

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Obranné reakce aktivované teplotním stresem se zaměřením
na úlohu reaktivních forem dusíku u hrachu setého**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kateřina Vrbová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph. D.
Rok:	2021

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

V Olomouci dne

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za věnovaný čas, odborné vedení, trpělivost a cenné rady při vypracování této práce. Také děkuji Mgr. Janě Sekaninové, Ph.D. a celé katedře biochemie za pomoc při vypracování experimentální části.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Kateřina Vrbová
Název práce	Obranné reakce aktivované teplotním stresem se zaměřením na úlohu reaktivních forem dusíku u hrachu setého
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	

Teplotního stres (TS) působící na rostlinu spouští aktivaci obranného mechanismu zahrnující signální molekuly, z nichž nejdůležitější roli zastávají reaktivní formy dusíku (RNS) a kyslíku (ROS). Největší význam má molekula oxidu dusnatého (NO), která je schopna prostřednictvím S-nitrosylace modulovat cílové proteiny v rámci obranné reakce. Touto reakcí vznikají S-nitrosothioly (RSNO), které jsou regulovány denitrosylačními enzymy S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR) a thioredoxinreduktasou (TrxR). Dále vznikají polyaminy (PA) a typickým znakem pro TS je zvýšená produkce heat shock proteinů (Hsp).

Cílem diplomové práce bylo studium metabolismu PA a RNS v reakci na krátkodobé (2 h) a dlouhodobé (24 h) působení TS při 45°C. Dále byla studována produkce Hsp70. Pro studium byly použity extrakty z nadzemní části dvou genotypů hrachu setého (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset) lišící se odolností vůči některým patogenům. Hladina PA byla značně zvýšena u *P. sativum* cv. Twinset, zejména Put a Spm. U *P. sativum* cv. Kudrnáč bylo pozorováno zvýšení produkce Spd. Obsah RSNO se u *P. sativum* cv. Kudrnáč zvýšil pouze po 2 h, poté byl pozorován pokles. U *P. sativum* cv. Twinset byla nejvyšší hladina RSNO pozorována po 24 h. Aktivita GSNOR a TrxR se u obou genotypů vystavených dlouhodobému TS postupně zvyšovala a po 24 h byla nejvyšší. Značné zvýšení obou denitrosylačních enzymů bylo zaznamenáno zejména u *P. sativum* cv. Kudrnáč. Produkce Hsp70 byla vlivem působení TS mírně zvýšená po celou dobu experimentu u obou genotypů hrachu. Možnost S-nitrosylace proteinů je nutné potvrdit pomocí metody biotin switch.

Klíčová slova	Teplotní stres, <i>Pisum sativum</i> , polyaminy, reaktivní formy dusíku/kyslíku, S-nitrosoglutathionreduktasa, thioredoxinreduktasa, heat shock proteiny
Počet stran	89
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Kateřina Vrbová
Title	The defensive reactions activated by heat stress focused on the role of reactive nitrogen species in pea (<i>Pisum sativum</i>)
Type of thesis	Master
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	

Exposure of temperature stress (TS) triggers activation of defense mechanism in the plants, which include signalling molecules, such as reactive nitrogen (RNS) and oxygen (ROS) species. The most important role plays nitric oxide (NO), which can modulate target proteins via S-nitrosylation in stress response. This reaction results in forming of S-nitrosothiols regulated by denitrosylation enzymes S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) and thioredoxin reductase (TrxR). The polyamines (PA) are also produced and a typical sign for TS is elevated production of heat shock proteins (Hsp).

The aim of the thesis was to study the metabolism of PA and RNS in plant defense response to the short-term (2 h) and long-term (24 h) TS at 45 °C. The next aim was to study the production of Hsp70. For experiments, the leaf extracts of two genotypes of pea (*P. sativum* cv. Kudrnáč and *P. sativum* cv. Twinset) with different pathogen resistance, were used. The detected level of PA was significantly elevated in *P. sativum* cv. Twinset extracts, especially Put and Spm. The elevated Spd production was detected in *P. sativum* cv. Kudrnáč extracts. The level of RSNO was elevated only after 2 h TS in *P. sativum* cv. Kudrnáč followed by a decrease. The highest level of RSNO was showed after 24 TS in *P. sativum* cv. Twinset. GSNOR and TrxR activity gradually increased within 24 h in both pea genotype extracts exposed to long-term TS however, the most significant increase was detected in *P. sativum* cv. Kudrnáč extracts. Hsp70 production was a little elevated in both pea genotype extracts during the whole experiment. The possibility of protein S-nitrosylation during TS must be confirmed by the biotin switch method.

Keywords	Heat stress, <i>Pisum sativum</i> , polyamines, reactive nitrogen/oxygen species, S-nitrosoglutathione reductase, thioredoxin reductase, heat shock proteins
Number of pages	89
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	OBRANNÉ REAKCE ROSTLIN NA ABIOTICKÝ STRES SE ZAMĚŘENÍM NA TEPLOTNÍ STRES	2
2.1.1	REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU.....	3
2.1.1.1	OXID DUSNATÝ.....	5
2.1.1.2	NITROSAČNÍ STRES A JEHO REGULACE V REAKCI NA TEPLOTNÍ STRES.....	9
2.1.1.3	S-NITROSYLACE PROTEINŮ SOUVISEJÍCÍCH S REGULACÍ ODPOVĚDI NA STRES.....	13
2.1.2	REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU.....	18
2.1.2.1	OXIDAČNÍ STRES A JEHO REGULACE V REAKCI NA TEPLOTNÍ STRES 20	
2.1.3	HEAT-SHOCK PROTEINY.....	26
2.1.4	POLYAMINY.....	32
2.1.4.1	ÚLOHA POLYAMINŮ V OBRANNÉ REAKCI NA TEPLOTNÍ STRES.....	35
2.1.5	DOPAD TEPLOTNÍHO STRESU NA ZEMĚDĚLSTVÍ.....	36
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
3.1	MATERIÁL A METODY.....	38
3.1.1	CHEMIKÁLIE.....	38
3.1.2	PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ.....	38
3.1.3	ROSTLINNÝ MATERIÁL.....	39
3.1.4	PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU.....	39
3.1.5	ZPRACOVÁNÍ ROSTLINNÉHO MATERIÁLU.....	40
3.1.6	STANOVENÍ PROTEINŮ.....	41
3.1.7	STANOVENÍ POLYAMINŮ METODOU HPLC-MS.....	41
3.1.8	STANOVENÍ S-NITROSOETHIOLŮ.....	42
3.1.8.1	SAVILLOVA METODA.....	42
3.1.8.2	CHEMILUMINISCENČNÍ METODA S VYUŽITÍM NO ANALYZÁTORU.....	43
3.1.9	STANOVENÍ AKTIVITY S-NITROSOGLUTATHIONREDUKTASY.....	44
3.1.10	STANOVENÍ AKTIVITY THIOREDOXINREDUKTASY.....	44
3.1.11	DETEKCE HEAT SHOCK PROTEINŮ 70 METODOU WESTERN BLOT.....	45
4	VÝSLEDKY	47
4.1	STANOVENÍ POLYAMINŮ METODOU HPLC-MS.....	48
4.2	STANOVENÍ S-NITROSOETHIOLŮ.....	51
4.2.1	SAVILLOVA METODA.....	51
4.2.2	CHEMILUMINISCENČNÍ METODA S VYUŽITÍM NO ANALYZÁTORU.....	53
4.2.2.1	TESTOVÁNÍ PODMÍNEK STANOVENÍ RSNO S VYUŽITÍM NO ANALYZÁTORU.....	53
4.2.2.2	ORIENTAČNÍ STANOVENÍ RSNO S VYUŽITÍM NO ANALYZÁTORU.....	55
4.3	STANOVENÍ AKTIVITY S-NITROSOGLUTATHIONREDUKTASY.....	56
4.4	STANOVENÍ AKTIVITY THIOREDOXINREDUKTASY.....	58
4.5	STANOVENÍ PROTEINŮ.....	59

4.6	DETEKCE HEAT SHOCK PROTEINŮ 70 METODOU WESTERN BLOT	61
5	DISKUZE	64
6	ZÁVĚR	74
7	LITERATURA	76
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	87

Cíle práce

V teoretické části je cílem diplomové práce vypracování literární rešerše zaměřené na charakterizaci:

- 1) obranných mechanismů aktivovaných teplotním stresem
- 2) reaktivních forem kyslíku a dusíku se zaměřením na regulaci prostřednictvím S-nitrosylace
- 3) rostlinných regulátorů zapojených do obrany proti teplotnímu stresu (polyaminy apod.)
- 4) heat shock proteinů
- 5) enzymů metabolismu oxidu dusnatého a jejich zapojení v obranných reakcích rostlin

V experimentální části je cílem práce studium vlivu teplotního stresu u hrachu setého na:

- 1) hladinu polyaminů
- 2) aktivitu enzymů thioredoxinreduktasy a S-nitrosoglutathionreduktasy
- 3) intenzitu S-nitrosylace
- 4) produkci heat shock proteinu 70

1 ÚVOD

Rostliny jsou během svého života neustále vystavovány stresovým podmínkám ovlivňujícím jejich růst a vývoj. Na tyto podmínky si rostliny během evoluce vyvinuly mnoho adaptačních mechanismů, díky kterým jsou schopny přežít. V obraně proti biotickému či abiotickému stresu hrají důležitou roli reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Jedná se o signální molekuly účastnící se mnoha fyziologických procesů v rostlině, nicméně jejich nadměrná akumulace působí toxicky a může vést až ke vzniku nitro-oxidačního stresu vedoucího až k úhynu celé rostliny. Klíčovou roli zastává molekula oxidu dusnatého (NO), která je schopna prostřednictvím posttranslačních modifikací (PTM) v rámci signální dráhy modulovat funkci cílových proteinů. Mezi tyto PTM patří např. metalonitrosylace, kdy dochází k vazbě NO na přechodné kovy, dále nitrace, při které je NO vázán na tyrosinové jádro proteinu a poslední velmi významnou PTM je S-nitrosylace, při které dochází k vazbě NO na cysteinové residuum proteinu. Úroveň proteinové S-nitrosylace je regulována dvěma klíčovými enzymy: S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR) využívající kofaktor NADH a thioredoxinreduktasou (TrxR) využívající thioredoxin a NADPH. Tyto denitrosylasy zabráňují nadměrné akumulaci RSNO a jejich negativním dopadům na rostlinu rostoucí za fyziologických či stresových podmínek (Hess a Stamler, 2012).

Jedním z kritických abiotických stresových faktorů dnešní doby spojené s globálními změnami klimatu je vysoká teplota ovlivňující mimo jiné produktivitu a kvalitu plodin. V rámci fyziologických procesů má teplotní stres (TS) působící na rostlinu v závislosti na intenzitě a době působení negativní vliv na fotosyntézu a fotorespiraci. Dochází také ke zvýšené produkci ROS vedoucí k oxidačnímu poškození membrán, nukleových kyselin a proteinů. Taktéž dochází k akumulaci RNS, jejichž množství musí být regulováno pro přežití rostliny. S TS je spojena i nadměrná produkce heat shock proteinů (Hsp) napomáhající při stresových podmínkách opětovnému skládání proteinů (Li *et al.*, 2018). V neposlední řadě je známo, že při stresu dochází ke zvýšené produkci polyaminů (PA) účastnících se obranných reakcí v důsledku působení stresových faktorů a podílejících se na vývoji termotolerance u rostlin. Katabolismus PA zajišťují enzymy polyaminoxidasy (PAO), diaminoxidasy (DAO) a nakonec aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) (Hussain *et al.*, 2011).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Obranné reakce rostlin na abiotický stres se zaměřením na teplotní stres

Rostliny jsou během svého životního cyklu nepřetržitě vystavovány mnoha stresovým podmínkám, jako je salinita, extrémní teploty, sucho, těžké kovy, UV záření či ozon. Tyto podmínky ovlivňují řadu fyziologických, biochemických a molekulárních procesů vedoucích k negativním dopadům na růst a vývoj celé rostliny a také na její produktivitu. Jako přisedlé organismy se rostliny musí spolehnout na signální mechanismy, aby přizpůsobily svůj růst, tvar a metabolismus neustálým změnám v jejich prostředí. V přírodě nedochází k působení pouze jednoho stresu. Např. teplotní stres (TS) je spojen často s vysokou dávkou světla, ale také usnadňuje šíření škůdců a patogenů, což vede k dramatickým produkčním ztrátám. Mezi reakce rostliny na teplo patří otevírání průduchů, aby došlo k útlumu nárůstu teploty, zatímco při reakci na sucho musí dojít k zavření průduchů, aby se zabránilo nadměrné ztrátě vody. V rostlině se tedy odezva na stresové podmínky značně liší dle kombinace stresů. Bylo zjištěno, že 61 % genů indukovaných kombinovaným stresem nebylo indukováno žádným z jednotlivých stresových faktorů (Rasmussen *et al.*, 2013). Při působení abiotického stresu dochází k akumulaci reaktivních forem dusíku a kyslíku (RNS a ROS), které při vysokých hladinách působí toxicky a mohou vést ke vzniku oxidačního a/nebo nitrosačního stresu vedoucího až k poškození buněčných struktur či dokonce úhynu rostliny (Krasensky-Wrzaczek a Kangasjarvi, 2018). Proto si rostliny během své evoluce vyvinuly řadu adaptačních mechanismů včetně antioxidačních obranných systémů (Gill a Tuteja, 2010a).

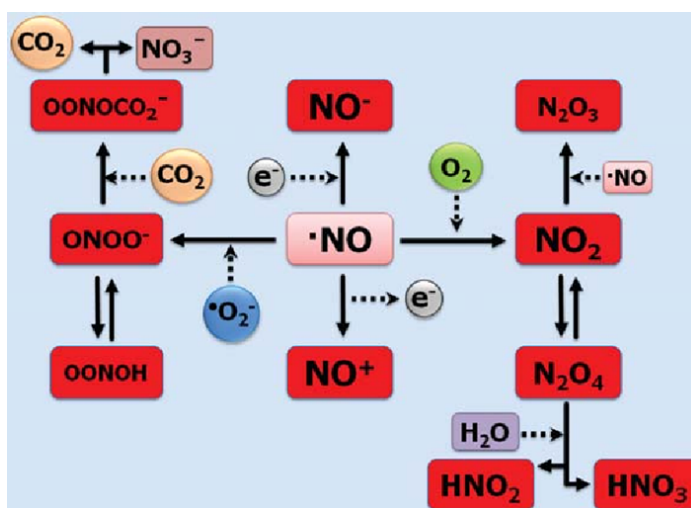
Jedním z hlavních abiotických stresových faktorů patřící do globálních změn klimatu je vysoká teplota. TS negativně ovlivňuje vegetativní i reprodukční růst rostliny, nicméně míra jeho efektu závisí na intenzitě a rychlosti zvýšení teploty a jeho době působení na rostliny (Li *et al.*, 2018). Účinek vysokých teplot se u různých druhů rostlin liší a dokonce záleží i na jejich vývojovém stádiu. Obecně je reprodukční fáze na stres citlivější, což má za následek značné snížení výtěžku. Jedním z nejcitlivějších fyziologických procesů na TS je fotosyntéza. Dochází k rychlé inhibici v důsledku změny vnitřní struktury chloroplastů, inaktivace enzymu ribulosa-bisfosfátkarboxylasy/oxygenasy (RUBISCO), snížení množství

fotosyntetických pigmentů a poškození fotosystému II (Allakhverdiev *et al.*, 2008; Dutta *et al.*, 2009). Při TS je ovlivněna také syntéza škrobu a sacharózy snížením aktivity příslušných enzymů, jako je invertasa, sacharosafosfátsynthasa a ADP-glukosapyrofosforylasa (Vu *et al.*, 2001). Akumulace ROS je další hlavní buněčnou odpovědí na TS v rostlinách. Pokud je v buňce hladina ROS vysoká, může dojít k oxidačnímu poškození narušením membrán, proteinů, RNA a DNA, což vede až k programované buněčné smrti (Petrov *et al.*, 2015). Ačkoli jsou vysoké hladiny ROS pro buňky škodlivé, nižší hladiny ROS, zejména H₂O₂, hrají zásadní roli při regulaci vývoje termotolerance rostlin (Wang *et al.*, 2014). V rámci regulace stresové odpovědi mohou ROS interagovat s dalšími signálními molekulami např. s NO, což je další volný radikál produkovaný v odpovědi na TS. Stejně jako ROS je NO vysoce reaktivní a schopný posttranslačně modifikovat proteiny a to prostřednictvím např. S-nitrosylace. Tato modifikace může regulovat stabilitu, subcelulární lokalizaci a aktivitu cílových proteinů, což může vést ke změnám v genové expresi (Tada *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2016). Při působení TS rostliny akumulují také H₂S, který je produkován enzymy L-cysteindesulphhydrasou a D-cysteindesulphhydrasou, jejichž aktivity mohou být působením TS regulovány (Chen *et al.*, 2016). Předpokládá se, že H₂S reguluje odpovědi na stres prostřednictvím NO a ROS signalizace a je taktéž zahrnutý ve vývoji termotolerance rostlin (Hancock a Whiteman, 2016). Dále mohou vysoké teploty způsobit nesprávné skládání a denaturaci proteinů. Špatně složené proteiny jsou vysoce toxické, protože mohou vytvářet agregáty a bránit tak normálním buněčným aktivitám. Důsledkem je zvýšená produkce specifických proteinů zvaných heat shock proteiny (Hsp), které pomáhají znovu proteiny složit. Pokud tyto proteiny nejsou složeny, jsou podrobeny degradaci pomocí ubiquitin-proteazomového systému nebo autofágie (Sugio *et al.*, 2009; Amm *et al.*, 2014).

2.1.1 Reaktivní formy dusíku

Rostliny jsou během svého života vystaveny mnoha stresovým podmínkám, na které se musí adaptovat pro své přežití. Za účelem tvorby příslušné odpovědi na stres dochází k přenosu stresového signálu v buňkách prostřednictvím ROS a RNS. Mezi RNS řadíme radikál NO a molekuly od něj odvozené, jako např. peroxydusitan (ONOO⁻), vyšší oxidy dusíku (N₂O₃, N₂O₄, NO₂) a S-nitrosothioly (RSNO). Přeměny RNS jsou znázorněny na Obr. 1. Obecně hrají RNS důležitou roli v mnoha fyziologických procesech v živočišných a rostlinných buňkách. (Corpas *et al.*, 2007a; Umbreen *et al.*, 2018).

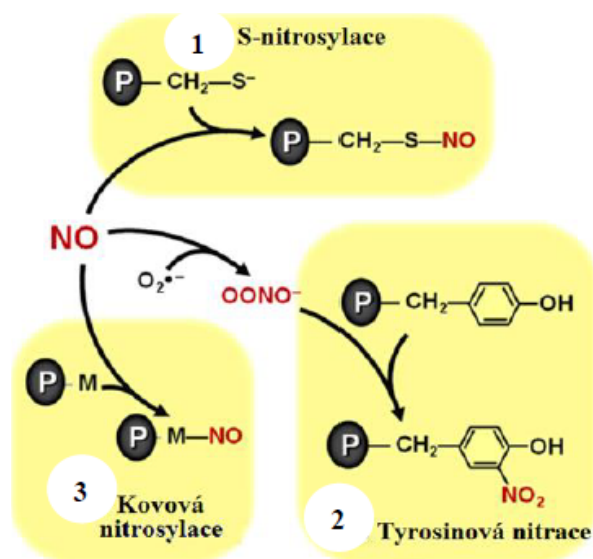
RSNO, zejména S-nitrosoglutathion (GSNO), mají důležitou roli v biochemii NO. GSNO je využíván v živém organismu jako zásobní a transportní molekula NO. V této souvislosti je proces S-transnitrosace považován za hlavní mechanismus biologických účinků RSNO (Singh *et al.*, 1996). V důsledku toho se RSNO mohou podílet na posttranslačních změnách buněčné signalizace za fyziologických i fytopatologických podmínek. U rostlin vystavených stresovým podmínkám je znám termín oxidační stres popisující buněčné poškození způsobené nadprodukcí ROS a termín nitrosační stres popisuje podobné procesy způsobené RNS. Za specifické situace může rostlina nitrosačnímu stresu podlehnout, neboť dochází k nekontrolovatelné syntéze NO a produktů odvozených od NO, což může působit toxicky na celou rostlinu. Ze studií je považován jako spolehlivý marker, který značí indukci nitrosačního stresu, nárůst tyrosinové nitrace proteinů (Corpas *et al.*, 2008a).



