed decomposition of four S-nitrosothiols based around the S-nitrosocysteine/S-nitrosoglutathione structures. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, **4**, 392–398.
- Ortega-Galisteo A. P., Rodríguez-Serrano M., Pazmiño D. M., Gupta D. K., Sandalio L. M., Romero-Puertas M. C. (2012): S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 2089–2103.
- Ono K., Akaike T., Sawa, T., Kumagai, Y., Wink D. A., Tantillo D. J., Hobbs A. J., Nagy P., Xian M., Lin J., Fukuto J.M. (2014): Redox chemistry and chemical biology of H₂S, hydropersulfides, and derived species : implications of their possible biological activity and utility. *Free Radical Biology and Medicine*, **77**, 82–94.
- Park J. W. (1988): Reaction of S-nitrosoglutathione with sulphhydryl groups in proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **152**, 916–920.
- Pérez-Mato I., Castro C., Ruiz F. A., Corrales F. J., Mato J. M. (1999): Methionine adenosyltransferase S-nitrosylation is regulated by the basic and acidic amino acids surrounding the target thiol. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 17075-17079.
- Pérez S., Ahmed A. I. S., Cabeyas D. (2013): Molecular and biochemical characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants cv. Micro-Tom under lead (Pb)-induced stress. *Biotechnología Aplicada*, **30**, 194-198.
- Peterson L. A., Wagener T., Sies H., Stahl W. (2007): Decomposition of S-Nitrosocysteine via S- to N-transnitrosation. *Chemical Research in Toxicology*, **20**, 721-723.
- Pihlajaniemi T., Helaakoski T., Tasanen K., Myllyla R., Huhtala M.-L., Koivu, J., Kivirriko K. I. (1987): Molecular cloning of the b-subunit of prolyl-4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. *EMBO Journal*, **6**, 643-649.

- Pnueli L., Carmel-Goren L., Hareven D., Gutfinger T., Alvarez J., Ganal M., Zamir D., Lifschitz E. (1998): The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development*, **125**, 1979–1989.
- Pnueli L., Gufinger T., Hareven D., Ben-Naim O., Ron N., Adir N., Lifschitz E. (2001): Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *The Plant Cell*, **13**, 2687–2702.
- Puppo A., Pauly N., Boscari A., Mandon K., Brouquisse R. (2013): Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the legume– Rhizobium and mycorrhizal symbioses. *Antioxidants & Redox Signaling*, **18**, 2202–2219.
- Prado, A. M., Porterfield, D. M., and Feijo, J. A. (2004): Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* **131**, 2707–2714.
- Prado, A. M., Colaco, R., Moreno, N., Silva, A. C., and Feijo, J. A. (2008): Targeting of pollen tubes to ovules is dependent on nitric oxide (NO) signaling. *Molecular Plant* **1**, 703–714.
- Prather C. W., Sisler E. C. (1972): Glycine and glyoxylate decarboxylation in *Nicotiana rustica* roots. *Phytochemistry*, **11**, 1637–1647.
- Pryor W. A., Church D. F., Govindan C. K., Crank G. (1982): Oxidation of thiols by nitric oxide and nitrogen dioxide: synthetic utility and toxicological implications. *The Journal of Organic Chemistry*, **47**, 156–9.
- 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*, **9**, 5913–5918.
- Radi R. (2013): Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Accounts of Chemical Research*, **46**, 550–559.
- Rao M. V., Davis K. R. (1999): Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *The Plant Journal*, **17**, 603–614.
- Reumann S., Babujee L., Ma C., Wienkoop S., Siemsen T., Antonicelli G. E., Rasche N., Lüder F., Weckwerth W., Jahn O. (2007): Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms, *Plant Cell*, **19**, 3170–3193.
- del Río L. A. (2015): ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 2827–2837.
- Romeo A. A., Capobianco J. A., English A. M. (2003): Superoxide dismutase targets NO from GSNO to Cys β 93 of oxyhemoglobin in concentrated but not dilute solutions of the protein. *Journal of American Chemical Society*, **125**, 14370–14378.
- Romero-Puertas M. C., Laxa M., Matte A., Zaninotto F., Finkemeier I., Jones A. M., Perazzolli M., Vandelle E., Dietz K. J., Delledonne M. (2007): S-Nitrosylation of Peroxiredoxin II E Promotes Peroxynitrite-Mediated Tyrosine Nitration. *The Plant Cell*, **19**, 4120–4130.
- Romero-Puertas M. C., Rodríguez-Serrano M., Sandalio L. M. (2013): Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 373.
- Rustérucci Ch., Espunya M. C., Díaz M., Chabannes M., Martínéz M. C. (2007): S-Nitrosogluthione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology*, **143**, 1282–1292.
- Řepková J. (2013): Genetika odolnosti rostlin k patogenům. In: Genetika rostlin. Masarikova univerzita:
http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/skripta/genetika_rostlin_skripta.pdf
 (18. 4. 2016).
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002): *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosogluthione reductase. *FEBS Letters*, **515**, 20–24.
- Sanghani P. C., Stone C. L., Ray B. D., Pindel E. V., Hurley T. D., Bosron W. F. (2000): Kinetic mechanism of human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, **39**, 10720–10729.
- Sanghani P. C., Robinson H., Bennett-Lovsey R., Hurley T. D., Bosron W. F. (2003a): Structure-function relationships in human Class III alcohol dehydrogenase (formaldehyde dehydrogenase). *Chemico-Biological Interactions*, **143**, 195–200.