Obr. 1 Schematické znázornění přeměny reaktivních forem dusíku (RNS) (převzato z Tharmalingam *et al.*, 2017).

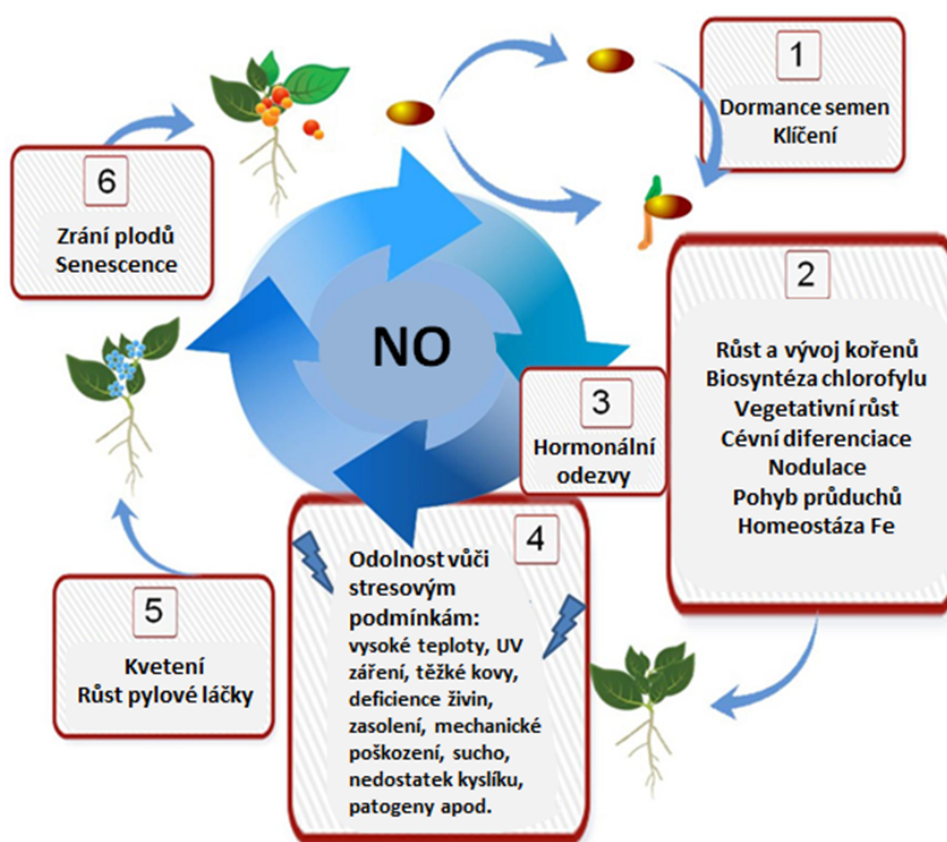
2.1.1.1 Oxid dusnatý

NO je plynný volný radikál s relativně krátkou životností *in vivo* (méně než 10 s). Jedná se o lipofilní radikál se schopností volné difundace přes buněčné membrány a stejně tak přes cytoplasmu. Přítomnost nepárového elektronu zajišťuje jeho vysokou reaktivitu. NO může reagovat s kyslíkem či kyslíkovými radikály v jejich oxidované nebo redukované formě za vzniku reaktivních derivátů (Brown, 2007). Interaguje také s širokou škálou biomolekul, jako jsou proteiny, lipidy či nukleové kyseliny, což může vést k přechodné či trvalé modifikaci jejich aktivity a/nebo funkce v biologických systémech. NO může reagovat s glutathionem (GSH) za vzniku stabilnějšího GSNO, který je považován za hlavní buněčný rezervoár NO (Stamler *et al.*, 1992; Gow a Ischiropoulos, 2001). NO je schopný generovat několik forem dusíku souhrnně označovaných jako RNS. Další vlastností NO nebo molekul od něj odvozených je jejich přímá či nepřímá účast na posttranslačních modifikacích (PTM) (Obr. 2), kam patří vazba na přechodné kovy, S-nitrosylace thiolových skupin či nitrace tyrosinu proteinů, které mohou být zapojeny v buněčné signalizaci za fyziologických nebo stresových podmínek. PTM cílových proteinů vyvolávají změny v jejich aktivitách a funkcích v buňce, což nakonec vede k přenosu signálu NO do odpovědi rostliny (Radi, 2004; Fancy *et al.*, 2017).



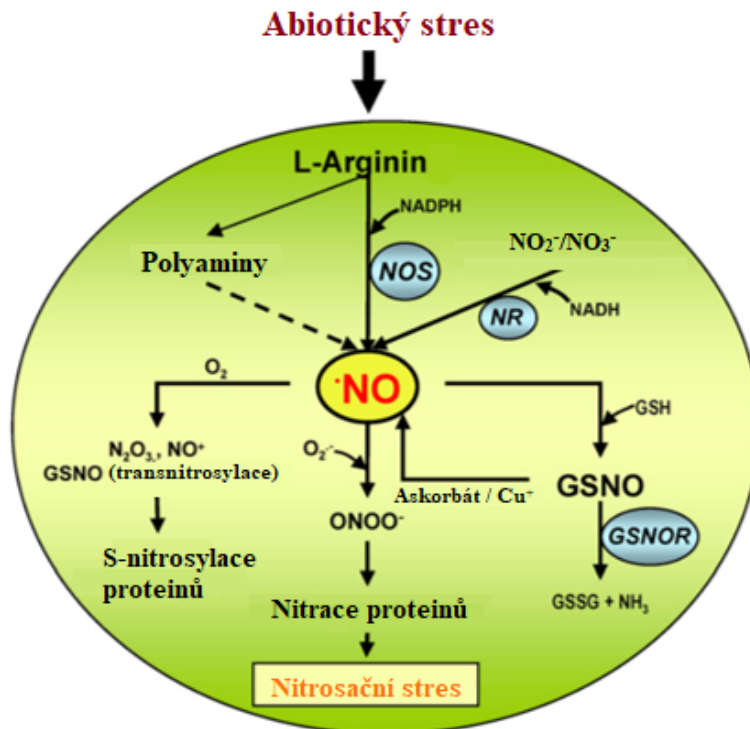
Obr. 2 Posttranslační modifikace zprostředkované oxidem dusnatým (NO). (1) S-nitrosylace cysteinových zbytků. (2) Nitrace tyrosinových zbytků. (3) Nitrosylace kovů (převzato z Freschi, 2013).

NO funguje jako signální molekula, která reguluje metabolismus, fyziologii, vývoj a reprodukci rostlin. NO má vliv např. na dormanci a klíčení semen, růst pylové láčky a kořenů. Působí jako negativní regulátor senescence listů, indukce kvetení a zrání ovoce. Kromě toho je NO klíčovou signální molekulou podílející se na obraně rostlin proti různým stresům, způsobených zejména abiotickými faktory či invazí patogenů. NO je důležitou součástí v toleranci rostlin vůči závažným abiotickým stresům působícím z okolního prostředí, jako je sucho, salinita, těžké kovy, nedostatek živin, extrémní teploty, ozon či UV záření (Obr. 3). Jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti NO mohou vysvětlit jeho pleiotropní účinky na biologické systémy (Yu *et al.*, 2014).



Obr. 3 Role oxidu dusnatého (NO) u rostlin. NO se účastní řady vývojových procesů u rostlin prostřednictvím interakce s fytohormony, reaktivními formami kyslíku, Ca^{2+} a posttranslačních modifikací proteinů. Na obrázku je uveden rozsáhlý vliv NO na širokou škálu fyziologických pochodů rostlin a obranné mechanismy při působení stresových faktorů (převzato a upraveno dle Simontacchi *et al.*, 2015).

I když je významná role NO v rostlinách jednoznačně potvrzena, stále nelze přesně určit, který z endogenních zdrojů NO je zapojen do daného fyziologického či stresového procesu. Endogenní koncentrace NO je určena rovnováhou mezi rychlostí syntézy a degradace NO. Na Obr. 4 je schematicky znázorněn metabolismus NO v rostlinné buňce za působení abiotického stresu. Rostliny mohou generovat NO enzymovými či neenzymovými drahami (Wilson *et al.*, 2008; Astier *et al.*, 2018).



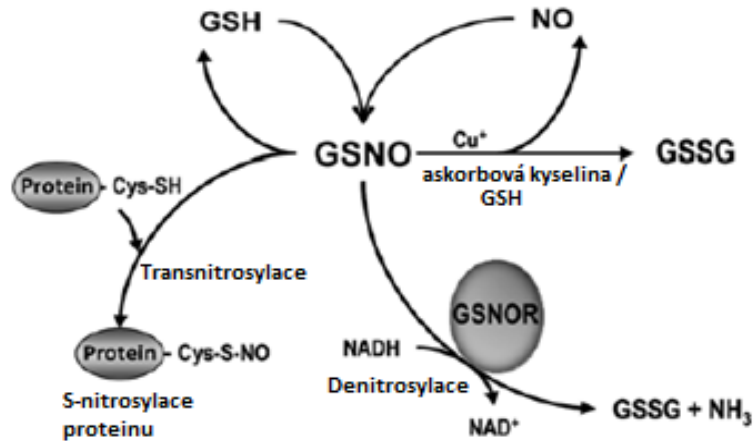
Obr. 4 Metabolismus oxidu dusnatého (NO) v rostlinných buňkách za abiotických stresových podmínek. GSNOR – S-nitrosoglutathionreduktasa; NO⁺ - nitrosylový kationt; NOS – L-Arginin-dependentní aktivita NO-synthasy (pozn. odpovídající protein a gen nebyl dosud identifikován); NR – nitrátoreduktasa (převzato a upraveno z Corpas *et al.*, 2011).

U živočišných systémů je dobře známo, že rodina enzymů NO-synthasy (NOS, EC 1.14.13.39) představuje hlavní systém odpovědný za syntézu NO. Enzym NOS používá NADPH jako donor elektronů a molekulární kyslík na katalýzu oxidace dusíku z aminokyseliny L-Arg za vzniku L-citrulinu a NO (Alderton *et al.*, 2001). Ačkoli byla aktivita enzymu podobnému NOS detekována v několika rostlinných pletivech a druzích (určeno z oxidace L-Arg na L-citrulin a citlivosti na savčí NOS inhibitory), u vyšších rostlin nebyly doposud identifikovány žádné homology živočišné NOS (Corpas *et al.*, 2009; Salgado *et al.*, 2017). Další mechanismus syntézy NO v rostlinách je zprostředkován enzymem nitrátreduktasou (NR, EC 1.7.7.2). Ačkoli primární aktivitou NR je NAD(P)H-dependentní redukce dusičnanů na dusitany, bylo prokázáno, že NR může katalyzovat také redukci dusitanů na NO (Yamasaki a Sakihama, 2000). Bylo zjištěno, že NO regulující např. uzavírání stomat, vývoj kořenů, reakce na osmotický stres, akumulaci flavonoidů či obranu proti patogenům, pochází právě z katalýzy NR (Gupta *et al.*, 2011). Je odhadováno, že proces redukce dusitanů za katalýzy NR probíhá pouze při nízké koncentraci kyslíku, nízkém pH a vysoké hladině dusitanů (Planchet *et al.*, 2005). Takové podmínky se mohou tvořit např. při klíčení semen či zaplavení kořenů (Borisjuk *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2013). Dále je známa neenzymová redukce dusitanů v kyselém prostředí za vzniku NO. Dusitany lze redukovat také kyselinou askorbovou (ASH) při pH 3-6 za vzniku NO a kyseliny dehydroaskorbové (DHA). Dále lze dusitany redukovat prostřednictvím karotenoidů za přítomnosti světla (Wojtaszek, 2000). Kromě toho byl popsán výskyt biosyntetických drah produkujících NO z polyaminů a hydroxylaminů (Tun *et al.*, 2006; Rumer *et al.*, 2009). Vzniklý NO může reagovat s redukovaným GSH v přítomnosti kyslíku za vzniku GSNO. Tento metabolit může být redukován enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR, EC 1.1.1.284) za přítomnosti NADH na oxidovaný GSH (GSSG) a NH₃. GSNO může být také rozložen v přítomnosti redukujících látek, jako je GSH nebo ASH a Cu⁺ (Smith a Dasgupta, 2000). NO může reagovat také s thiolovou skupinou cysteinových residuí proteinů v procesu S-nitrosylace a měnit tak jejich funkci. Tato kovalentní modifikace není přímou reakcí a mohla by být zprostředkována za aerobních podmínek tvorbou N₂O₃, nitrosylového kationtu (NO⁺), či GSNO v procesu transnitrosylace (Wang *et al.*, 2006). NO může mimo jiné reagovat se superoxidovým radikálem (O₂⁻) za vzniku ONOO⁻, což je silný oxidant, který může zprostředkovat tyrosinovou nitraci proteinů. Tato PTM spočívá v adici -NO₂ skupiny na aromatické jádro tyrosinu (Radi, 2004). Za stresových podmínek lze očekávat

zvýšení počtu nitrovaných proteinů, což lze považovat za indikátor nitrosačního stresu u rostlin (Corpas *et al.*, 2007b).

2.1.1.2 Nitrosační stres a jeho regulace v reakci na teplotní stres

V důsledku abiotických stresových podmínek dochází ke zvýšení hladiny ROS a následně k oxidačnímu stresu a stejně tak dochází ke zvýšení koncentrace NO a následně ke stresu nitrosačnímu (Corpas a Barroso, 2013), který je doprovázen proteinovou S-nitrosylací, která je v reakci na stres klíčová (Fancy *et al.*, 2017). Molekula NO má velmi krátkou životnost a proto je její úloha zprostředkována stabilnějšími RSNO, které mohou NO transportovat a vykonávat PTM proteinů vedoucí ke změně jejich aktivity, lokalizace či interakce s jinými proteiny. Stav proteinové S-nitrosylace je řízen dvěma klíčovými mechanismy: přímou denitrosylací prostřednictvím systému thioredoxin (Trx)/thioredoxinreduktasa (TrxR, EC 1.6.4.5) a nepřímou cestou prostřednictvím enzymu GSNOR. Tyto všudypřítomné a fyziologicky nejdůležitější denitrosylasy brání nadměrné akumulaci RSNO a jejich negativním dopadům na rostlinu za fyziologických i stresových podmínek (Hess a Stamler, 2012). Ačkoli jsou GSNOR a TrxR funkčně podobné, fungují odlišnými mechanismy. Za velmi důležitý nízkomolekulární a nejhojnější RSNO v rostlině je považován GSNO, který dle potřeby buňky může NO uvolnit nebo v procesu transnitrosace přenést na jinou thiolovou skupinu (Martínez-Ruiz a Lamas, 2004). Hladina GSNO je kontrolována denitrosylačními reakcemi, kde hraje klíčovou roli GSNOR (Obr. 5). U rostlin byla prokázána úloha GSNOR jako hlavního regulátoru růstu a vývoje rostliny a odpovědi na abiotický/biotický stres (Leterrier *et al.*, 2011). GSNOR udržuje transnitrosační rovnováhu mezi GSNO a S-nitrosylovanými proteiny a tudíž se účastní homeostázy NO v buňce. (Benhar *et al.*, 2009).



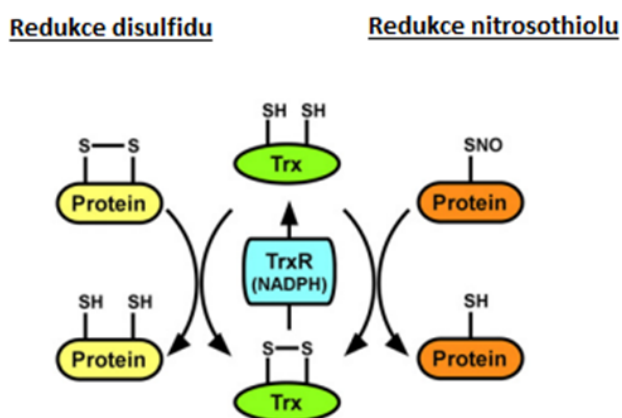
Obr. 5 Schématické znázornění metabolismu S-nitrosoglutathionu (GSNO) v rostlinných buňkách a jeho regulace prostřednictvím enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR). Oxid dusnatý (NO) reaguje s glutathionem (GSH) v přítomnosti kyslíku za vzniku GSNO. V procesu NADH-dependentní denitrosylace může být GSNO přeměněn za katalýzy GSNOR na oxidovaný glutathion (GSSG) a NH_3 . Alternativní cestou je přeměna GSNO v přítomnosti redukujících látek, jako je glutathion či kyselina askorbová a Cu^+ , zpět na NO a GSSG. V procesu transnitrosylace může GSNO převést NO na cysteinové residuum proteinů (S-nitrosylace proteinů). Tato posttranslační modifikace může modulovat funkci celé řady proteinů (převzato a upraveno z Leterrier *et al.*, 2011).

Enzym GSNOR byl dříve charakterizován jako S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284), známá také jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.1), která katalyzuje přeměnu S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGS), spontánního aduktu GSH a formaldehydu, na S-formylglutathion v rámci detoxifikační dráhy formaldehydu (Koivusalo *et al.*, 1989). Nicméně označení tohoto enzymu jako GSNOR bylo široce přijímáno kvůli fyziologicky významnější NADH-dependentní redukci GSNO na GSSG a NH_3 (Jensen *et al.*, 1998). Na základě struktury je GSNOR zařazen do rodiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3; EC 1.1.1.1) (Staab *et al.*, 2008). Rostlinné GSNOR jsou proteiny neobvykle bohaté na Cys, jsou lokalizovány v cytosolu, ačkoli některé důkazy naznačují jejich přítomnost také v peroxisomech (Xu *et al.*, 2013).

Aktivitu GSNOR lze určit jako množství spotřebovaného NADH při redukci substrátu GSNO za současného poklesu absorbance při 340 nm, zatímco v dehydrogenasovém módu při oxidaci HMGS dochází naopak při této vlnové délce ke zvýšení absorbance. Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE), pomocí které lze dosáhnout účinné separace proteinů vzorku za nedenaturačních podmínek, může být využita

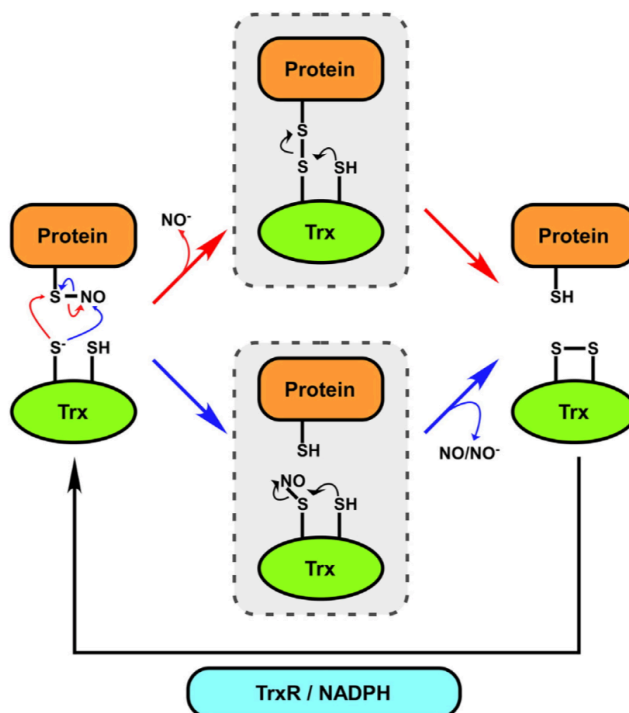
k detekci enzymové aktivity GSNOR a analýze příslušných izoenzymů v rostlinných extraktech. Aktivitu GSNOR lze v gelu pozorovat dle poklesu fluorescence v důsledku oxidace NADH (Corpas *et al.*, 2008b).

Dalším klíčovým mechanismem regulující intracelulární hladinu S-nitrosylovaných proteinů je přímá denitrosylace prostřednictvím systému Trx/TrxR, který se skládá z proteinů Trx, TrxR a NADPH. Systém hraje klíčovou roli v buněčné redoxní homeostáze a signalizaci. Trx jsou známé díky své funkci jako proteinové disulfidreduktasy, kdy dochází k redukci oxidované formy disulfidu. Běžně je Trx udržován v aktivní formě díky selenoenzymu TrxR, který redukuje oxidovanou formu Trx s využitím NADPH jako donoru elektronů (Obr. 6). Členové Trx a TrxR proteinových rodin vykazují odlišnou buněčně-specifickou expresi, regulaci a subcelulární lokalizaci (Lee *et al.*, 2013).