- Sanghani P. C., Bosron W. F., Hurley T. D. (2003b): Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structural changes associated with Ternary Complex formation. *Biochemistry*, **41**, 15189- 15194.
- Sandalio L. M., Rodríguez-Serrano M., Gupta D. K., Archilla A., Romero- Puertas M. C., del Río L. A. (2012): Reactive oxygen species and nitric oxide in plants under cadmium stress: from toxicity to signaling. In: *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change.* (: Ahmad P., Prasad M. N. V. eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, 199–215.
- Sardi E., Tyihak E. (1994): Simple determination of formaldehyde in dimedone adduct form in biological samples by high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, **8**, 313–314.
- Schmidt H. H. H. W., Hofmann H., Schindler U., Shutenko Z. S., Cunningham D. D., Feelisch M. (1996): No NO from NO synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 14492 – 14497.
- Sies H. (2014): Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, **289**, 8735–8741.
- Singh R. J., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B. (1996): Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 18596– 18603.
- Sliskovic I., Raturi A., Mutus B. (2005): Characterization of the S-denitrosation activity of protein disulfide isomerase. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 8733-8741.
- Smith J. N., Dasgupta T. P. (2000): Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by L-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide. *Nitric Oxide*, **4**, 57 – 66.
- Staab C. A., Alander J., Brandt M., Lengqvist J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2008): Reduction of S-nitrosoglutathione by alcohol dehydrogenase 3 is facilitated by substrate alcohols via direct cofactor recycling and leads to GSH-controlled formation of glutathione transferase inhibitors. *Biochemical Journal*, **413**, 493-504.
- Staab C. A., Alander J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2009a): The Janus face of alcohol dehydrogenase 3. *Chemico-Biological Interactions*, **178**, 29-35.
- Staab C. A., Hellgren M., Grafström R. C., Höög J. O. (2009b): Medium-chain fatty acids and glutathione derivatives as inhibitors of S-nitrosoglutathione reduction mediated by alcohol dehydrogenase 3. *Chemico-Biological Interactions*. **180**, 113-118.
- Stamler J. S., Jaraki O., Osborne J., Simon D. I., Keanay J., Vita J., Singel D., Valeri C. R., Loscalzo J. (1992a): Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 7674-7677.
- Stamler J. S., Simon D. I., Osborne J.A., Mullins M. E., Jaraki O., Michel T., Singel D. J. (1992b): S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 444– 448.
- Stamler J. S. (1994): Redox signalling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, **78**, 931–936.
- Stamler J. S., Toone E. J., Lipton S. A., Sucher N. J. (1997): (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron*, **18**, 691– 696.
- Stamler J. S. Toone E. J. (2002): The decomposition of thionitrites. *Current Opinion in Chemical Biology*, **6**, 779-785.
- Sticher L., Mauch-Mani B., Métraux J-P. (1997): Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **35**, 235–70.
- Strittmatter P., Ball E. G. (1955): Formaldehyde Dehydrogenase, A glutathione-dependent enzyme system. *Journal of Biological Chemistry*, **213**, 445-461.
- Stoyanovsky D. A., Tyurina Y. Y., Tyurin V. A., Anand D., Mandavia D. N., Gius D., Ivanova J., Pitt B., Billiar T. R., Kagan V. E. (2005): Thioredoxin and lipoic acid catalyze the denitrosation of low molecular weight and protein S-nitrosothiols. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 15815-15823.