Obr. 6 Role thioredoxinu (Trx) jako disulfidu a nitrosothiolreduktasy. Trx redukuje disulfidovou a nitrosothiolovou skupinu proteinů pomocí dithiolové skupiny za vzniku volné -SH skupiny. Při reakci dochází k oxidaci Trx, který je zpět redukován pomocí seleno-flavoproteinu thioredoxinreduktasy (TrxR) a kofaktoru NADPH (převzato a upraveno z Benhar, 2015).

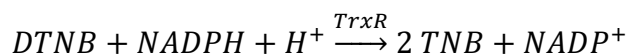
Členové Trx rodiny proteinů obsahují konzervovaný Cys-X-X-Cys motiv aktivního místa. Tyto dva Cys jsou označovány jako katalytické Cys hrající příslušnou roli v redukci disulfidů (Lillig a Holmgren, 2007). Tento dithiolový motiv je také nezbytný pro RSNO reduktasovou aktivitu Trx (Benhar *et al.*, 2008). Některé studie naznačují reakční mechanismus denitrosylace, při kterém se nejdříve mezi Trx a RSNO vytvoří přechodný směsný disulfid (červené šipky), naopak v jiných studiích existují důkazy o mechanismu trans-denitrosylace nezahrnující tvorbu směsného disulfidu (modré šipky) (Kneeshaw *et al.*, 2014) (Obr. 7). Nicméně dřívější reakční mechanismus byl podpořen nedávnou proteomickou studií S-nitrosylace/denitrosylace (Ben-Lulu *et al.*, 2014). Jak je znázorněno na Obr. 7, reakční dráhu denitrosylace určuje, zda v prvním kroku Trx nukleofilně atakuje RSNO na atomu síry nebo dusíku. Pokud atakuje síru, dochází k tvorbě směsného disulfidového komplexu za současného uvolňování nitrosylového iontu (NO^-), zatímco při ataku dusíku dochází k trans-denitrosylačnímu procesu, který je následován uvolněním NO či NO^- . Lze říci, že výsledná reakční dráha může záviset na geometrii a elektronové struktuře skupiny S-NO, pravděpodobně ovlivněné konkrétním prostředím proteinu (Talipov a Timerghazin, 2013). Otázkou zůstává, zda je reakční mechanismus ovlivněn také strukturními prvky v blízkosti aktivního místa konkrétního Trx. Další otázkou zůstává, zda lze Trx považovat za potenciální generátor NO a NO^- a jaké to má důsledky pro redoxní thiolové a hemové reakce (Fukuto *et al.*, 2013).



Obr. 7 Dva navržené mechanismy denitrosylace proteinů zprostředkované thioredoxinem (Trx). Červené šipky: Tvorba intermolekulárního disulfidového meziproduktu, ve kterém je Trx kovalentně vázán s proteinem díky disulfidového můstku. Modré šipky: Trans-denitrosylace, ve které je Trx přechodně S-nitrosylován (převzato a upraveno z Benhar, 2015).

Aktivitu TrxR *in vitro* lze změřit pomocí metody, která je založena na redukci substrátu 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoové) kyseliny (DTNB) za katalýzy TrxR a současné oxidace kofaktoru NADPH. Při reakci vzniká žlutý produkt 5-thionitrobenzoová kyselina (TNB), který je změřen spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm. (Holmgren a Bjornstedt, 1995).

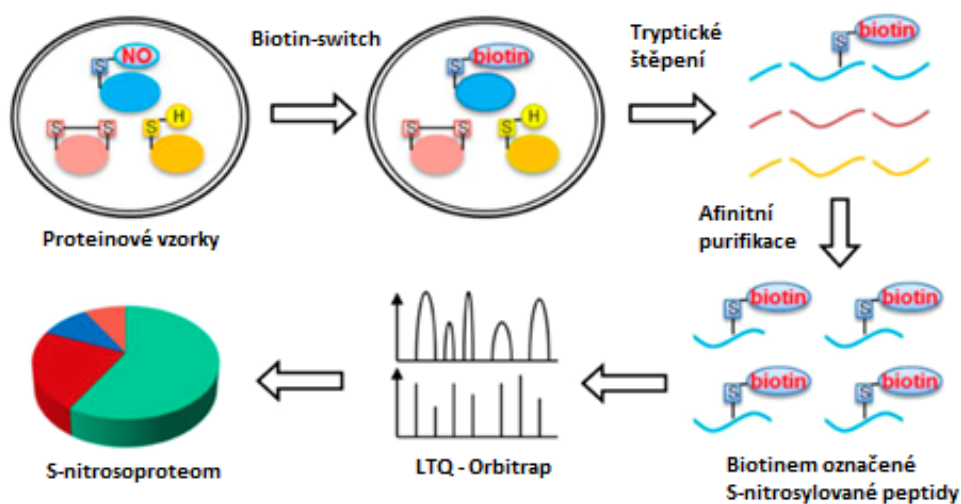
Reakci lze zjednodušeně popsat touto rovnicí:



2.1.1.3 S-nitrosylace proteinů souvisejících s regulací odpovědi na stres

Molekula NO je známa jako klíčová signální molekula, ale jsou méně známé mechanismy jejího působení v regulaci různých buněčných procesů odehrávajících se v rostlinách, které jsou stále předmětem studií. Mezi hlavní regulační mechanismy využívající NO patří PTM zvaná S-nitrosylace, díky které může být ovlivněna funkce proteinů. Prostřednictvím S-nitrosylace je regulována funkce modifikovaných proteinů různými mechanismy, včetně enzymové aktivity, stability, subcelulární lokalizace, 3D struktury,

protein-protein interakce a vazby ligandů (Hess a Stamler, 2012). Jedná se o reverzibilní a specifickou PTM, při které dochází ke kovalentní vazbě NO na thiolovou skupinu cysteinového residua proteinu za vzniku RSNO. Vzniklé RSNO jsou za fyziologických podmínek velmi nestabilní molekuly snadno podléhající neenzymové degradaci v přítomnosti redukcujících činidel (např. GSH, ASH). Jejich labilita v reakci na redoxní stav buňky vypovídá o vysoce citlivém mechanismu v regulaci buněčné signalizace (Stamler *et al.*, 2001). Zároveň jsou regulovány enzymovými procesy (prostřednictvím GSNOR či TrxR). Na stabilitu RSNO v roztoku mají vliv různé faktory, jako jsou světlo, pH, teplota, nebo přítomnost kyslíku či přechodných kovů (zvláště Cu) (Stamler a Toone, 2002). Studium S-nitrosylovaných proteinů je ztíženo nedostatkem konzervovaných shodných motivů obklopující nitrosylované cysteinové residuum. Z těchto důvodů je studium této PTM velmi obtížné a technicky náročné. V současné době je jejich analýza založena hlavně na metodě biotin-switch a následně hmotnostní spektrometrii (MS) (Hao *et al.*, 2006). Metoda biotin-switch spočívá ve značení specifických S-nitrosylovaných cysteinových residuí pomocí biotinu (Jaffrey *et al.*, 2001). Biotinylované proteiny mohou být poté vizualizovány pomocí imunoblottingu využívající anti-biotin protilátku. Biotinem označené proteiny jsou purifikovány pomocí afinitní chromatografie a separovány pomocí SDS-PAGE. Vzorky obsahující SNO proteiny jsou poté analyzovány MS (Obr. 8).



Obr. 8 Schématické znázornění postupu S-nitrosoproteomické analýzy. (převzato a upraveno dle Hu *et al.*, 2015)

Dnes již existuje několik proteomických studií identifikující řadu rostlinných S-nitrosylovaných proteinů v pletivech, buněčných suspenzích nebo izolovaných organelách. Nicméně kvůli labilní povaze RSNO se tyto informace týkají hlavně rostlinných materiálů ošetřených NO donory (např. GSNO). Naproti tomu pouze několik studií identifikovalo proteiny podléhající S-nitrosylaci ve fyziologických podmínkách (Fares *et al.*, 2011). Tato PTM je zapojena do kontroly řady procesů v rostlině, jako je buněčná stavba, fotosyntéza, zpracování genetické informace, ochrana před oxidačním stresem, obranné odpovědi na biotický/abiotický stres či hormonální signalizace (Romero-Puertas *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2015).

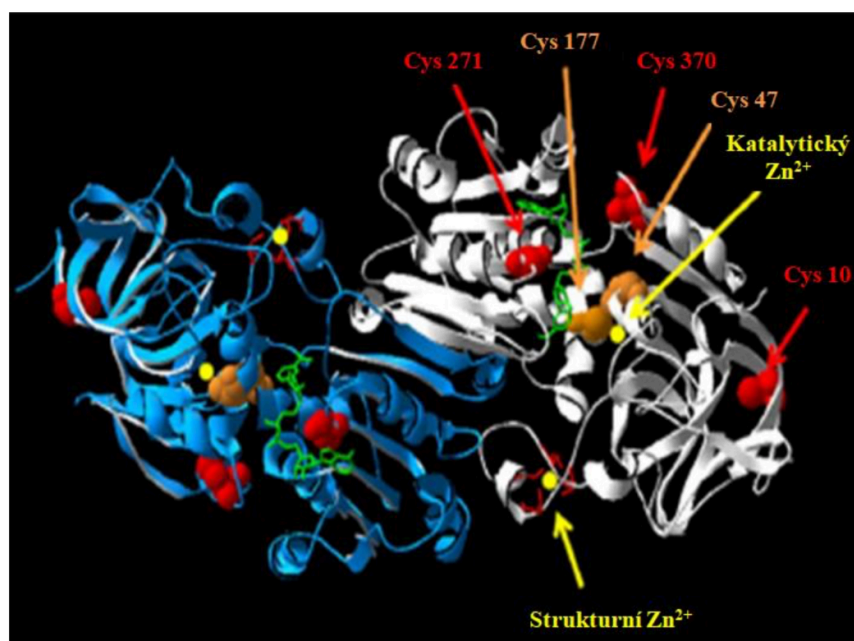
Mnoho proteinů, u nichž byla dokázána v rámci regulace změna jejich funkce prostřednictvím S-nitrosylace, souvisí také s odpověďmi na TS. Patří sem např. heat shock signální proteiny (Ca²⁺-dependentní proteinkinasy (CDPK2, CDPK4, CDPK26), Hsp (Hsp70, Hsp90, Hsp91, Hsp88 a Hsp60) a enzymy regulující buněčnou redoxní rovnováhu (katalasa (CAT, EC 1.11.1.6), askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11), monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR, EC 1.6.5.4), dehydroaskorbátreduktasa (DHAR, EC 1.8.5.1), superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), glutathionperoxidasa (GSHPX, EC 1.11.1.9) a glutathion-S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18)) (Hu *et al.*, 2015).

Ve studii Yun (2011) byla identifikována S-nitrosylace NADPH oxidasy (EC 1.6.3.1) v pozici Cys890, což vedlo k inhibici produkce ROS. Tento Cys je evolučně konzervovaný a specificky S-nitrosylovaný také u lidské NADPH oxidasy, což naznačuje, že tato modifikace může řídit imunitní odpověď jak u rostlinných, tak u živočišných systémů. V další studii Begara-Morales (2014) byl analyzován dopad ONOO⁻ a GSNO na cytosolickou APX u hrachu setého. Byl zjištěn antagonistický účinek použitých sloučenin. Zatímco při použití ONOO⁻ došlo k inhibici aktivity APX, při použití GSNO byla naopak aktivita zvýšena. MS analýza odhalila nitraci APX v pozici Tyr5 a Tyr235. S-nitrosylace byla identifikována v pozici Cys32, který se nachází v místě vázající ASH. S-nitrosylace enzymu APX byla prokázána také v práci Fares (2011), kde byl studován salinitní stres u hrachu setého. Z těchto studií lze vyvodit, že při regulaci stresových reakcí a vývoje rostlin dochází k interakci metabolismu ROS a NO.

Dále ve studii Puyaubert (2014) byly použity semenáčky *Arabidopsis* stresované chladem. Bylo identifikováno celkem 42 S-NO proteinů, z nichž 11 vykazovalo přibližně 2x vyšší úroveň S-nitrosylace oproti nestresovaným rostlinám. Byly identifikovány 3 S-NO proteiny podílející se na fotorespiraci, jako jsou

alaninglyoxylátaminotransferasa, glycindekarboxylasa a glycerátdehydrogenasa. Kromě toho byly identifikovány 2 antioxidační S-NO proteiny, a to DHAR a CAT. S-nitrosylace těchto proteinů byla identifikována i v hrachu setém (Ortega-Galisteo *et al.*, 2012). Zde je u CAT identifikován jeden Cys-NO navíc. Dále byla identifikována S-nitrosylace u enzymu SOD, v důsledku které došlo k aktivaci enzymu. Výsledky naznačují další důkaz účasti této PTM na regulaci hladiny H₂O₂ prostřednictvím regulace antioxidační kapacity buněk. Různorodá lokalizace S-NO proteinů (např. v chloroplastech, mitochondriích, peroxisomech) naznačuje, že biologická aktivita NO je dosažena prostřednictvím NO produkce v těchto různých buněčných kompartmentech a/nebo difúzí NO. Z výsledků výskytu S-NO proteinů také u nestresovaných rostlin vyplývá, že se NO v rostlině účastní regulace i základních fyziologických procesů (Puyaubert *et al.*, 2014).

S-nitrosylace byla potvrzena také u GSNOR *Arabidopsis* (*in vivo* i *in vitro*), kdy po inkubaci s donorem NO došlo k inhibici aktivity GSNOR (Frunghillo *et al.*, 2014). Také ve studii Guerra (2016) identifikovali inhibici enzymové aktivity GSNOR prostřednictvím S-nitrosylace u *Arabidopsis* po inkubaci s donorem NO. Dochází ke konformačním změnám proteinu, které mění tvar dutiny vázající substrát a taktéž dochází k interakci monomerů GSNOR v rámci stejného dimeru. Tato regulace GSNOR není však zcela jasná, neboť její oxidovaná forma je velmi citlivá na změny intracelulárního redoxního stavu (Luebke a Giedroc, 2015). Z proteomické analýzy byla identifikována S-nitrosylace v pozici Cys10, Cys271 a Cys370 (Lindermayr, 2018) (Obr. 9). Aktivita GSNOR je inhibována také oxidační modifikací v místě Cys47, Cys177 a Cys271, což je uvedeno v práci Kovacs (2016) u *Arabidopsis* inkubované s H₂O₂ (*in vivo* a *in vitro*).



Obr. 9 Struktura enzymu S-nitrosogluthathionreduktasy v *Arabidopsis thaliana* (AtGSNOR) (kód v PDB: 3UKO). Enzym se skládá z dvou podjednotek homodimeru (znázorněny modře a šedě). Cysteinová residua, u kterých dochází k S-nitrosylaci (červená) a oxidaci (oranžová) jsou uvedena. Zeleně je označen kofaktor NAD⁺ a žlutě je znázorněn katalytický a strukturní zinek (převzato a upraveno z Lindermayr, 2018).

V další studii Ortega-Galisteo (2012) studovali vliv abiotického stresu na úroveň nitrosylace v peroxisomech u hrachu setého. Pomocí proteomických metod identifikovali 6 peroxisomálních proteinů jako cíl S-nitrosylace. Tyto proteiny jsou zapojeny do fotorespirace, β -oxidace a detoxikace ROS. Zaměřili se na změnu funkce vlivem přidavku donoru NO u tří klíčových peroxisomálních proteinů: CAT, glykolát oxidasy a malátdehydrogenasy. Jejich aktivita byla prostřednictvím S-nitrosylace inhibována. Dalšími S-NO proteiny zapojenými do regulace stresových reakcí jsou např. mitogenem aktivovaná proteinkinasa4 (MAPK4) a glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAP-dehydrogenasa) (Hu *et al.*, 2015).

Zvýšená úroveň S-nitrosylace v reakci na chlad byla identifikována také u proteinů zapojených do fotosyntézy (72 %). Dva proteiny jsou zahrnuty v první fázi fotosyntézy: podjednotka PS I a II a β -podjednotka ATP-synthasy. Pět proteinů se účastní Calvinova cyklu, tj. RUBISCO, RUBISCOaktivasa, GAP-dehydrogenasa, fruktosabisfosfátaldolasa a karboanhydrasa. S-nitrosylace proteinu RUBISCO byla identifikována již dříve, např. v práci Abat (2008) byl prokázán inhibiční účinek GSNO na aktivitu RUBISCO u CAM rostliny kolopejky, nicméně v této studii identifikovali dvě nová Cys-NO místa v malé

podjednotce a tři nová Cys-NO místa ve velké podjednotce (Puyaubert *et al.*, 2014). Chlad způsobil také S-nitrosylaci S-adenosylhomocysteinhydrolasy (SAHH), která katalyzuje reverzibilní hydrolyzu S-adenosylhomocysteinu na adenosin a homocystein. SAHH je zapojen do methioninového cyklu, kde S-adenosylmethionin (SAM) působí jako donor methylu a předchůdce syntézy polyaminů, ethylenu, biotinu a nikotianaminu. SAHH je cílem také nitrace (Chaki *et al.*, 2009). V práci Lindermayr (2006) byla prokázána S-nitrosylační inhibice aktivity methioninadenosyltransferasy, která katalyzuje syntézu SAM. S-nitrosylace je zapojena také do regulace příslušné signalizace fytohormonů, kde dochází k S-nitrosylaci některých klíčových signálních složek auxinové a cytokininové dráhy (Terrile *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2013).

2.1.2 Reaktivní formy kyslíku

ROS jsou velmi reaktivní molekuly, které mohou vznikat z volného radikálu O₂, nebo častěji jako vedlejší produkt různých metabolických drah lokalizované v řadě buněčných kompartmentech. Je známo, že organely, jako jsou chloroplasty, mitochondrie a peroxisomy s vysokou oxidační metabolickou aktivitou nebo s vysokou rychlostí toku elektronů, jsou hlavním zdrojem ROS v rostlinných buňkách. Elektronový transportní řetězec v chloroplastech je hlavním zdrojem elektronů, které mohou reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku ROS (Obr. 10). Odhaduje se, že 1-2 % kyslíku spotřebovaného rostlinami je použito k produkci ROS (Navrot *et al.*, 2007; Bhattacharjee, 2005).

Rovnováha mezi produkcí a degradací ROS může být narušena řadou biotických a abiotických stresových faktorů (salinita, sucho, UV záření, extrémní teploty, těžké kovy, deficiencie živin, napadení patogeny apod.) vedoucí k rychlému zvýšení intracelulárních hladin ROS. Nadměrná akumulace ROS má toxické účinky a způsobuje poškození proteinů, lipidů, sacharidů a DNA vedoucí až k buněčné smrti (Bhattacharjee, 2005). Buněčná odpověď silně závisí na několika faktorech. Subcelulární lokalizace tvorby ROS může být obzvláště důležitá pro vysoce reaktivní formy kyslíku (hROS), protože difundují pouze na velmi krátkou vzdálenost. Škodlivé účinky akumulace ROS, vyvolané působením stresových podmínek, patřící mezi hlavní příčiny celosvětové ztráty produktivity plodin, jsou eliminovány enzymovými antioxidačními systémy zahrnující SOD, CAT, APX, GST, guajakolperoxidasu (GPX, EC 1.11.1.7) a glutathionreduktasu (GR, EC 1.6.4.2) a neenzymovými nízkomolekulárními metabolity, jako jsou ASH, GSH, α -tokoferol, karotenoidy a flavonoidy (Mittler, 2002; Gill a Tuteja, 2011). K neenzymovým antioxidantům lze již zařadit i prolin, který je u mikrobů, zvířat a rostlin potřebný pro potlačení inhibičních účinků ROS (Chen a Dickman, 2005). Tyto zmiňované antioxidanty jsou přítomny téměř ve všech buněčných kompartmentech, což dokazuje důležitost detoxikace ROS pro přežití rostliny. Výsledná povaha ROS, zda budou působit jako škodlivé, ochranné či signalizační faktory, závisí na rovnováze mezi produkcí a degradací ROS v určitém místě a čase. ROS mohou buňky poškodit a stejně tak mohou vyvolat genovou expresi v reakci na určitý signál nebo jsou zahrnuty do drah signální transdukce. ROS jsou proto považovány také za signální molekuly, které aktivují a řídí různé fyziologické a stresem indukované procesy (Gill a Tuteja, 2011; Dalton *et al.*, 1999).

2.1.2.1 Oxidační stres a jeho regulace v reakci na teplotní stres

Každý z abiotických stresů, včetně TS, je spojen s nadprodukcí ROS, která může vést k oxidačnímu poškození buněčných komponentů (Larkindale a Knight, 2002). Fotosyntetizující rostliny jsou obzvláště vystaveny riziku oxidačního poškození vzhledem k obsahu kyslíku, množství fotosenzibilátorů a polynenasycených mastných kyselin v chloroplastech. Za světla jsou chloroplasty a peroxisomy hlavním zdrojem generace ROS, naopak ve tmě jsou to mitochondrie (Foyer a Noctor, 2003). Oxidační poškození zahrnuje narušení membrán lipidickou peroxidací, oxidaci proteinů a poškození nukleových kyselin, což může vést až k programované buněčné smrti (Petrov *et al.*, 2015).

Peroxidace lipidů je považována za nejškodlivější proces vyskytující se v každém organismu. Membránové poškození je někdy bráno jako jediný parametr ke stanovení úrovně destrukce lipidů při působení stresových podmínek na rostlinu. Během procesu lipidické peroxidace dochází k tvorbě malých uhlovodíkových fragmentů zahrnující např. ketony, malondialdehyd (MDA) a sloučeniny od nich odvozené. Některé z těchto sloučenin (nejčastěji MDA) reagují s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) za vzniku barevných produktů (tzv. TBARS), které jsou poté detekovány a identifikovány jako marker přítomnosti lipidické peroxidace (Heath a Packer, 1968). Buněčná i organelová lipidová peroxidace, ke které dochází při nadměrné akumulaci ROS, ovlivňuje normální fungování buněk a také zhoršuje oxidační stres prostřednictvím vzniku lipidových radikálů. Kyselina linolová a kyselina linolenová jsou obzvláště náchylné k napadení ROS, což vede ke vzniku lipidových hydroperoxidů. Důsledkem lipidové peroxidace je snížení fluidity membrán, zvýšení propustnosti membrán a poškození membránových proteinů (Moller *et al.*, 2007).

Oxidace proteinů spočívá v jejich kovalentní modifikaci vyvolané ROS nebo vedlejšími produkty oxidačního stresu. Většina proteinových oxidací je ireverzibilní, pouze některé oxidace aminokyselin obsahující síru jsou reverzibilní (Ghezzi a Bonetto, 2003). Marker oxidace proteinů je proteinová karbonylace, která může mít vliv na aktivitu a funkčnost proteinů a může zvyšovat intenzitu proteolytické degradace (Moller *et al.*, 2007).

Ačkoliv je rostlinný genom velmi stabilní, jeho DNA může být vlivem stresových faktorů poškozena. Nejreaktivnější ROS je OH \cdot , který může poškodit všechny složky DNA a to jak purinové, tak pyrimidinové báze a taktéž deoxyribosovou kostru DNA (Tuteja *et al.*, 2009). Konkrétněji dochází k delecí bází, dimerizaci pyrimidinu, síťování, rozrušení řetězců a modifikaci bází (alkylace, oxidace atd). Důsledkem poškození DNA je snížení proteosyntézy, případně produkce nefunkčních proteinů, což významně ovlivní růst a vývoj celé rostliny (Tuteja *et al.*, 2001).

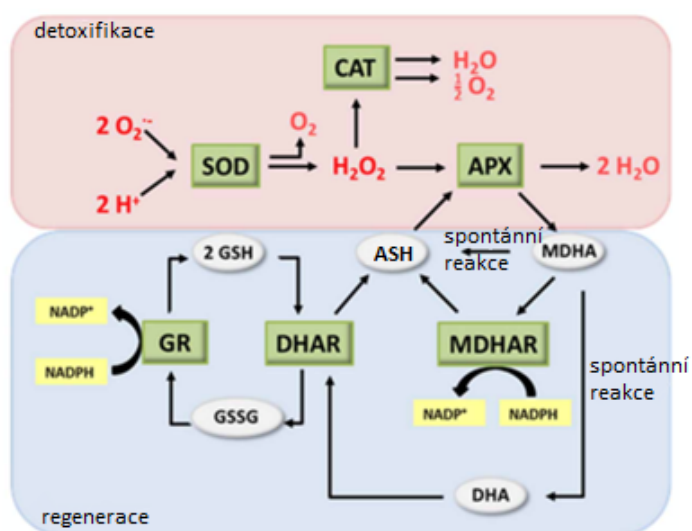
Oxidační stres vyvolaný stresovými podmínkami je regulován řadou obranných antioxidačních systémů zahrnujících jak enzymové, tak neenzymové antioxidanty (Tab. 1).

Tab. 1 Seznam všech enzymových a neenzymových antioxidantů (zkrácené označení enzymu, EC číslo, katalyzovaná reakce/funkce, subcelulární lokalizace). SOD superoxididmutasa, CAT katalasa, APX askorbátperoxidasa, MDHAR monodehydroaskorbátreduktasa. DHAR dehydroaskorbátreduktasa, GR glutathionreduktasa, GPX guajakolperoxidasa, ASH kyselina askorbová, GSH glutathion, DHA dehydroaskorbát, MDHA monodehydroaskorbát, GSSG oxidovaný glutathion, GST glutathion-S-transferasa (převzato z Das a Roychoudhury, 2014).

Enzymové antioxidanty	EC	Katalyzovaná reakce	Subcelulární lokalizace
SOD	1.15.1.1	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$	peroxisomy, mitochondrie, cytosol, chloroplasty
CAT	1.11.1.6	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	peroxisomy, mitochondrie
APX	1.11.1.11	$H_2O_2 + ASH \rightarrow 2H_2O + DHA$	peroxisomy, mitochondrie, cytosol, chloroplasty
MDHAR	1.6.5.4	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow ASH + NAD(P)^+$	mitochondrie, cytoplasma, chloroplasty
DHAR	1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow ASH + GSSG$	mitochondrie, cytoplasma, chloroplasty
GR	1.6.4.2	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$	mitochondrie, cytoplasma, chloroplasty
GPX	1.11.1.7	$H_2O_2 + GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$	mitochondrie, cytoplasma, chloroplasty, ER
Neenzymové antioxidanty		Funkce	Subcelulární lokalizace
ASH		detoxifikace H_2O_2 prostřednictvím APX	cytosol, chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy, vakuola, apoplast
GSH		detoxifikační kosubstrát pro enzymy (peroxidasy, GR, GST)	cytosol, chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy, vakuola, apoplast
α -tokoferol		detoxifikace produktů membránové lipidické peroxidace	membrány
karotenoidy		rozptýlení přebytečné energie z fotosystémů	plastidy
flavonoidy		přímé zachycení H_2O_2 , 1O_2 , OH^{\cdot}	vakuola
prolin		zachycení 1O_2 a OH^{\cdot} ; ochrana proti poškození lipidickou peroxidací	mitochondrie, cytosol, chloroplasty

Mezi nejúčinnější enzymové antioxidanty patří metaloenzym SOD, který je intracelulárně přítomen ve všech aerobních organismech a ve všech subcelulárních kompartmentech náchylných k oxidačnímu stresu. Enzym SOD má významnou úlohu v toleranci rostlin vůči stresu a poskytuje první obranu proti toxickým účinkům vysokých hladin ROS. SOD odstraňuje $O_2^{\cdot-}$ jeho dismutací, přičemž jeden $O_2^{\cdot-}$ je redukován na H_2O_2 a druhý $O_2^{\cdot-}$ je oxidován na O_2 . Odstraněním $O_2^{\cdot-}$ je snižováno riziko vzniku OH \cdot prostřednictvím kovem katalyzované Fentonovy reakce. SOD jsou klasifikovány dle svých kovových kofaktorů do tří tříd: SOD obsahující měď/zinek (Cu/Zn-SOD), mangan (Mn-SOD) nebo železo (Fe-SOD), které jsou lokalizovány v odlišných buněčných kompartmentech. Aktivita izoenzymů může být identifikována na základě jejich odlišné citlivosti na KCN a H_2O_2 . Všechny formy SOD jsou nukleárně kódovány a cíleny do příslušných buněčných kompartmentů pomocí N-koncové sekvence (Mittler, 2002). Dalším enzymovým antioxidantem je enzym CAT, který obsahuje hem a přímo přeměňuje H_2O_2 na H_2O a O_2 a je taktéž při detoxikaci ROS za stresových podmínek u rostlin nepostradatelný. CAT patří z hlediska rychlosti přeměny mezi vysoce účinné enzymy, neboť dokáže přeměnit až 6 mil. molekul H_2O_2 za minutu. Enzym CAT se podílí na odstraňování H_2O_2 vzniklého při β -oxidaci mastných kyselin v peroxisomech, fotorespiraci a purinovém katabolismu (Scandalios *et al.*, 1997). Dalším důležitým mechanismem podílejícím se na odstraňování ROS je askorbát-glutathionový (ASH-GSH) cyklus, ve kterém hrají roli enzymy APX, MDHAR, DHAR a GR. APX se podílí na zachycování H_2O_2 s použitím ASH jako donoru elektronů. APX existuje nejméně v pěti izoformách, včetně thylakoidní a glyoxysomové membránové izoformy, chloroplastové a cytosolické izoformy (Shigeoka *et al.*, 2002). APX má vyšší afinitu k H_2O_2 než CAT a může mít zásadnější roli v regulaci hladiny ROS během stresu. Další peroxidasou rozkládající H_2O_2 je enzym GPX, který jako donor elektronů využívá guajakol (Asada, 1999). Oxidovaná forma ASH je regenerována pomocí enzymů MDHAR, DHAR a GR, čímž je regulován redoxní stav ASH v buňce, který je zásadní pro toleranci rostliny vůči různým abiotickým stresům vedoucím k produkci ROS. MDHAR je FAD enzym, jehož donorem elektronů je NAD(P)H a akceptorem elektronů je MDHA, který je spontánně dismutován nebo enzymově redukován na DHA (Del Rio *et al.*, 2002). DHA může být redukován až na ASH pomocí GSH nebo enzymově pomocí DHAR. GSSG je zpět redukován pomocí NADPH-dependentního enzymu GR na GSH, který je zapojen do mnoha metabolických regulací a antioxidantních procesů v rostlinách (Obr. 12). GR patří mezi flavoproteinové oxidoreduktasy vyskytující se u prokaryot

i eukaryot. GR je lokalizována převážně v chloroplastech, ale malé množství je přítomno také v mitochondriích a cytosolu (Romero-Puertas *et al.*, 2006). Další velkou rodinou podílející se na obraně rostlin vůči oxidačnímu stresu a využívající GSH k redukci H_2O_2 a organických/lipidových hydroperoxidů je GSHPX (Noctor *et al.*, 2002). Velká a rozmanitá skupina enzymů GST katalyzuje konjugaci elektrofilních xenobiotických substrátů s GSH. Je známo, že GST fungují při detoxikaci herbicidů, hormonální homeostázi, tyrosinovém metabolismu, detoxikaci hydroxyperoxidu, regulaci apoptózy a při reakcích na biotické/abiotické stresové podmínky. Obvykle jsou lokalizovány v cytoplasmě, ale byly nalezeny také mikrosomální, plastidové, jaderné a apoplastické izoformy (Dixon *et al.*, 2010).



Obr. 12 Antioxidační obranný systém. ASH askorbát, DHA dehydroaskorbát, SOD superoxid-dismutasa, CAT katalasa, APX askorbátperoxidasa, MDHA monodehydroaskorbát, MDHAR monodehydroaskorbátreduktasa, DHAR dehydroaskorbátreduktasa, GR glutathionreduktasa, GSH redukovaný glutathion; GSSG oxidovaný glutathion (převzato a upraveno z Gross *et al.*, 2013).

Vedle enzymových antioxidantů hrají nepostradatelnou roli v obraně proti oxidačnímu stresu vyvolaném akumulací ROS v rostlinách také neenzymové nízkomolekulární antioxidanty. Mezi nejúčinnější a nejhojněji zastoupené patří ve vodě rozpustný ASH. Svou nepostradatelnou roli má díky schopnosti darovat elektrony v enzymových i neenzymových reakcích, včetně ASH-GSH cyklu. ASH poskytuje ochranu membrán přímým zachycením $O_2^{\cdot-}$ a OH^{\cdot} a regenerací α -tokoferolu z tokoferoxylového radikálu (Smirnoff, 2005). Vyskytuje se ve všech rostlinných pletivech, nejvíce však ve fotosyntetických buňkách a meristémech. Asi 30-40 % celkového ASH je v chloroplastech (ve stromatu až $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrace ASH). Metabolismus ASH probíhá hlavně v mitochondriích, kde je ASH syntetizován L-galaktono- γ -laktondehydrogenasou a je zde také regenerován z oxidovaných forem zpět na redukované formy ASH (Szarka *et al.*, 2007). Dalším důležitým neenzymovým antioxidantem je GSH, což je tripeptid ve složení Glu-Cys-Gly. Je přítomen ve všech buněčných kompartmentech (cytosol, endoplasmatické retikulum, vakuoly, mitochondrie, chloroplasty, peroxisomy, apoplast) a hraje roli v řadě fyziologických procesů včetně regulace transportu síranů, přenosu signálů, konjugace metabolitů, detoxikace xenobiotik a exprese genů v reakci na stres (Mullineaux a Rausch, 2005). GSH se účastní také růstu a vývoje rostliny zahrnující buněčnou diferenciaci, buněčnou smrt, senescenci, rezistenci vůči patogenům a enzymovou regulaci. ATP-dependentní syntéza GSH probíhá za katalýzy glutamátcysteinligasy a následně glutathionsynthetasy. Vzniklý GSH poskytuje substrát pro mnoho buněčných reakcí, během kterých je oxidován na GSSG. Rovnováha mezi GSH a GSSG je klíčová pro udržení buněčného redoxního stavu (Foyer a Noctor, 2005). GSH je potenciální lapač 1O_2 , H_2O_2 a OH^{\cdot} , dále se účastní antioxidačního obranného systému prostřednictvím ASH-GSH cyklu (Foyer a Halliwell, 1976). Při stresových podmínkách (včetně TS) dochází k akumulaci prolinu v cytoplasmě, který je kromě funkce osmolytu považován i za silný antioxidant zmírňující negativní účinky ROS (Chen a Dickman, 2005). Antioxidační funkci plní také α -tokoferol, který je považován za potenciální lapač ROS a lipidových radikálů. Antioxidační účinky plní hlavně v biomembránách a zajišťuje ochranu stability membrán. Je lokalizován v thylakoidní membráně chloroplastů (Hollander-Czytko *et al.*, 2005). Mezi antioxidanty řadíme také karotenoidy, které hrají důležitou fotoprotektivní roli rozptylováním přebytečné energie ve fotosyntetických membránách nebo zachycením ROS a potlačením lipidické peroxidace (Collins, 2001).

2.1.3 Heat-shock proteiny

Molekulární chaperony jsou klíčovou komponentou přispívající k ochraně rostlin obnovením normální konformace proteinů a tím i buněčné homeostázy za optimálních i stresových podmínek. Pro přežití buněk je důležité minimalizovat vliv environmentálních podmínek prostředí na proteom, tzn. snížit množství rozložených, chybně složených proteinů a proteinových agregátů. Chaperony jsou odpovědné za skládání, seskupování, translokaci a degradaci proteinů v mnoha buněčných procesech, stabilizují proteiny a membrány a mohou pomáhat při opětovném skládání proteinů za stresových podmínek (Carey *et al.*, 2006).

Uvádí se, že široká škála proteinů vykazuje chaperonovou aktivitu. Mnoho molekulárních chaperonů jsou stresové proteiny a většina z nich byla původně identifikována jako tzv. heat shock proteiny (Hsp), neboli proteiny tepelného šoku (Lindquist a Craig, 1988). Organismus v reakci na TS indukuje syntézu Hsp. Jedná se o vysoce konzervovaný genetický systém vyskytující se ve všech organismech, od archeobakterií, přes rostliny až k živočichům. Některé z reakcí na TS jsou univerzální, jiné jsou charakteristické pro daný organismus. Univerzální reakcí na zvýšenou teplotu je produkce proteinů typu Hsp70 a Hsp90, které patří mezi nejvíce konzervované proteiny. Indukce Hsp je velmi rychlá a intenzivní a je aktivována při různých teplotách dle druhu organismu s ohledem na jejich přirozené prostředí. Hsp jsou zapojeny v obranných mechanismech v reakci na řadu dalších stresových podnětů, jako je např. chlad, sucho, salinita, UV záření, oxidační stres či infekce patogenem (Swindell *et al.*, 2007). Studium chaperonové sítě slouží pro pochopení obranných reakcí indukovaných různými druhy stresu, neboť u jakéhokoliv stresu je přímým či nepřímým důsledkem denaturace proteinů.

V rámci buňky jsou Hsp lokalizovány v cytoplasmě, jádře, mitochondriích, chloroplastech a ER. Hsp lze řadit do pěti hlavních rodin dle jejich odhadované molekulové hmotnosti, aminokyselinové sekvence a funkce: Hsp70 (DnaK), chaperoniny (GroEL a Hsp60), Hsp90, Hsp100 (Clp) a malé Hsp (sHsp), jejichž molekulová hmotnost, funkce a lokalizace v buňce je přehledně uvedena v Tab. 2. Různé Hsp se vážou na specifické cílové substráty, neváží se však kovalentní vazbou a taktéž nejsou součástí konečného produktu (Vierling, 1991).

Tab. 2 Přehled heat shock proteinů (Hsp), jejich funkce a subcelulární lokalizace. ER endoplasmatické retikulum, sHsp malé heat shock proteiny (převzato a upraveno z Park a Seo, 2015).

Třída	Molekulová hmotnost [kDa]	Předpokládaná funkce	Lokalizace	Zástupce
Hsp100	100-104	skládání proteinů, disagregace	cytosol, mitochondrie, chloroplast	Hsp100, Clp
Hsp90	82-90	translokace proteinů, regulace receptorů, tlumení genových mutací	cytosol, ER, jádro, mitochondrie, chloroplast	Hsp90, Grp94/gp96
Hsp70	68-75	prevence agregace, pomoc při opětovném skládání proteinů	cytosol, ER, jádro, mitochondrie, chloroplast	Hsp70, BiP/Grp78
Hsp60	58-65	skládání proteinů, pomoc při opětovném skládání proteinů	cytosol, mitochondrie, chloroplast	Cpn60, CCT
sHsp	15-30	prevence agregace, ko-chaperon	cytosol, ER, mitochondrie, chloroplast	Hsp20

Chaperony Hsp100 jsou členy velké nadrodiny AAA proteinů neboli ATPas spojených s různými buněčnými aktivitami. Hsp100 tvoří hexamerní kruhy a jsou rozděleny do dvou hlavních tříd. Členové první třídy obsahují dvě domény vázající nukleotidy, zatímco ve druhé třídě mají pouze jednu doménu vázající nukleotidy (Schirmer *et al.*, 1996). Hrají důležitou roli v udržení buněčné homeostázy prostřednictvím disagregace a/nebo degradace nevratně poškozených proteinů, které vznikly jako důsledek denaturace či nesprávného sklození (Kim *et al.*, 2007). V prevenci proti agregaci proteinů spolupracují s Hsp70 (také ATP-dependentní systém). Nejdříve jsou agregované proteiny solubilizovány pomocí Hsp100 a poté jsou tyto proteiny pomocí Hsp70 znovu složeny do původních konformací (Glover a Lindquist, 1998). V rostlinách mají Hsp100 roli také v termotoleranci (Queitsch *et al.*, 2000) a někteří členové Hsp100 zajišťují také biogenezi chloroplastů (Lee *et al.* 2007). Stejně jako u mnoha jiných chaperonů jsou Hsp100 v rostlině exprimovány konstitutivně, ale jejich exprese je vývojově regulována a indukována různými stresovými podmínkami (Queitsch *et al.*, 2000).