- Stuehr D., Pou S., Rosen G. M. (2001): Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 14533 – 14536.
- Szalai G., Kellos T., Galiba G., Kocsy G. (2009): Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, **28**, 66-80.
- Takahashi H., Shimizu A., Arie T., Rosmalawati S., Fukushima S., Kikuchi M., Hikichi Y., Kanda A., Takahashi A., Kiba A., Ohnishi K., Ichinose Y., Taguchi F., Yasuda Ch., Kodama M., Egusa M., Masuta Ch., Sawada H., Shibata D., Hori K., Watanabe Y. (2005): Catalog of Micro-Tom tomato responses to common fungal, bacterial, and viral pathogens. *Journal of General Plant Pathology*, **71**, 8-22.
- Thomma B. P. H. J., Eggermont K., Penninckx I. A. M. A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B. P. A., Broekaert W. F. (1998): Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 15107-11.
- Thompson C. M., Sonawane B., Grafstrom R. C. (2009): The Ontogeny, Distribution, and Regulation of Alcohol Dehydrogenase 3: Implications for Pulmonary Physiology. *Drug Metabolism and Disposition*, **37**, 1565-1571.
- Trujillo M., Alvarez M. N., Peluffo G., Freeman B. A., Radi R. (1998): Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 7828–7834.
- Uotila L., Koivusalo M. (1974): Formaldehyde dehydrogenase from human liver – purification, properties, and evidence for formation of glutathione thiol esters by enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **249**, 7653-7663.
- 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.
- Vierling E. REEIS USDA: <http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/0215005-function-and-regulation-of-a-key-enzyme-in-nitric-oxide-metabolism-s-nitroglutathione-reductase.html>. (19.4.2016).
- Vlot A. C., Klessig D. F., Park S. (2008): Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 436-442.
- Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux P.M., Schoffl F. (2006): Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, **61**, 733–746.
- Wang, Y., Chen, T., Zhang, C., Hao, H., Liu, P., Zheng, M., Baluška F., Šamaj J., Lin J. (2009): Nitric oxide modulates the influx of extracellular Ca²⁺ and actin filament organization during cell wall construction in *Pinus bungeana* pollen tubes. *New Phytologist*, **182**, 851–862.
- Wang Y., Yang J., Yi J. (2012). Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxidant and Redox Signaling*, **16**, 649–657.
- Wang Y., Loake G. J., Chu C. (2013): Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 314.
- Wendehenne D., Hancock J. T. (2011): New frontiers in nitric oxide biology in plants. *Plant Science*, **181**, 507–508.
- Williams J. G., Pappu K., Campbell S. L. (2003): Structural and biochemical studies of p21Ras S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 6376 – 6381.
- Wink D. A., Darbyshire J. F., Nims R. W., Saavedra J. E., Ford P.C. (1993): Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chemical Research in Toxicology*, **6**, 23-27.

- Wink D. A., Nims R. W., Darbyshire J. F., Christodoulou D., Hanbauer I., Cox G. W., Laval F., Laval J., Cook J. A. (1994): Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chemical Research in Toxicology*, **7**, 519 – 525.
- Yano H., Kuroda S., Buchanan B. B. (2002): Disulfide proteome in the analysis of protein function and structure. *Proteomics*, **2**, 1090–1096.
- Yasuko I., Satoh A., Chatterjee S., Toomre D. K., Chalouni C. M., Fulton D., Groszmann R. J., Shah V. H., Sessa W. C. (2006): Nitric oxide synthase generates nitric oxide locally to regulated compartmentalized protein S-nitrosylation and protein trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 19777-19782.
- Yu M., Lamattina L., Spoel S.H., Loake G.J. (2014): Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist*, **202**, 1142–1156.
- Yun B. W., Feechan A., Yin M., Saidi N. B., Le Bihan T., Yu M. , Moore J. W., Kang J. G., Kwon E., Spoel S. H., Pallas J. A., Loake G. J. (2011): S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature*, **478**, 264–268.
- Xu S., Guerra D., Lee U., Vierling E. (2013): S-nitrosoglutathione reductases are low-copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 430.
- Zai A., Rudd M. A., Scribner A. W., Loscalzo J. (1999): Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *Journal of Clinical Investigation*, **103**, 393-399.
- Zafra, A., Rodríguez-García, M. I., and Alché, J. D. (2010). Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biology*, 10-36.
- Zhang J., Li Y. D., Patel J. M., Block E. R. (1998): Thioredoxin overexpression prevents NO-induced reduction of NO synthase activity in lung endothelial cells. *American Journal of Physiology*, **275**, 288–293.
- Zushi K., Ono M., Matsuzoe N. (2014): Light intensity modulates antioxidant systems in salt-stressed tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) fruits. *Scientia Horticulturae*, **165**, 384–391.

6 Seznam použitých symbolů a zkratek

8-nitro cGMP	8-nitro-cyklického guanosinmonofosfátu
AA/BIS	Akrylamid- <i>N,N'</i> -bisakrylamid
ABA	Kyselina abscisová
ADH (1,3,4)	Alkoholdehydrogenasa (třídy 1,3,4)
APS	Persíran amonný
AP	Alkalická fosfatasa
APX	Askorbátperoxidasa
ASA	Kyselina askorbová
AtGSNOR	S-nitrosogluthationreduktasa z <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtRBOHD	Respiratory burst oxidase D
BSA	Hovězí sérový albumin
BST	Biotin switch
CaM	kalmodulin
CAT	Katalasa
CBS	Cystathionin β -synthasy
CGL	Cystathionin γ -lyasa
CGNO	S-nitrosocysteinylyl-glycin
CMV	Virus okurkové mozaiky
Cys-NO	S-nitrosocystein
CTL1	Protein podobný chitinase
D	<i>dwarf</i> gen
DEA	Diethylamin
DGD1	Digalaktosyldiacylglycerolsynthasa 1
DREB2A	Dehydratace-respozivní element-vázající protein 2A
DTT	Dithiotreithol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EF 1 α	Elongační faktor 1 α
EIN 2	Ethylen necitlivý protein 2
ETR1	Ethylenový receptor 1
FAD	Flavinadenindinukleotid
FtsH11	Thylakoidní proteasa
GAPDH	Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa
GGT	γ glutamyltranspeptidasa

GPX	Glutathionperoxidasa
GSH	Glutathion
GSNHOH	S-hydroxylaminoglutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSOOH	Kyselina sulfinová
GSONH ₂	Glutathion-sulfinamid
GSSG	Glutathion-Disulfid
HMGS	S-(hydroxymethyl)glutathion
HNO	Nitroxyl
HRP	Křenová peroxidasa
HR	Hypersenzitivní reakce
HSF	Transkripční faktory teplotního stresu
HSP	Proteiny teplotního šoku
HT	Teplotní stres
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfát
ISR	Indukovaná systémová rezistence
JA	Kyselina jasmonová
K-Pi	Draselný fosfátový pufr
LB	Luria/Bertani médium
MAP kinasa	Mitogenem aktivovaná proteinová kinasa
MBF1c	Faktor multiproteinového přemostění
MCIB	Monochlorobiman
MDB	Membrane Desalting Buffer
MMS	S-methylmethanthiosulfonát
MNT	<i>miniature</i> gen
MW	Molekulová hmotnost
N6022	N6022 (3-(5-(4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylfenyl)-1H-pyrrol-2-yl)propanová kyselina
NADPH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát
Na-Pi	Sodný fosfátový pufr
NBT-BCIP	Roztok nitrotetrazoliové modře a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátu
NBT	Nitrotetrazoliová modř

NDH1	NAD(P)H dehydrogenasa 1
NO [·]	Nitroxyl
NO	Oxid dusnatý
NO ⁺	Nitrosoniový ion
NO ₂ [·]	Radikál oxidu dusičitého
NO ₂ ⁻	Dusitanový anion, nitrit
NO ₃ ⁻	Dusičnanový anion, nitrát
N ₂ O ₃	Oxid dusitý
NPR 1	Non-expresor související s genem patogeneze 1
O ₂ ^{-·}	Superoxidový anionradikál
OD ₆₀₀	Optická hustota měřená při 600 nm
ONOO ⁻	Peroxydusitan
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PCD	Programovaná buněčná smrt
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PDI	Protein disulfidisomerasa
PMSF	Fenylmethylsulfonylfluorid
PP7	Fosfatasa 7
PrxII E	Peroxiredoxin II E
PVX	Bramborový vir X
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
R-S-	Thiolát
R-SH	Thiol
RSNO(s), SNO	S-nitrosothiol(y)
R-SN-RN	Sulfenamid
R-S(O)NRH	Sulfinamid
R-S(O) ₂ NRH	Sulfonamid
R-SO	Sulfenát
R-SO ₂	Sulfinát
R-SO ₃	Sulfonát
R-SS	Cysteinylový persulfid
R-SSO ₃ C	Cysteinylový thiosulfát
R-SS-R	Disulfid

SA	Kyselina salicylová
SABP 3	Protein vázající kyselinu salicylovou 3
SAR	Sytémově získaná rezistence
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SIGSNOR	GSNOR ze <i>Solanum lycopersicum</i>
SNAP	S-nitroso-N-acetyl-DL-penicilamin
SNP	Nitroprusid sodný
SOD	Superoxiddismutasa
SP	<i>Self-pruning</i> gen
TAV	Rajčatový asperma vir
TBARS	Reaktivní substance kyseliny thiobarbiturové
TBS	Fyziologický roztok pufrovaný Tris
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	<i>N, N</i> - tetramethylendiamin
TGA 1	Transkripční faktor TGA1
TOMV	Virus rajčatové mozaiky
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktasa
TSWV	Vir bronzovosti rajčete
TU8/TFL2	Heterochromatinový protein 1(známí jako terminal flower 2)
Vps53	Vakuolární třídící protein 53
WT	Wild type
XOD	Karbonylreduktasa