Chaperony Hsp90 byly kódovány a sekvencovány z několika evolučně odlišných organismů a je zřejmé, že se jedná o vysoce konzervované proteiny. Byla dokonce identifikována 50% shoda v aminokyselinové sekvenci Hsp90 i u velmi odlišných eukaryot. Zároveň tato eukaryota vykazovala 40% shodu v dané sekvenci s bakterií *E. coli* (Bardwell a Craig, 1987). Z několika rostlinných druhů byly izolovány geny Hsp90 lokalizované v cytosolu, ER a plastidech, přičemž jejich aminokyselinová sekvence je z 63-71 % identická s Hsp90 kvasinek a živočichů (Krishna a Gloor, 2001). Hsp90 patří mezi nejhojnější proteiny, neboť tvoří 1-2 % celkových buněčných proteinů (Krukenberg *et al.*, 2011). Ačkoli jsou konstitutivně exprimovány, jejich exprese se zvyšuje v reakci na stres u prokaryot i eukaryot. Hlavní úlohou Hsp90 je řízení skládání proteinů, dále jsou zahrnuty do přenosu signálů, kontroly buněčného cyklu, přenosu či degradace proteinů (Young *et al.*, 2001). Je taktéž známo, že interagují s proteasomem 26S a hrají důležitou roli v jeho seskupení a integraci. Hsp90 hraje také zásadní roli v rostlinné imunitě. Studie cytosolických Hsp90 odhalily jejich schopnost regulovat aktivitu a stabilitu proteinů spojených s rezistencí (Shirasu, 2009). Pro svou funkci vyžadují ATP a podobně jako Hsp100 fungují i Hsp90 ve spojení s Hsp70 a tvoří hlavní část chaperonových komplexů. Hsp90 jsou od mnoha jiných chaperonů odlišné v tom, že většina substrátů jsou signální transdukční proteiny, jako jsou receptory steroidních hormonů a signální kinasy. Vazebná specifita Hsp90 pro dané substráty je regulována jejich PTM a také interakcemi s různými ko-chaperony, jako např. Hsp40 (homolog DnaJ) (Young *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003).

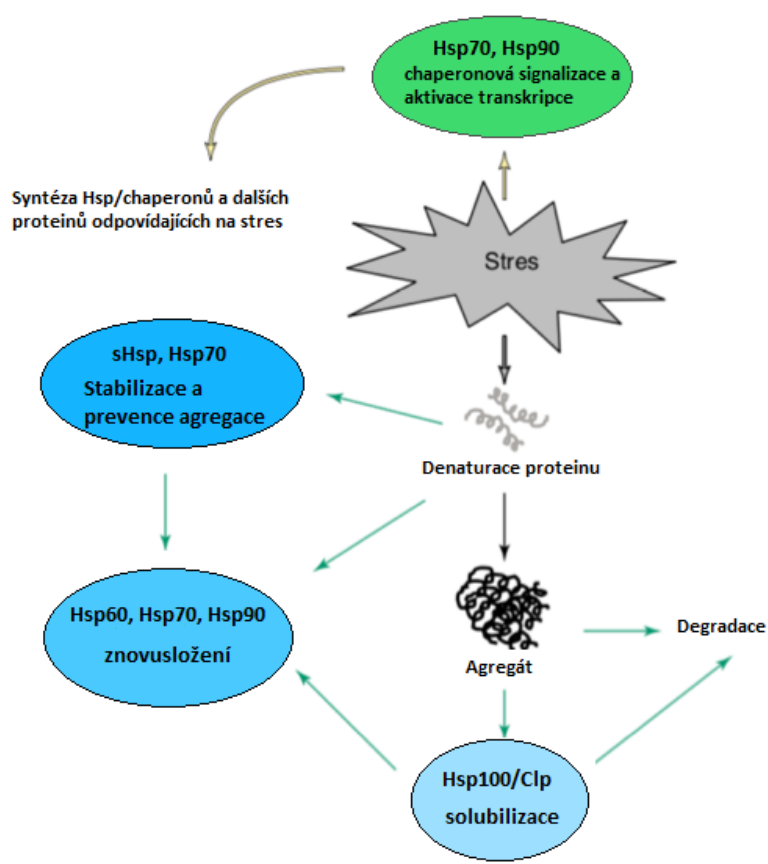
Chaperony Hsp70 jsou považovány za nejvíce konzervované Hsp s 50% identickou aminokyselinovou sekvencí mezi homologem DnaK bakterie *E. coli* a eukaryotickými Hsp70 (Easton *et al.*, 2000). V rostlinách existuje velké množství Hsp70, např. v genomu *Arabidopsis* se nachází 18 Hsp70 (Wang *et al.* 2004). Strukturně se Hsp70 skládá z vysoce konzervované N-koncové domény ATPasy o velikosti 44 kDa a C-koncové peptid-vazebné domény o velikosti 25 kDa. Vazba a uvolnění substrátu je spojeno s aktivitou ATPasy a současně vyžaduje účast ko-chaperonů, jako je např. DnaJ/Hsp40 a GrpE (Bukau a Horwich, 1998). Specifické role jednotlivých proteinů Hsp70 jsou pravděpodobně určeny podle jejich lokalizace v buněčných kompartmentech, rozdílné exprese v různých fázích vývoje nebo jejich interakce se specifickými proteiny spojenými s Hsp70 (Sung *et al.*, 2001). Chaperony Hsp70 pomáhají skládat řadu proteinů téměř ve všech buněčných kompartmentech. Mají základní funkci v prevenci proti agregaci a v napomáhání opětovnému skládání proteinů za normálních i stresových podmínek.

Podílejí se také na importu a translokaci proteinů (zejména v mitochondriích a chloroplastech), dále na usnadnění degradace nestabilních proteinů pomocí lysosomů a proteasomů. Některé typy Hsp70 jsou konstitutivně exprimovány a často se podílejí na skládání de novo syntetizovaných polypeptidů. Ostatní jsou exprimovány pouze při vystavení organismu nepříznivým podmínkám (Hartl, 1996; Frydman, 2001). Kromě toho jsou některé Hsp70 zapojeny také do řízení biologické aktivity regulačních proteinů a mohou působit jako negativní represory transkripce zprostředkované heat shock faktory (Hsf). Interakce mezi Hsp70 a Hsf byla popsána jako negativní regulační mechanismus transkripční aktivace zprostředkované Hsf v reakci na tepelný šok (Morimoto, 1998). Bylo navrženo, že tato interakce brání trimerizaci a vazbě Hsf na elementy teplotního šoku (Hse, heat shock element), čímž blokuje transkripční aktivaci genů tepelného šoku díky jejich Hsf (Kim a Schoffl, 2002). Hsp70 se také podílí na modulaci signálních přenašečů, jako je proteinkinasa A, proteinkinasa C a proteinfosfatasa (Ding *et al.*, 1998). Jsou také důležitými chaperony v reakci na biotický stres (Kanzaki *et al.*, 2003).

Chaperony Hsp60, též nazývané jako chaperoniny, vykazují evoluční homologii s GroEL z *E. coli*. U eukaryot se nachází převážně v mitochondriích a plastidech (Hartl, 1996). Klíčovou rolí Hsp60 je pomáhání řadě de novo syntetizovaným proteinům a translokovaným proteinům dosáhnout jejich nativních forem (Bukau a Horwich, 1998). Jsou důležité také při skládání mnoha chloroplastových a mitochondriálních proteinů, včetně enzymu RUBISCO (Hartl, 1996; Wang *et al.* 2004). Hsp60 působí jako posttranskripční regulátory mnoha proteinů, protože jejich vazba pomáhá zabránit agregaci cílových proteinů. Chaperoniny se dělí na dvě podrodiny: GroE chaperoniny (patřící do skupiny I) nacházející se v bakteriích, mitochondriích a chloroplastech (např. GroE a chCpn60) a CCT chaperoniny (patřící do skupiny II a obsahující t-komplexový polypeptid 1 (TCP1)) nacházející se v Archea (např. spouštěcí faktor 55 a termosomy) a v cytosolu eukaryot (např. TCP-1 kruhový komplex TriC) (Parsell a Lindquist 1993; Ranson *et al.*, 1998).

Hsp40, nebo také DnaJ, jsou ko-chaperony Hsp70 zvyšující jejich afinitu k substrátům (Kampinga a Craig, 2010). Hsp40 obsahuje konzervovanou J-doménu o délce 70 aminokyselin, která interaguje s nukleotid-vazebnou doménou Hsp70. Bylo navrženo, že ko-chaperony Hsp40 společně s Hsp70 fungují jako pozitivní regulátory v imunitě rostlin a jsou zahrnuty v mikrobiální patogenezi, zejména v šíření virů. Bylo také prokázáno, že umlčení Hsp40 zvyšuje náchylnost k mozaikové virové infekci u sóji (Liu a Whitham, 2013).

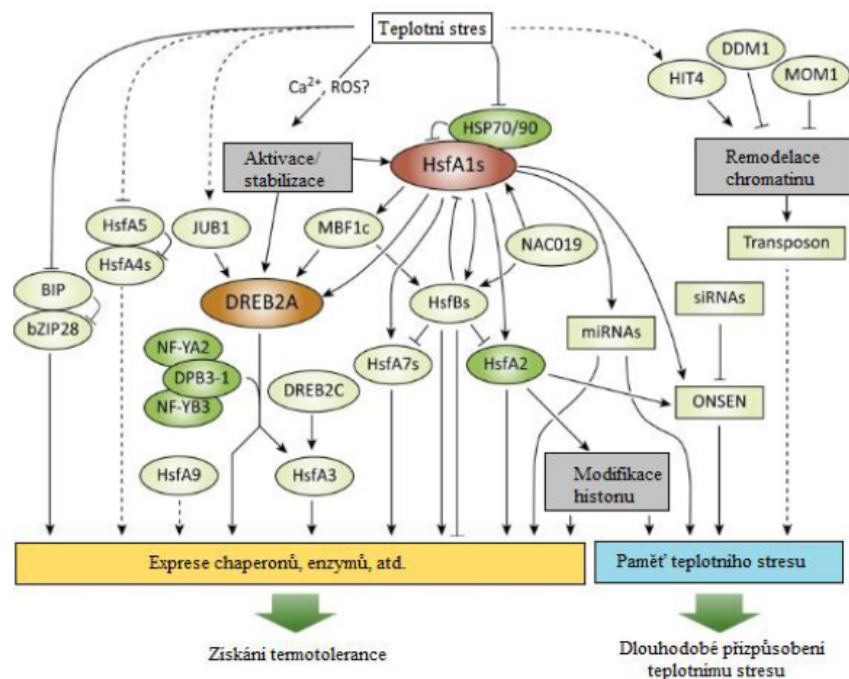
Chaperony sHsp jsou nízkomolekulární Hsp (12-40 kDa), které v rostlinách tvoří velmi rozmanitou a odlišnou rodinu oproti jiným Hsp, co se týče sekvence, lokalizace v buňce a funkce. sHsp jsou syntetizovány v prokaryotických i eukaryotických buňkách v reakci na stresové podmínky a některé sHsp jsou exprimovány během určitých vývojových fází (Waters *et al.*, 1996; Vierling, 1991). Samotné sHsp nejsou schopné opětovně skládat proteiny. Mají schopnost vázat se na denaturované proteiny prostřednictvím hydrofobní interakce, stabilizovat je a předcházet jejich agregaci, čímž umožňují jejich opětovné složení prostřednictvím ATP-dependentních chaperonů, jako je systém Hsp70/Hsp90 (Lee a Vierling, 2000; Mogk *et al.*, 2003; Kotak *et al.*, 2007a). Podobně jako u Hsp70/Hsp40 je řada sHsp spojena s virovou infekcí (Verchot, 2012). Existuje několik studií o jejich roli v odolnosti vůči chorobám u rostlin. Vysoká diverzita a funkční vlastnosti rostlinných sHsp hrají pravděpodobně důležitou roli v získané toleranci rostlin vůči stresu (Sun *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003), včetně tepla, chladu, sucha, salinity a oxidačního stresu (Obr. 13).



Obr. 13 Heat shock proteiny (Hsp) a chaperonová síť v odpovědi na abiotický stres. Abiotický stres v rostlinách často způsobuje dysfunkci/denaturaci proteinů. Pro přežití je důležité proteiny udržet v jejich funkčních konformacích a zabránit agregaci rozložených proteinů. Např. malé Hsp (sHsp) a Hsp70 stabilizují proteinovou konformaci, zajišťují ochranu před agregací a udržují

proteiny v kompetentním stavu pro jejich následné složení dalšími chaperony, např. Hsp60, Hsp70 a Hsp90. Pokud dojde k denuraci či agragaci proteinů, mohou být solubilizovány pomocí Hsp100/Clp a opět složeny, nebo degradovány proteasami. Některé chaperony, např. Hsp70 a Hsp90, jsou zahrnuty v signální transdukcii a transkripční aktivaci vedoucí k syntéze dalších chaperonů (např. chaperony regulované heat shock faktory (Hsf)) a proteinů spojených se stresem (např. antioxidanty) (převzato a upraveno z Wang *et al.*, 2014).

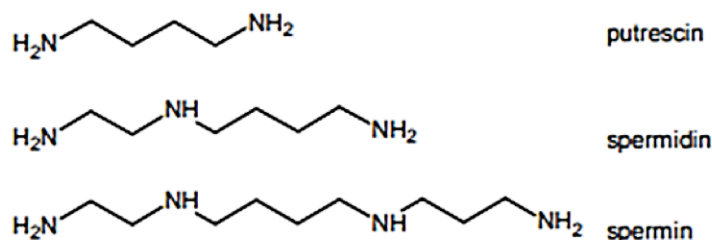
U prokaryot i eukaryot existuje mnoho regulačních mechanismů exprese Hsp genů. Mezi nejdůležitější patří regulace transkripce těchto genů prostřednictvím Hsf. Hsf jsou přítomny nejvíce u vyšších rostlin. Pro srovnání bylo objeveno 38 Hsf v sójových bobech, 1 Hsf v *S. cerevisiae* a 7 Hsf u lidí (Fujimoto a Nakai, 2010). Rostlinné Hsf sdílejí velice konzervovanou strukturu. DNA-vazebná doména (DBD), která se nachází na N-konci a je charakterizována motivem helix-otočka-helix, se specificky váže na Hse v cílových promotorech a následně aktivuje transkripci genů indukovaných stresem (Scharf *et al.*, 2012). Na základě délky oblasti flexibilního spojovníku mezi DBD a oligomerizační doménou jsou rostlinné Hsf klasifikovány do tříd A, B a C. C-koncové aktivační domény Hsf jsou charakterizovány AHA motivy, které jsou mnohdy zásadní pro funkci aktivátoru. Motivy AHA jsou tvořené z aromatických, hydrofobních a kyselých aminokyselinových residuí a jsou specifické pro Hsf třídy A, zatímco u Hsf třídy B a C se nenacházejí (Döring *et al.*, 2000; Kotak *et al.*, 2004). Hsf tvoří složitou transkripční síť a zvýšená exprese Hsp pod kontrolou Hsf hraje významnou roli v termotoleranci (Kotak *et al.*, 2007b). Hlavními regulátory Hsf jsou HsfA1, které jsou důležité pro aktivaci celé transkripční sítě. (Yoshida *et al.*, 2011) (Obr. 14). Hsf jsou při normální teplotě v inaktivní formě. Při zvýšení teploty dochází k PTM a přeměně na formu aktivní, která umožňuje velmi rychlou aktivaci transkripce Hsp. Obecně jsou rostlinné Hsf regulovány na čtyřech úrovních, a to transkripční, posttranskripční, translační a posttranslační (Fragkostefanakis *et al.*, 2015).



Obr. 14 Aktivace transkripční sítě v reakci na teplotní stres. Klíčovými regulátory transkripční sítě jsou heat shock faktory A1 (HsfA1). Za normálních podmínek je aktivita HsfA1 inhibována prostřednictvím heat shock proteinů: Hsp70 a Hsp90. Při TS jsou HsfA1 aktivovány a indukují expresi dalších Hsf, jako je DREB2A (dehydratační responsivní element vázající protein 2A), MBF1C (multiproteinový faktor 1C), HsfA7s, HsfA2 a HsfBs za účelem exprese genů indukovaných TS. Protein DREB2A musí být pro svou stabilizaci a aktivaci posttranslačně regulován. Aktivovaný DREB2A indukuje expresi dalších cílových genů, včetně HsfA3 (převzato a upraveno z Ohama *et al.*, 2017).

2.1.4 Polyaminy

Polyaminy (PA) jsou organické sloučeniny obsahující alifatický C3-C15 řetězec nesoucí alespoň dvě primární aminoskupiny a jednu či více vnitřních iminoskupin. Vyskytují se v prokaryotních i eukaryotních buňkách a v rámci rostlinné buňky jsou přítomny ve všech kompartmentech včetně jádra, což naznačuje jejich účast na základních procesech v buňce (Walden *et al.*, 1997). Mezi nejběžnější rostlinné zástupce PA patří putrescin (Put), kadaverin (Cad), spermidin (Spd), spermin (Spm) a thermospermin (Obr. 15).



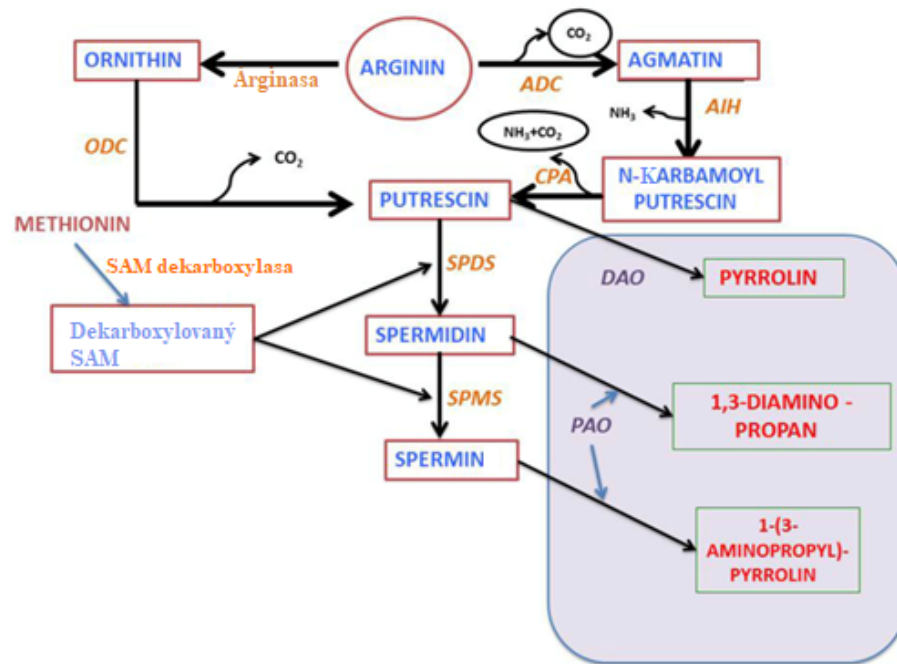
Obr. 15 Nejvýznamnější polyaminy společné pro všechny druhy rostlin.

Koncentrace PA v rostlinách je mnohem vyšší (10^{-9} - 10^{-5} mol·l⁻¹) oproti endogenním fytohormonům (10^{-13} - 10^{-7} mol·l⁻¹). Celková koncentrace PA a poměry mezi jednotlivými PA se může výrazně lišit v závislosti na druhu rostliny, orgánu, pletivu a také vývojovém stádiu rostliny (Hussain *et al.*, 2011). PA se v buňce vyskytují jako volné molekuly nebo mohou být konjugovány s fenolickými kyselinami. Mohou také interagovat s makromolekulami, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny, čímž může být ovlivněna jejich stabilita (Bouchereau *et al.*, 1999). Stejně jako fytohormony i PA mohou ovlivňovat růst a řadu důležitých vývojových a fyziologických procesů v rostlině, jako např. oddálení senescence, buněčné dělení, embryogenezi, organogenezi, kvetení, vývoj plodů, zrání, senescenci listů, osmotickou regulaci a biosyntézu ethylenu sdílením společného prekurzoru SAM (Kusano *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2011). V neposlední řadě hrají důležitou roli v obraně a vývoji tolerance rostlin vůči široké škále biotických a abiotických stresů (vysoká a nízká teplota, salinita, hyperosmóza, hypoxie atd.) (Yamakawa *et al.*, 1998; Alcázar *et al.*, 2010). U rostlin vystavených stresu byly prokázány změny v obsahu a metabolismu PA, s čímž souvisí např. nadměrná exprese enzymů zapojených do biosyntézy nebo naopak katabolismu PA. Poměr katabolismu a anabolismu PA je rozhodujícím faktorem při toleranci vůči stresu zprostředkované PA (Moschou *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2011). Bylo např. zjištěno, že rostliny s nedostatkem syntézy Put jsou přecitlivělé na stres (Cuevas *et al.*, 2008). Úroveň akumulace volných PA během stresu je závislá na čase a druhu stresu (Liu *et al.*, 2011). PA jsou zapojeny také do procesu replikace, transkripce a translace (Bouchereau *et al.*, 1999). Díky struktuře a přítomnosti kladného náboje a methylenových skupin mohou PA stabilizovat biologické membrány a buněčné struktury přímou vazbou na membránové fosfolipidy, dále stabilizují negativně nabitě makromolekuly a udržují rovnováhu mezi kationty a anionty (Gill a Tuteja 2010b). Díky jejich povaze vykazují antioxidační aktivitu a jsou schopné zachycovat volné radikály a zvyšovat expresi genů kódujících antioxidační enzymy, čímž dochází ke zvýšení obsahu celkových antioxidantů (Roychoudhury *et al.*, 2011).

Obsah PA je regulován katabolickými a anabolickými procesy, přičemž biosyntéza PA je zahájena tvorbou diaminu Put. U rostlin dochází nejdříve k přeměně substrátu argininu na agmatin za katalýzy arginindekarboxylasy (ADC, EC. 4.1.1.19), dále následuje tvorba N-karbamoylputrescinu za katalýzy agmatiniminohydrolasy (AIH, EC. 3.5.3.12) a nakonec pomocí N-karbamoylputrescinamidohydrolasy (CPA, EC 3.5.1.53) dochází k tvorbě Put obsahující dvě primární aminoskupiny (Slocum *et al.*, 1984). Enzym ADC

je v rostlinách pro biosyntézu Put klíčový (Alcázar *et al.*, 2005). U savců je Put tvořen z ornithinu za katalýzy ornithindekarboxylasy (ODC, EC 4.1.1.17). Put je dále přeměňován na Spd příp. Spm v reakci katalyzované spermidinsynthasou (SPDS, EC 2.5.1.16) příp. sperminsynthasou (SPMS, EC 2.5.1.22), které přenášejí aminopropylové zbytky z donoru dSAM (dekarboxylovaný S-adenosylmethionin) na akceptory Put příp. Spd (Shao *et al.*, 2012) (Obr. 16).

Klíčovými enzymy katabolismu PA jsou aminoxidasy (AO) a aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH, EC. 1.2.1.19). AO katalyzují oxidační deaminaci PA za vzniku příslušného aminoaldehydu a H₂O₂. AO lze dle kofaktoru klasifikovat do skupiny diaminoxidasy obsahující měď (DAO, EC 1.4.3.6) a polyaminoxidasy obsahující FAD (PAO, EC 1.5.3.3.) Tyto AO se liší substrátovou specifitou, mechanismem oxidace substrátu a buněčnou lokalizací (Tiburcio *et al.*, 2014). DAO mají vysokou afinitu pro oxidaci primárních aminoskupin a katalyzují přeměnu Put na H₂O₂, NH₃ a 4-aminobutanal, který cyklizuje na Δ^1 pyrrolin a dále jej lze přeměnit až na kyselinu γ -aminomáselnou (GABA) pomocí enzymu AMADH. PAO katalyzují oxidační štěpení Spd a Spm za vzniku 4-aminobutanalu a 1-(3-aminopropyl)-4-aminobutanalu za současné tvorby propan-1,3-diaminu a H₂O₂ (Šebela *et al.*, 2000). Další oxidací propan-1,3-diaminu vzniká 3-aminopropanal, což je nejlepší substrát enzymu AMADH a jeho katalýzou vzniká β -alanin, který je prekurzorem osmoprotektantu β -alaninbetainu (Duhazé *et al.*, 2002). Obecně jsou AMADH NAD⁺-dependentní enzymy katalyzující oxidaci ω -aminoaldehydů, vzniklých katabolismem PA, na příslušnou ω -aminokyselinu za současné redukce NAD⁺ (Tylichová *et al.*, 2010).



Obr. 16 Metabolismus polyaminů (PA). ODC ornithindekarboxylasa, ADC arginindekarboxylasa, AIH agmatiniminohydrolasa, CPA N-karbamoylputrescinamidohydrolasa, DAO diaminoxidasa, SPDS spermidinsynthasa, SPMS sperminsynthasa, SAM S-adenosylmethionin, PAO polyaminoxidasa (převzato a upraveno z Gupta *et al.*, 2016).

2.1.4.1 Úloha polyaminů v obranné reakci na teplotní stres

Každý abiotický stres, včetně TS, je spojen s nadprodukcí ROS, což vede k oxidačnímu poškození buněčných komponentů zahrnující peroxidaci lipidů v membránách (Anjum *et al.*, 2015). Jedním způsobem, jak lze podpořit endogenní obranný systém rostlin proti negativním dopadům stresových podmínek, může být např. exogenní aplikace PA na rostliny. Antioxidační účinek PA je přisuzován schopnosti zachycování ROS, schopnosti inhibice lipidové peroxidace a oxidačním reakcím katalyzovaných enzymy DAO a PAO vedoucích k produkci H₂O₂, který vstupuje do sítě obranných reakcí rostlin (Groppa a Benavides, 2008). Je známo, že fenylpropanoid-polyaminové konjugáty působí jako antioxidanty proti ROS a RNS v reakci na stres (Yamasaki a Cohen, 2006). PA mohou také regulovat obsah H₂O₂ v buňce a zmírňovat oxidační stres pomocí modulace genové exprese antioxidačních enzymů (CAT, APX, SOD) (Sung *et al.*, 2011). Při abiotickém stresu dochází také ke zvýšení hladiny kyseliny abscisové (ABA), což je fytohormon hrající důležitou roli v celé řadě vývojových procesů a adaptivních reakcí na stres z prostředí rostliny. ABA je odpovědná za spuštění exprese genů spojených se stresem, včetně genů pro biosyntézu PA (Kasinathan a Wingler, 2004). Existují studie

prokazující vliv exogenně aplikované ABA na transkripci a biosyntézu metabolických enzymů PA (ADC, SPDS, SPMS) u rostlin vystavených stresovým podmínkám (Alcázar *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2011). Kromě H₂O₂ jsou PA zahrnuty také do indukce produkce další signální molekuly, a to NO (Palavan-Unsal a Arisan, 2009). PA, ABA, H₂O₂ a NO jsou mnohostranné signální molekuly tvořící komplexní synergickou síť při působení abiotického stresu na rostlinu. PA regulují např. zavírání stomat přímým zapojením do biosyntézy signálních molekul, jako je ABA, H₂O₂ a NO (Alcázar *et al.*, 2010). Dále bylo ve studii Filippou *et al.* (2013) zjištěno, že při použití donoru NO (nitroprussidu sodného) došlo k regulaci metabolismu PA a prolinu u rostlin. Při dlouhodobém působení SNP (24 h) došlo ke snížení rychlosti fotosyntézy a akumulaci Put a prolinu v důsledku zvýšení aktivit příslušných biosyntetických enzymů. Pozorované významné zvýšení aktivity DAO koreluje s akumulací Put, zatímco aktivita PAO vzrostla pouze mírně (Filippou *et al.*, 2013).

U studií zaměřených na úlohu PA v rostlinách vystavených TS byly taktéž pozorovány změny v hladinách PA a v aktivitě enzymů souvisejících s metabolismem PA a ROS. Bylo např. prokázáno, že exogenní aplikace PA na rostliny vystavených TS vedla k ochraně membránové integrity. Dále bylo zjištěno, že preinkubace rostlin s exogenními PA předtím, než byly vystaveny TS, vedla k účinnější regeneraci růstu kořenů a hypokotylu (Amooaghaie a Moghym, 2011). Při exogenní aplikaci Spd na rostliny vystavené TS byla detekována zvýšená aktivita antioxidantních enzymů (CAT, SOD, APX) (Tian *et al.*, 2012). Ve studii Roy a Ghosh (1996) byla pozorována vyšší akumulace PA a zvýšená aktivita ADC. Je známo, že Spm je z hlediska ochrany vůči nepříznivým podmínkám nejúčinnější, protože má největší kladný náboj díky čtyřem aminoskupinám. (Bouchereau *et al.*, 1999). Ve studii Sagor *et al.*, 2012 pozorovali lineární zvyšování obsahu Spm při působení TS. Rovněž zjistili, že čím vyšší je obsah Spm, tím vyšší je termotolerance, neboť aplikace Spm způsobila zvýšení exprese genů souvisejících s TS (Sagor *et al.*, 2012).

2.1.5 Dopad teplotního stresu na zemědělství

V současnosti je abiotický stres primární příčinou celosvětového úbytku plodin, který se pohybuje okolo 50 %. Situace se zhoršila v důsledku drastických a rychlých změn globálního klimatu, jehož hlavní příčinou je rostoucí koncentrace skleníkových plynů díky průmyslovému rozvoji (Boyer 1982; Lal, 2004; Friedlingstein *et al.*, 2010; IPCC, 2014). Odhaduje se, že při zvýšení průměrné globální teploty o 1 °C se výnosy pšenice

sníží o 6 %, rýže o 3,2 %, kukuřice o 7,4 % a sója o 3,1 % (Zhao *et al.*, 2017). Studium dopadu vysokých teplot na růst a vývoj rostlin je proto důležitý pro dosažení maximální zemědělské produktivity a zabezpečení potravin. Přestože rostoucí teploty jsou v některých chladnějších oblastech světa prospěšné, celkový globální dopad je stále negativní (Challinor *et al.*, 2014). Na úrovni celé rostliny, když teplota stoupne o 5-6 °C nad optimální teplotu okolí, dochází k urychlení či přerušení vegetativního vývoje, podpoře časného kvetení, pomalému růstu kořenů a výhonků, snížení asimilace, inhibici produkce semen a zvýšení náchylnosti k patogenní infekci (Alcázar a Parker 2011; Gray a Brady 2016). Mezi další fenotypové změny způsobené TS patří zvýšená senescence listů, snížená klíčivost semen a zhoršení jejich kvality (Bahuguna a Jagadish 2015; Fahad *et al.*, 2016). Dochází také k morfologickým změnám, a to k inhibici růstu, změně barvy plodů a listů, většímu prodloužení hypokotylu, nižší hustotě průduchů a zúžení tloušťky listů (Quint *et al.*, 2016). TS zanechává škodlivé účinky také v reprodukčním vývoji, kdy dochází např. k inhibici vývoje samčího i samičího gametofytu, klíčení pylu, růstu pylové láčky či otevírání prašníku (Hedhly, 2011; Sage *et al.*, 2015). Výsledkem poruchy či ztráty plodnosti rostlin jsou zemědělské ztráty. V mírné oblasti může působení vysokých teplot během reprodukční fáze způsobit značné snížení výnosu obilovin. Kvalita obilovin a olejnatých plodin je také značně snížena, neboť v důsledku TS dochází ke snížení obsahu oleje, škrobu a bílkovin (Wilhelm *et al.*, 1999; Maestri *et al.*, 2002). Negativní vliv TS lze pozorovat také např. u rajčat, protože ovlivňuje meiózu, oplodnění a růst embrya, což způsobuje snížení výnosu (Camejo *et al.*, 2005). Pokud teploty vzrostou na 40 °C a výš, může dojít k vážnému poškození buněk vedoucí až k buněčné smrti. Rostliny předem vystavené po určitou dobu vyšším neletálním teplotám vykazují významně zvýšenou toleranci k vysokým letálním teplotám. Tomuto jevu se říká získaná termotolerance (Sung *et al.*, 2003). Během tohoto procesu rostliny díky zvýšení okolní teploty iniciují přenos signálu vedoucí k regulaci exprese řady genů, včetně těch, které kódují Hsp a enzymy zachycující ROS. Pochopení mechanismů, kterými rostliny získávají termotoleranci, je nezbytné k usnadnění produkce plodin prostřednictvím šlechtění termotolerantních rostlin obsahující molekulární (termotolerantní) markery (Li *et al.*, 2018).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Chemikálie

Acros Organics (Belgie): chlorid měďný, NADPH tetrasodná sůl

AppliChem (Německo): dodecylsírán sodný (SDS)

Bio-Rad (USA): Coomassie Brilliant Blue G-250

Fluka (Švýcarsko): dihydrát disodné soli ethylendiamintetraoctové (EDTA-Na⁺)

Honeywell (Rumunsko): diethylether

Lachema (ČR): jód

Lach-Ner (ČR): ethanol, hydrogenfosforečnan draselný, kyselina chlorovodíková

Messer (ČR): dusík kapalný

PENTA (ČR): dihydrogenfosforečnan draselný, ledová kyselina octová

Roth (Německo): jodid draselný, 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina (DTNB), 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát (BCIP), nitrotetrazoliová modř (NBT), Tween-20

Sigma-Aldrich (Německo): hovězí sérový albumin (BSA), *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED), n-butanol, Ponceau S, akrylamid (AA), β-merkptoethanol, bromfenolová modř, glycerol, kozí anti-králičí sekundární protilátka značená alkalickou fosfátasou, myší monoklonální primární protilátka anti-Hsp70, persíran amonný (APS), sušené mléko, sulfanilamid, chlorid rtuťnatý, L-cystein hydrochlorid

Unilever (ČR): SAVO

3.1.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); analyzátor NO CLD 88 (Eco Physics, Švýcarsko); aparatura pro chemiluminiscenční detekci (Eppendorf, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); blotovací systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo); destička Take3 Multi-Volume plate (BioTek, USA); detekční zařízení BIO-RAD Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA); digitální pH metr

(InoLab pH level1, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); Nexera X2 UHPLC (Shimadzu Handels GmbH); elektroforetická komůrka (Bio-Rad, USA); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); hmotnostní spektrometr-8050 (Shimadzu Handels GmbH); chromatografická kolona (Waters, Milford, MA, USA); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový reader PowerWave XS (BioTek Instruments, USA); nitroceluloseová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA); termostat (BioSan, Litva); třepačka 3D (BioSan, Litva); vortex (Stuart, UK); zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (Bio-Rad, USA).

3.1.3 Rostlinný materiál

Pro studium možného vlivu NO na regulaci aktivity enzymů S-nitrosylací byly použity dva kultivary hrachu setého: *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Pro kultivar *P. sativum* cv. Twinset je charakteristická vyšší odolnost vůči patogenům, jako je padlí, fusariové vadnutí a vir PSbMV (Pea Seed-borne Mosaic Virus).

3.1.4 Příprava rostlinného materiálu

Semena hrachu byla ošetřena 3% (v/v) roztokem SAVO Original po dobu 2 min, poté byla 10x promyta vodou a dána na 1 den bobtnat ve vodě. Následující den byla semena umístěna na filtrační papíry navlhčené vodou a ponechána 3 dny klíčit ve tmě při 25 °C. Naklíčená semena byla přemístěna do misek v hydroponickém uspořádání s ¼ Hoaglandovým roztokem (Tab. 3). Semena byla pěstována 7 dní ve fytotronu za podmínek světelného režimu 12 h světlo/12 h tma a teploty 25 °C. Rostliny byly následně vystaveny krátkodobému (2 h) a dlouhodobému (24 h) působení TS při 45 °C. Rostliny byly odebírány a dále zpracovány 2, 3, 4, 6 a 24 h po zahájení experimentu. Ve stejných časových intervalech byly odebírány rostliny z kontrolního experimentu (rostliny nebyly vystaveny TS). Kořenová a nadzemní část rostlin byla oddělena a zamražena.

Tab. 3 Složení Hoaglandova roztoku.

<i>Použité roztoky</i>	<i>Koncentrace zásobního roztoku</i>	<i>Pipetovaný objem [ml]*</i>
KNO ₃	1 mol·l ⁻¹	1,5
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	1 mol·l ⁻¹	1
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 mol·l ⁻¹	0,5
MgSO ₄ · 5 H ₂ O	1 mol·l ⁻¹	0,25
H ₃ BO ₃	25 mmol·l ⁻¹	0,5
KCl	50 mmol·l ⁻¹	}
MnSO ₄ · 5 H ₂ O	2 mmol·l ⁻¹	
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2 mmol·l ⁻¹	
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,5 mmol·l ⁻¹	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	0,5 mmol·l ⁻¹	
FeSO ₄ · 7 H ₂ O + Na ₂ EDTA	20 mmol·l ⁻¹	
		1

* Roztok doplněn destilovanou vodou na objem 4 l

3.1.5 Zpracování rostlinného materiálu

Z nadzemní části 10-12 rostlin (zamražené vzorky) byl připraven směsný vzorek homogenizací v třecí misce s tekutým dusíkem na jemný prášek, který byl rozdělen do mikrozkušavek a uchován v mrazicím boxu při -80 °C pro další práci. Extrakce byla prováděna v extrakčním pufru vhodným pro realizované detekční metody v poměru 1:2 (1 g rostlinného materiálu: 2 ml extrakčního pufru).

Suspenze homogenizovaných rostlin v extrakčním pufru byla 20 min při 4 °C pravidelně promíchávána na vortexu. Poté byla provedena centrifugace (20 min, 16000 g, 4 °C) a odpipetován supernatant do čistých mikrozkušavek. Extrakt byl použit pro spektrofotometrické měření aktivit enzymů, stanovení celkových proteinů, detekci RSNO pomocí Savillovy a chemiluminiscenční metody a detekci proteinu Hsp70 metodou Western blot.

Extrakční pufr pro stanovení aktivity GSNOR: 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl pufr pH 7,5; 0,2% Triton X-100; 2 mmol·l⁻¹ DTT; 1 mmol·l⁻¹ AEBSF

Extrakční pufr pro stanovení aktivity TrxR: 100 mmol·l⁻¹ K-fosfátový pufr pH 7; 10 mmol·l⁻¹ EDTA-Na⁺

Extrakční pufr pro stanovení RSNO Savillovou metodou: 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl pufr pH 7,5; 0,2% Triton X-100; 1 mmol·l⁻¹ AEBSF

Extrakční pufr pro stanovení RSNO chemiluminiscenční metodou: PBS pufr pH 7,4 (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄/ 1 l H₂O) / Griess A (3,5 g sulfanilamid/ 100 ml 0,5 mol·l⁻¹ HCl)

Extrakční pufr (tzv. „R“ roztok) pro detekci Hsp70: 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl pufr (pH 7); vzorkovací pufr; 10% SDS

Vzorkovací pufr: 0,125 mol·l⁻¹ Tris-HCl pufr (pH 6,8); 4% SDS; 20% glycerol; 5% merkptoethanol; 0,02% bromfenolová modř

3.1.6 Stanovení proteinů

Koncentrace celkových proteinů byla stanovena metodou Bradforda spektrofotometricky pomocí readeru PowerWave XS. Tato metoda využívá barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250, které se v kyselém prostředí váže na molekulu proteinu za vzniku modrého zbarvení. Intenzita zbarvení je úměrná množství proteinu v extraktu (Bradford, 1976). Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Použité koncentrace BSA byly 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg·ml⁻¹.

Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 45 µl destilované vody, 5 µl extraktu/standardu/vody a 200 µl Bradfordova činidla. Reakční směs byla 5 min inkubována při 25 °C a poté byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm.

Bradfordovo činidlo (zásobní roztok): 0,5 mg·ml⁻¹ Coomasie Brilliant Blue G-250; 0,25 mol·l⁻¹ methanol; 0,5 mol·l⁻¹ kyselina fosforečná. Před použitím zředěno destilovanou vodou v poměru 1:4.

3.1.7 Stanovení polyaminů metodou HPLC-MS

Ze vzorků rostlinného zamraženého materiálu bylo po lyofilizaci odváženo do mikrozkuhavky vždy po 5 mg. Takto připravené vzorky byly homogenizovány v oscilačním homogenizátoru při 27 Hz po dobu 5 min. Následně byl ke vzorkům přidán 1 ml 50% ethanolu a poté proběhla sonikace v ultrazvukovém homogenizátoru po dobu 10 min při 25 °C. Vzorky byly poté zcentrifugovány (5 min, 14300 g, 25 °C) a vzniklé supernatanty byly přeneseny do čistých mikrozkuhovek po 200 µl. K supernatantům se následně přidalo 200 µl 2 mol·l⁻¹ NaOH a 2 µl derivatizačního činidla benzoylchloridu. Po promíchání na vortexu se nechaly vzorky 40 min inkubovat při 25 °C. Následně bylo ke vzorkům přidáno 500 µl nasyceného roztoku NaCl a 500 µl diethyletheru. Směs byla promíchána a ponechána stát pro ustálení rozhraní mezi vrstvami. Horní etherová vrstva byla přepipetována do čisté mikrozkuhavky a ke zbylé spodní vrstvě bylo opět přidáno 500 µl diethyletheru pro zopakování extrakce. Obě etherové frakce byly spojeny a následně odpařeny ve vakuové odparce při 60 °C. Vzniklé odparky byly před dalším použitím skladovány při -20 °C. Poté byly odparky rozpuštěny v 200 µl 0,5% kyseliny mravenčí a umístěny do ultrazvukového homogenizátoru na 10 min při 25 °C. Následně

proběhla centrifugace (5 min, 14300 g, 25 °C) a získané supernatanty byly přeneseny po 100 µl do skleněných vialek k analýze na přístroji UHPLC ve spojení s ESI. UHPLC-MS/MS byla provedena na Nexera X2 UHPLC (Shimadzu Handels GmbH) spojené s MS-8050 (Shimadzu Handels GmbH). Chromatografická separace byla provedena na koloně Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm; velikost částic 1,7 µm) s příslušnou předkolonou při teplotě 40 °C. Mobilní fáze A byla 15 mmol·l⁻¹ kyselina mravenčí (pH 3) a mobilní fáze B byl methanol. Analyty byly separovány pomocí binárního gradientu začínajícím na 30% obsahu mobilní fáze B, který po dobu 0,5 min stoupl na 57 %. Do 3. min byl obsah fáze B konstantní a poté během 0,5 min vzrostl na 95 %. Po další 0,5 min se obsah fáze B snížil opět na 30 % po dobu 0,1 min. Rychlost průtoku byla 0,4 ml·min⁻¹ a bylo vstříkováno 5 µl vzorku/standardu. Benzoylované PA byly detekovány v pozitivním módu ESI+ využívající příslušné MRM přechody. (Provozní parametry MS: kapilární napětí -3 kV; napětí rozhraní 4 kV; teplota rozhraní 300 °C, průtok topného a sušícího plynu 10 l·min⁻¹; průtok rozprašovacího plynu 3 l·min⁻¹.) Analýza PA byla realizována ve spolupráci s dr. Cavar na oddělení VÚRV.

3.1.8 Stanovení S-nitrosothiolů

3.1.8.1 Savillova metoda

Spektrofotometrické stanovení celkových RSNO Savillovou metodou je založeno na detekci a kvantifikaci uvolněného NO⁺ z RSNO za katalýzy Hg²⁺ solí. Vzniklý dusitan vytváří v kyselém prostředí diazoniovou sůl, která následně kopuluje s činidlem NED za tvorby azobarviva, které lze detekovat spektrofotometricky při 540 nm (Saville, 1958). Pro kalibraci byl použit roztok standardu GSNO v 0,5 mol·l⁻¹ HCl o koncentracích 1, 5, 10, 25, 50, 75 a 100 µmol·l⁻¹.

Extrakt z jednotlivých vzorků (kap. 3.1.5), případně standard GSNO, byl nejprve v mikrozkušavce při 25 °C 5 min inkubován s činidlem Griess A nebo B v poměru 1:1 a poté byl zcentrifugován (5 min, 16000 g, 25 °C). Vzniklý supernatant byl následně pipetován do jamek mikrotitrační destičky v poměru 1:0,5 s činidlem NED, s kterým byl 5 min inkubován. Poté byla změřena absorbance při 540 nm. Jako blank byl v případě vzorku použit extrakční pufr (kap. 3.1.5) a pro standard byla použita 0,5 mol·l⁻¹ HCl.

Griess A: 3,5% sulfanilamid v 0,5 mol·l⁻¹ HCl

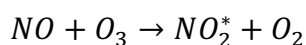
Griess B: 3,5% sulfanilamid v 0,5 mol·l⁻¹ HCl + 1% HgCl₂

Činidlo NED: 0,1% N-(1-naftylethylen)diamin v deionizované H₂O

3.1.8.2 Chemiluminiscenční metoda s využitím NO analyzátoru

Další způsob stanovení celkových RSNO byl proveden použitím chemiluminiscenčního NO analyzátoru. Princip detekce NO, který je uvolňován chemickým rozkladem RSNO, je založen na rychlé reakci NO s ozonem za vzniku excitované molekuly NO₂*. Při návratu elektronu z excitovaného stavu zpět do základního stavu dochází k emitaci fotonu, který je detekován jako chemiluminiscence (hν). Detekované světlo, které je přímo úměrné koncentraci NO, je poté amplifikováno fotonásobičem a generováno jako elektrický signál. Pro štěpení vazby S-NO byla použita trijodidová a Cu⁺/Cys reakční směs (RS), do které byly Hamiltonovou pipetou nastříkovány jednotlivé vzorky. Uvolněný plynný NO je do analyzátoru odváděn proudem N₂, jehož tlak byl po celou dobu měření udržován stabilní.

Princip detekce uvolněného NO lze obecně popsat rovnicemi:

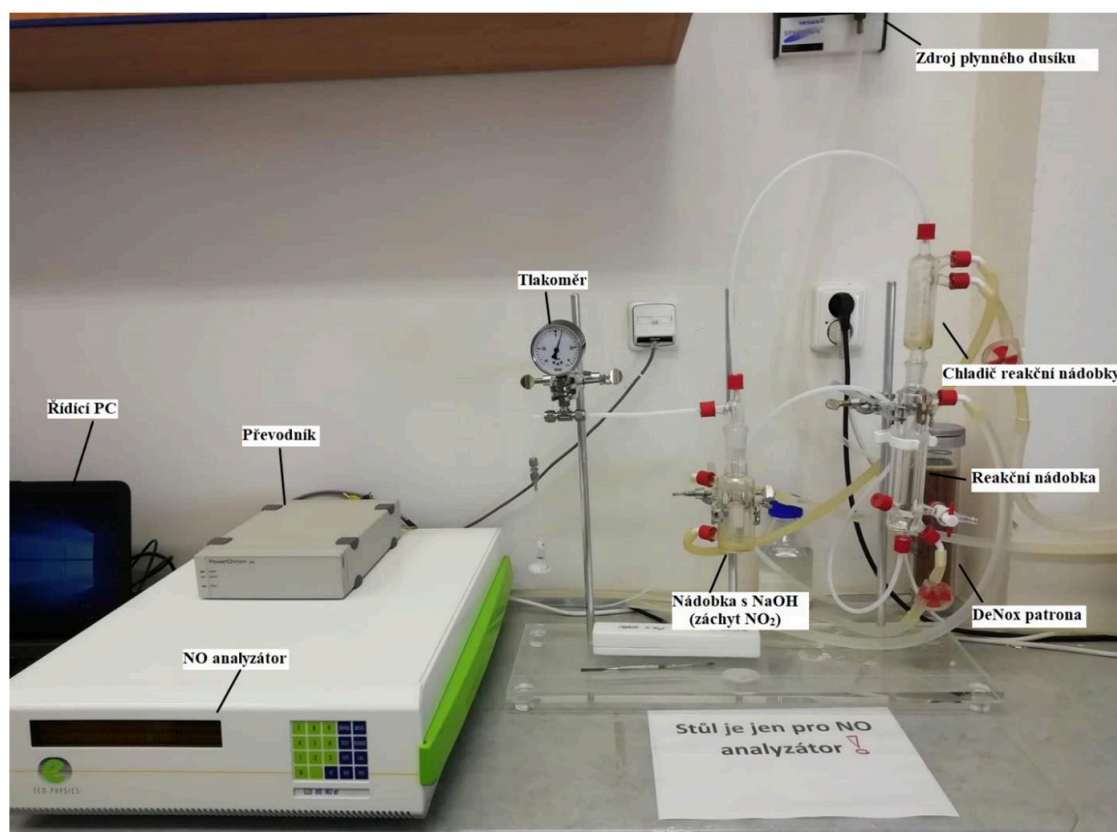


Jednotlivé vzorky byly extrahovány v PBS pufru nebo činidle Griess A (kap. 3.1.5). Po ustálení tlaku dusíku v aparatuře (Obr. 17) bylo do RS ve skleněné aparatuře postupně aplikováno vždy 10 μl analytu. Byly testovány tři RS: dvě s různou koncentrací KI a I₂ (trijodidová RS), třetí obsahující CuCl a L-cystein (Cu⁺/Cys RS).

Reakční směs 1: 0,22 g KI; 0,144 g I₂; 4,55 ml H₂O; 15,45 ml ledové kyseliny octové (pipetováno 3 ml do reakční nádoby)

Reakční směs 2: 52,5 mg KI; 33,6 mg I₂; 2,1 ml H₂O; 7,9 ml ledové kyseliny octové (pipetováno 5 ml do reakční nádoby)

Reakční směs 3: 1 mmol·l⁻¹ L-cystein; 0,1 mmol·l⁻¹ CuCl; 400 ml H₂O; pH 6,5 (pipetováno 7 ml do reakční nádoby)



Obr. 17 Popis aparatury s příslušenstvím pro chemiluminiscenční stanovení.

3.1.9 Stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy

Enzym GSNOR katalyzuje NADH-dependentní redukci GSNO na GSSG a NH_3 . Aktivitu GSNOR lze určit jako množství spotřebovaného NADH při redukci substrátu GSNO za současného poklesu absorbance při 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Před samotným měřením byly extrakty (kap. 3.1.5) jednotlivých vzorků přečištěny na kolonách NAP-5 pro odstranění nízkomolekulárních látek. Aktivita byla změřena v mikrodestičkovém readeru PowerWave XS. Do jamky bylo pipetováno 225 μl 20 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl pufr (pH 8), 30 μl 2 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NADH, 15 μl rostlinného extraktu a 30 μl 4 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ substrátu GSNO pro zahájení reakce. Aktivita byla stanovena jako pokles absorbance při 340 nm po dobu 10 min a 30 °C.

3.1.10 Stanovení aktivity thioredoxinreduktasy

Enzym thioredoxinreduktasa (TrxR) *in vivo* katalyzuje redukci oxidované formy disulfidu s využitím thioredoxinu a NADPH. V *in vitro* podmínkách TrxR katalyzuje přeměnu substrátu DTNB za současné oxidace NADPH. Vzniklé žluté zbarvení lze poté spektrofotometricky měřit při 412 nm ($\epsilon = 14150 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Aktivita byla změřena v mikrodestičkovém readeru PowerWave XS. Do jamky bylo pipetováno 230 μl 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru (pH 7), 10 μl 6 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADPH, 10 μl 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ substrátu DTNB (rozpuštěného v DMSO) a na závěr 50 μl rostlinného extraktu. Aktivita byla měřena jako nárůst absorbance při 412 nm po dobu 2 min a 30 °C.

3.1.11 Detekce heat shock proteinů 70 metodou Western blot

Detekce proteinu Hsp70 byla provedena imunochemickou metodou Western blot, která využívá elektroforézu SDS-PAGE k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Separované proteiny byly poté přeneseny z gelu na membránu, na které byl hledaný protein detekován pomocí specifických protilátek.

Příprava vzorků:

Rostlinný materiál byl extrahován v „R“ roztoku v poměru 1:2. Suspenze byla 20 min promíchávána na vortexu při 4 °C a poté byla provedena centrifugace (10 min, 16000 g, 4 °C). Supernatant byl rozdělen na alikvoty a zamražen. Před použitím k samotné elektroforéze byl alikvot extraktu 5 min inkubován při 100 °C a následně ochlazen. Do jamky gelu bylo pipetováno 10 μl vzorku.

„R“ roztok: 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pufr (pH 7); vzorkovací pufr; 10% SDS

Vzorkovací pufr: 0,125 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pufr (pH 6,8); 4% SDS; 20% glycerol; 5% merkaptoethanol; 0,02% bromfenolová modř

SDS-PAGE elektroforéza:

Dle Tab. 4 byl připraven 10% dělicí a 4% zaostřovací polyakrylamidový gel, ve kterém proběhla elektroforetická separace proteinů jednotlivých vzorků. Separace probíhala přibližně 15 min při napětí 120 V a poté bylo napětí zvýšeno na 180 V.

Tab. 4 Příprava zaostřovacího a dělicího polyakrylamidového gelu pro skla s mezerníky 0,75 mm. Rozpis je uveden pro 4 gely. AA/BIS akrylamid/bisakrylamid (T 30%, C 0,8%), SDS dodecylsírán sodný, APS persíran amonný, TEMED tetramethylethylendiamin.

Gel	H ₂ O [ml]	AA/BIS [ml]	Pufr * [ml]	10% (w/v) SDS [ml]	TEMED [ml]	APS**[ml]
4% zaostřovací	6,1	1,3	2,5	0,1	0,02	0,2
10% dělicí	8,2	6,6	5	0,2	0,02	0,2

*Pro zaostřovací gel byl použit 1,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,8. Pro dělicí gel byl použit 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 6,8.

** Pridavkem 10% APS byla zahájena polymerace.

Western blot

Následně byl proveden přenos proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu metodou semi-dry blotting. Membrána a blotovací papíry (8,5 x 7 cm) byly namočeny do blotovacího pufru. Na spodní elektrodu (anodu) byly poskládány vrstvy v pořadí: blotovací papír, membrána, gel a blotovací papír. Přenos proteinů probíhal při konstantním proudu 190 mA po dobu 2 h. Poté byla membrána promyta destilovanou vodou a 10 min barvena barvivem Ponceau S pro ověření přenosu proteinů z gelu na membránu. Po vymytí barviva v destilované vodě byla membrána přenesena do blokovacího roztoku, tj. 5% roztoku sušeného mléka v TBS-T pufru a ponechána do druhého dne. Po blokování byla membrána 2 h inkubována v roztoku primární myší monoklonální protilátky anti-Hsp70 zředěné 5% roztokem sušeného mléka v TBS-T pufru v poměru 1:2000. Poté byla membrána 3x po 10 min promyta v TBS-T pufru. Následně byla membrána 2 h inkubována v roztoku anti-myší sekundární protilátky značené alkalickou fosfatase zředěné 5% roztokem sušeného mléka v TBS-T pufru v poměru 1:3000. Následně byla membrána opět 3x po 10 min promyta v TBS-T pufru. Pro detekci Hsp70 byla membrána inkubována s barvicím roztokem NBT-BCIP. Po vyvinutí tmavě fialových bandů byla membrána promyta destilovanou vodou, usušena a vyfocena detekčním zařízením BIO-RAD. Intenzita bandů byla vyhodnocena v programu ImageJ.

Složení použitých roztoků:

AA/BIS roztok (T 30%, C 0,8%): 9,2% (w/v) AA, 0,8% (w/v) BIS, destilovaná voda

Blotovací pufr: 0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,3); 0,192 mol·l⁻¹ glycin; 20% (v/v) methanol

TBS pufr (pH 7,5): 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl; 0,5 mmol·l⁻¹ NaCl

TBS-T pufr: 2000 ml TBS (pH 7,5); 2 ml 0,1% (v/v) Tween-20

Barvicí roztok Ponceau S: 0,2% Ponceau S; 10% kyselina octová

Chromogenní substrát NBT-BCIP: 10 ml AP pufru, 33 μl NBT a 33 μl BCIP

AP pufr: 100 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 9,5); 5 mmol·l⁻¹ MgCl₂; 100 mmol·l⁻¹ NaCl

NBT roztok: 10% (w/v) NBT v 70% (v/v) N, N'-dimethylformamidu (DMF)

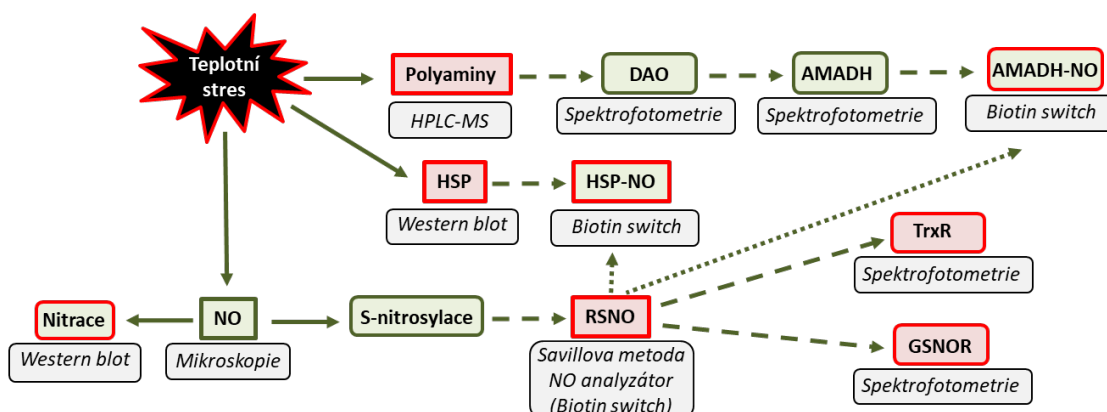
BCIP roztok: 5% (w/v) NBT v 100% (v/v) DMF

4 VÝSLEDKY

Předložená diplomová práce je součástí projektu zaměřeného na studium úlohy reaktivních forem dusíku a polyaminů v obranných reakcích rostlin po vystavení teplotnímu stresu (TS). Plánované experimenty navazují na výsledky získané v rámci řešení diplomové práce Mgr. Jany Štanclové (Štanclová, 2019), která se zaměřila na mikroskopickou detekci produkce NO a ROS, orientační kvantifikaci produkce RSNO Savillovou metodou, stanovení změn DAO, AMADH a APX aktivity a orientační stanovení změn v produkci Hsp70.

Ve své práci, realizované na stejném rostlinném modelu, jsem se věnovala možnému vlivu TS na změny: v hladinách polyaminů, aktivity enzymů podílejících se na degradaci RSNO, jako je TrxR a GSNOR, produkce RSNO a Hsp70 u rostlin vystavených TS. Pro studium byly použity extrakty z nadzemní části dvou genotypů hrachu setého: *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset, které se liší odolností vůči některým patogenům.

Na Obr. 18 jsou znázorněny stanovované parametry a použité nebo navržené metody v rámci projektu zaměřeného na aktivaci obranných mechanismů a jejich regulace v reakci na TS u rostlin. Dosažené výsledky je nutné v následných studiích doplnit experimenty zahrnující detekci S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin switch, které nemohly být zrealizovány z důvodů zkrácení doby věnované vlastní experimentální práci v důsledku pandemie a následného vyhlášení nouzového stavu vedoucí k uzavření laboratoří na vysokých školách.



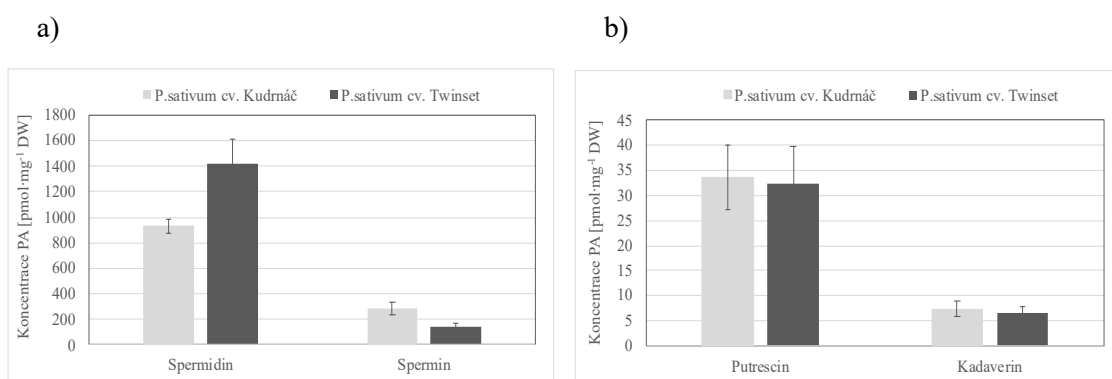
Obr. 18 Schématické znázornění návrhu experimentů v projektu zaměřeném na studium úlohy reaktivních forem dusíku v obranných mechanismech rostlin v reakci na teplotní stres. Parametry uvedené v růžových rámečcích ohraničených červeně byly detekovány v rámci předložené diplomové práce, parametry v zelených rámečcích ohraničených červeně budou stanoveny v navazujících experimentech a parametry v zelených rámečcích ohraničených zeleně byly

stanoveny v rámci diplomové práce Mgr. J. Štanclové. DAO diaminoxidasa, AMADH aminoaldehyddehydrogenasa, TrxR thioredoxinreduktasa, GSNOR S-nitrosoglutathionreduktasa, RSNO S-nitrosothioly.

4.1 Stanovení polyaminů metodou HPLC-MS

Hladina PA byla stanovena v časových intervalech 2, 3, 4, 6 a 24 h po zahájení experimentu v extraktech nadzemní části obou genotypů hrachu vystavených TS pomocí metody HPLC-MS. Byly detekovány čtyři nejvýznamnější PA: Putrescin (Put), Kadaverin (Cad), Spermidin (Spd) a Spermin (Spm).

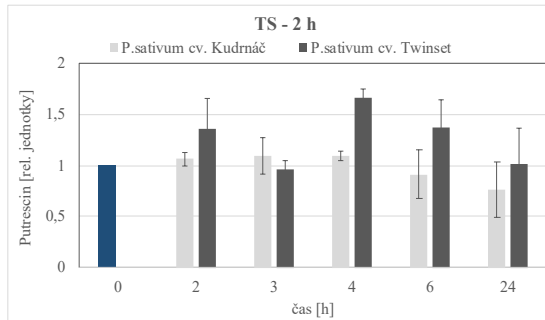
Na Obr. 19 je porovnání zastoupení jednotlivých PA v nestresovaných rostlinách hrachu obou genotypů. Koncentrace byla přepočítána na $\text{pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ suché váhy (DW). Z výsledků je zřejmé, že nejhojněji se vyskytujícím PA u obou genotypů hrachu je jednoznačně Spd. U *P. sativum* cv. Twinset dosahuje hodnoty až $1400 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{DW}$ a u *P. sativum* cv. Kudrnáč bylo detekováno přibližně $900 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{DW}$. Druhý nejvíce zastoupený PA je Spm s hodnotou v rozmezí cca $150\text{-}300 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{DW}$. V případě Put byla koncentrace cca $30 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{DW}$. Nejnižší zastoupení měl Cad cca $7 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{DW}$.



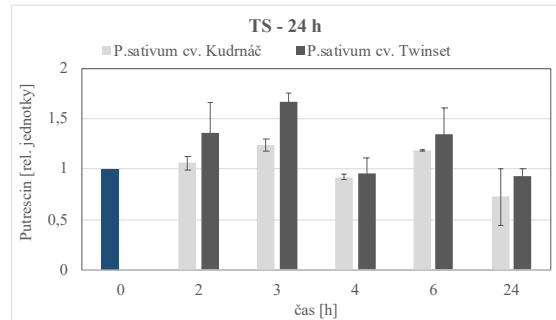
Obr. 19 Zastoupení polyaminů (PA) v nadzemní části obou kultivarů hrachu (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset) rostoucích za fyziologických podmínek: a) spermidin (Spd) a spermin (Spm), b) putrescin (Put) a kadaverin (Cad). Koncentrace PA uvedena v jednotkách $\text{pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ suché váhy (DW). Experiment byl realizován v biologickém triplikátu.

Změny v zastoupení PA u rostlin vystavených TS v časových intervalech 2, 3, 4, 6 a 24 h po zahájení experimentu jsou uvedeny na Obr. 20. Jako TS-2 h je označen experiment, ve kterém byly rostliny vystaveny krátkodobému TS, tj. pouze na 2 h. TS-24 h označuje experiment, ve kterém byly rostliny po celou dobu experimentu (tj. 24 h) při zvýšené teplotě 45 °C.

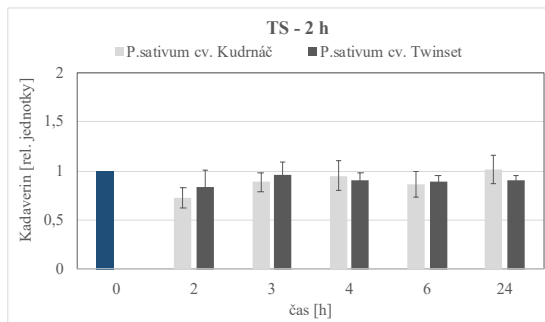
a)



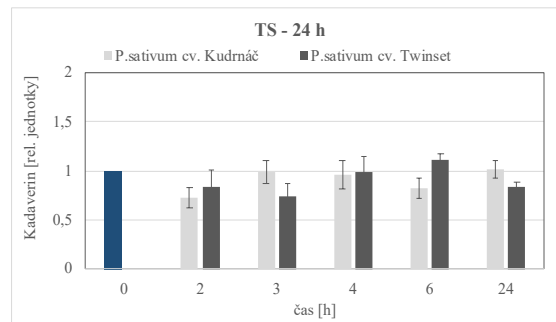
b)



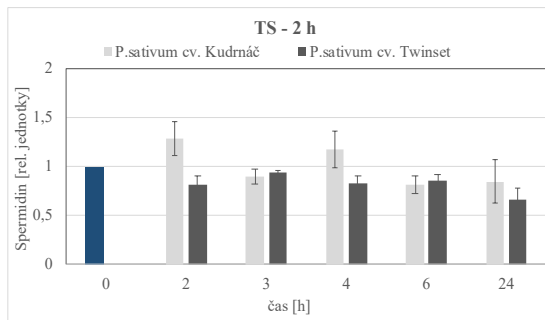
c)



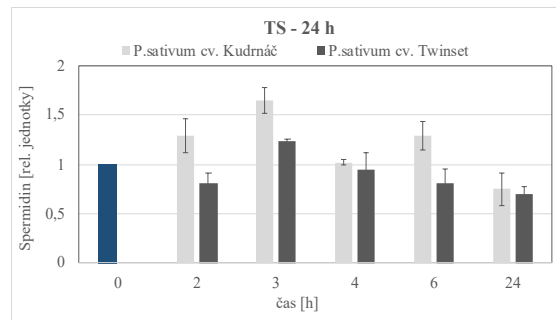
d)



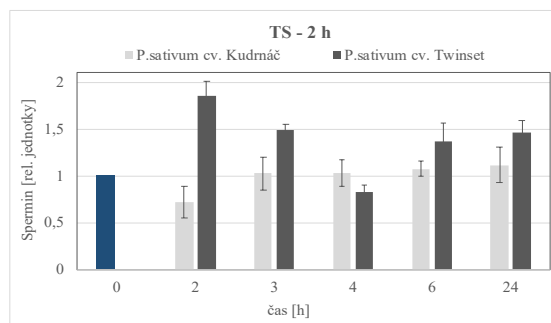
e)



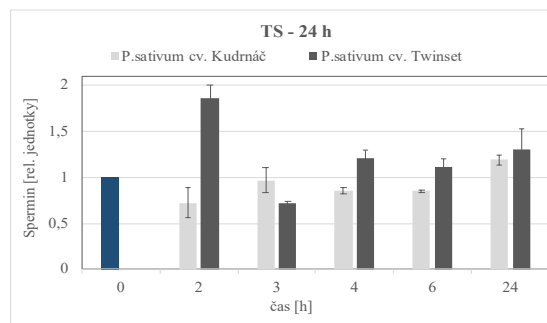
f)



g)



h)



Obr. 20 Změny v zastoupení polyaminů (PA) v nadzemní části obou kultivarů (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset) vystavených teplotnímu stresu (TS 45 °C) po dobu 2 nebo 24 h. V experimentu byly v časovém intervalu 2, 3, 4, 6 a 24 h stanovovány PA: a) a b) putrescín (Put), c) a d) kadaverin (Cad), e) a f) spermidin (Spd), g) a h) spermin (Spm). Koncentrace jednotlivých PA byly vztaženy ke kontrolnímu vzorku v daném časovém intervalu. Experiment byl realizován v biologickém triplikátu.

V případě krátkodobého TS nebyly pozorovány do 6 h významné změny v hladinách Put u rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč, pouze po 24 h byl detekován pokles obsahu Put. U *P. sativum* cv. Twinset byl naopak po 2 h TS zaznamenán významný nárůst produkce Put, jehož hladina byla nejvyšší 4 h po zahájení experimentu, poté se obsah Put postupně snižoval až na úroveň kontrolních rostlin (Obr. 20a). U dlouhodobě stresovaných rostlin byly významné změny opět detekovány pouze u genotypu *P. sativum* cv. Twinset, kdy nejvyšší změny v produkci Put byly pozorovány po 3 h působení TS. V případě *P. sativum* cv. Kudrnáč bylo mírné navýšení produkce Put rovněž detekováno po 3 h TS. V případě tohoto genotypu podobně jako v případě krátkodobého TS byla po 24 h od zahájení experimentu detekována nižší hladina Put v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 20b).

Nebyl pozorován významný vliv krátkodobého ani dlouhodobého působení TS na produkci Cad u obou studovaných genotypů hrachu (Obr. 20c, d).

V případě stanovení obsahu Spd, na rozdíl od změn detekovaných na úrovni Put, byly změny v důsledku působení TS pozorovány zejména u genotypu *P. sativum* cv. Kudrnáč. Po 2 h TS dochází u *P. sativum* cv. Kudrnáč ke zvýšení obsahu Spd až o 30 % oproti kontrole. V případě *P. sativum* cv. Twinset byla hladina Spd při krátkodobém TS mírně snižena v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 20e). Naopak u dlouhodobého TS byla detekována nejvyšší hladina Spd až po 3 h od zahájení experimentu a to u obou genotypů hrachu, cca o 65 % u *P. sativum* cv. Kudrnáč a o 20 % u *P. sativum* cv. Twinset.

Následně u obou genotypů byl zaznamenán pokles hladiny Spd a po 24 h TS byla hladina Spd nižší v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 20f).

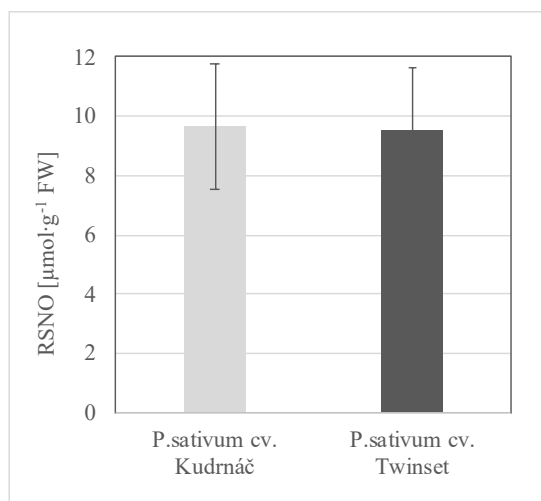
Změny v produkci Spm byly podobně jako v případě Put zaznamenány zejména u *P. sativum* cv. Twinset. V případě obou forem stresu byl maximální nárůst produkce (cca o 85 % oproti kontrole) zaznamenán po 2 h vystavení TS. V obou experimentech byl pozorován následně pokles obsahu Spm. V případě krátkodobého stresu byl maximální pokles detekován 4 h po zahájení experimentu a v případě dlouhodobého TS až 3 h. V následujících časových intervalech byl pozorován opětovný nárůst produkce Spm. U *P. sativum* cv. Kudrnáč došlo po 2 h TS naopak ke snížení obsahu Spm (cca o 30 % oproti kontrole) a v případě obou forem TS byl pozorován následný mírný nárůst produkce Spm (Obr. 20g, h).

4.2 Stanovení S-nitrosothiolů

Signální molekula NO hraje důležitou roli v obranných mechanismech v reakci na stresové podmínky prostřednictvím PTM zvané S-nitrosylace, která vede ke změně enzymových aktivit, stability či lokalizace proteinů. Obsah vzniklých RSNO je regulován denitrosylačními enzymy GSNOR a TrxR. Detekce RSNO v roztoku je náročná z důvodu jejich vysoké nestability, neboť snadno podléhají degradaci v přítomnosti redukčních činidel, přechodných kovů či světla. V této diplomové práci byly použity pro stanovení RSNO dvě metody lišící se specifitou, citlivostí a časovou náročností. Analýza byla provedena v extraktech nadzemní části obou kultivarů hrachu setého rostoucích za fyziologických a stresových podmínek.

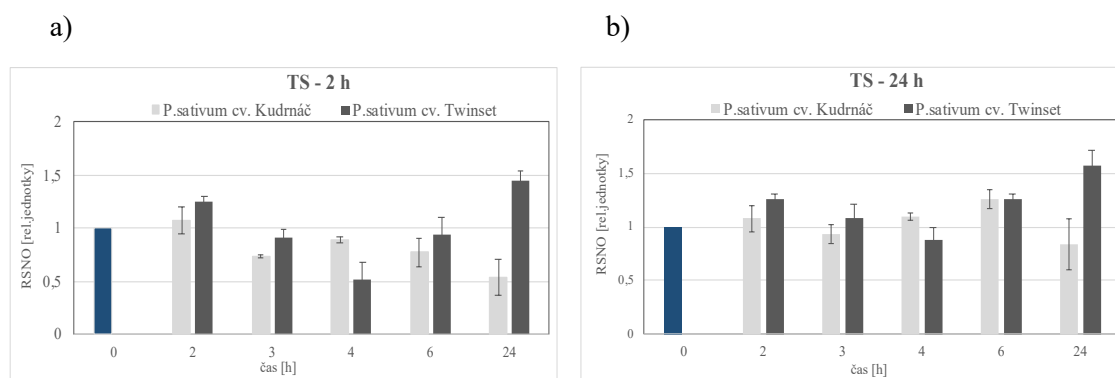
4.2.1 Savillova metoda

První metodou pro stanovení RSNO byla použita Savillova metoda, která je založena na spektrofotometrické detekci a kvantifikaci uvolněného NO^+ z RSNO za katalýzy Hg^{2+} soli. Obsah RSNO detekovaný v nadzemní části rostlin vystavených TS byl přepočítán na koncentraci v jednotkách $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW a vztažen k obsahu RSNO detekovaného u kontrolních rostlin v daném časovém intervalu. Obsah RSNO byl za fyziologických podmínek u obou genotypů hrachu srovnatelný (Obr. 21).



Obr. 21 Obsah S-nitrosothiolů (RSNO) stanovený za fyziologických podmínek u kultivarů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Obsah RSNO je uveden v jednotkách $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé váhy (FW). Experiment byl realizován v technickém a biologickém triplikátu.

Z výsledků uvedených na Obr. 22a lze pozorovat, že v případě krátkodobého TS byl zaznamenán mírný nárůst produkce RSNO o 10 % oproti kontrole u *P. sativum* cv. Kudrnáč a o 25 % u *P. sativum* cv. Twinset. V případě *P. sativum* cv. Kudrnáč byl pozorován pozvolný pokles obsahu RSNO, kdy po 24 h od zahájení experimentu byla hladina RSNO cca o 45 % nižší v porovnání s kontrolními rostlinami. U *P. sativum* cv. Twinset byl pokles obsahu RSNO zaznamenán do 4 h po zahájení experimentu (cca o 50 % nižší obsah RSNO v porovnání s kontrolou). Poté byl pozorován nárůst produkce RSNO. Po 24 h byla hladina RSNO nejvyšší (vyšší cca o 50 % oproti kontrolnímu vzorku) (Obr. 22a). Podobný trend změn u *P. sativum* cv. Twinset byl detekován i v případě dlouhodobého TS (Obr 22b), pouze snížení hladiny RSNO 4 h po zahájení experimentu nebylo tak výrazné jako v případě krátkodobého stresu. U *P. sativum* cv. Kudrnáč byl do 6 h TS zaznamenán mírný nárůst RSNO. Po 24 h TS byl v případě tohoto genotypu pozorován pokles obsahu RSNO. Hladina RSNO byla cca o 20 % nižší v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 22b).



Obr. 22 Grafické znázornění změn v obsahu S-nitrosothiolů (RSNO) v extraktech nadzemní části obou kultivarů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset vystavených krátkodobému (TS 2 h) a stálému teplotnímu stresu (TS 24 h). Koncentrace RSNO v jednotkách $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé váhy (FW) byla vztažena ke kontrolním vzorkům v daném časovém intervalu. Experiment byl realizován v technickém a biologickém triplikátu.

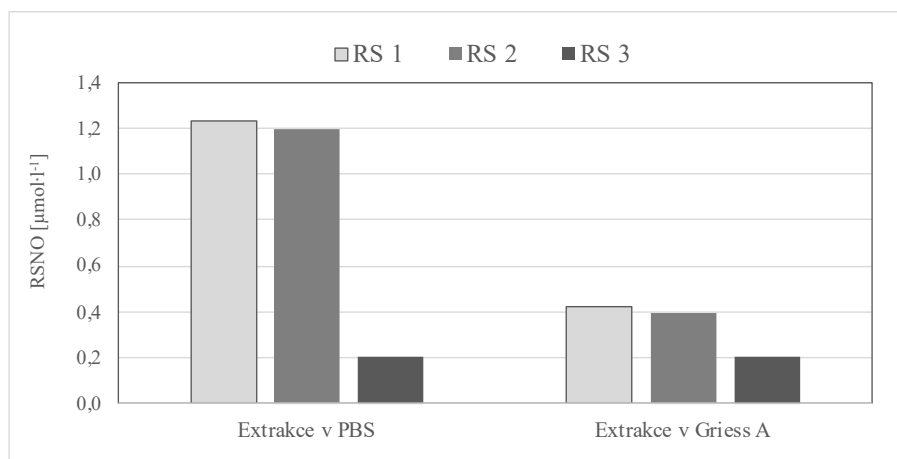
4.2.2 Chemiluminiscenční metoda s využitím NO analyzátoru

Druhou metodou, kterou byly detekovány RSNO v extraktech nadzemní části hrachu setého, byla chemiluminiscenční metoda využívající NO analyzátor. Byly testovány optimální podmínky pro analýzu RSNO. Jako standard byl použit roztok GSNO.

4.2.2.1 Testování podmínek stanovení RSNO s využitím NO analyzátoru

Byly porovnány výsledky dosažené při extrakci pomocí extrakčního pufru PBS nebo činidla Griess A. Dále byly testovány 3 typy reakční směsi (RS), ve kterých probíhá rozklad RSNO. Byla použita trijodidová a Cu^+ /Cys reakční směs, jejichž složení je popsáno v kap. 3.1.8.2. Do RS bylo aplikováno vždy 10 μl vzorku.

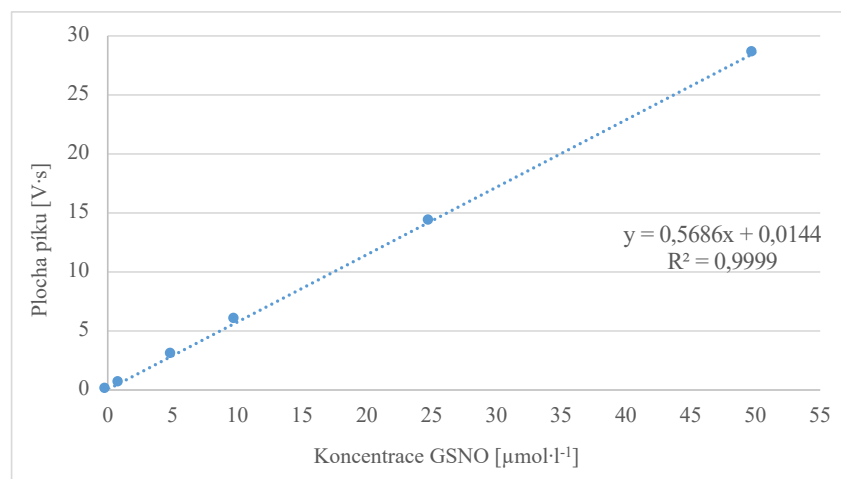
Pro testování extrakčních roztoků a RS byla použita nadzemní část rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč po vystavení krátkodobému TS (2 h). Rostliny byly odebrány 6 h po zahájení experimentu. Odběr v daném čase experimentu byl zvolen na základě orientačních výsledků uvedených v diplomové práci Mgr. J. Štanclové (Štanclová, 2019), kde byla v daném rostlinném materiálu v rámci orientačního měření stanovena pomocí Savillovy metody nejvyšší hladina RSNO.



Obr. 23 Grafické znázornění vlivu extrakce a složení reakční směsi (RS) na stanovení S-nitrosothiolů (RSNO) s využitím NO analyzátoru. Pro experiment byly použity 3 typy RS a 2 typy extrakčního činidla. Pro analýzu byl použit extrakt nadzemní části *P. sativum* cv. Kudrnáč vystavený krátkodobému teplotnímu stresu (2 h) (odběr po 6 h od zahájení experimentu). Jedná se o orientační měření, které nebylo provedeno v biologickém triplikátu.

U vzorků po extrakci do PBS byl detekován významně intenzivnější signál v porovnání se vzorky po extrakci činidlem Griess A (Obr. 23). Je zřejmé, že použitím činidla Griess A byl eliminován vliv přítomných dusitanů na stanovení RSNO. Rozdílné koncentrace použitých složek v trijodidových RS 1 a 2 neměly efekt na detekovaný signál. V případě použití Cu⁺/Cys RS významně snížený signál ve vzorcích po extrakci v PBS potvrzuje účinnost této reakční směsi na eliminaci vlivu dusitanů při stanovení RSNO. Efekt Cu⁺/Cys RS je na eliminaci dusitanů účinnější ve srovnání s vlivem extrakce činidlem Griess A, což naznačuje porovnání signálů stanovených ve vzorcích po extrakci činidlem Griess A detekovaných v trijodidové a Cu⁺/Cys RS. Z výsledků vyplývá, že při použití Cu⁺/Cys RS nemá typ extrakce vliv na detekovaný signál. Detekovaný signál pro RSNO v extraktech byl na hranici limitu detekce a kvantifikace (LOD = 0,06 µmol·l⁻¹ a LOQ = 0,2 µmol·l⁻¹ (Mito *et al.*, 2017).

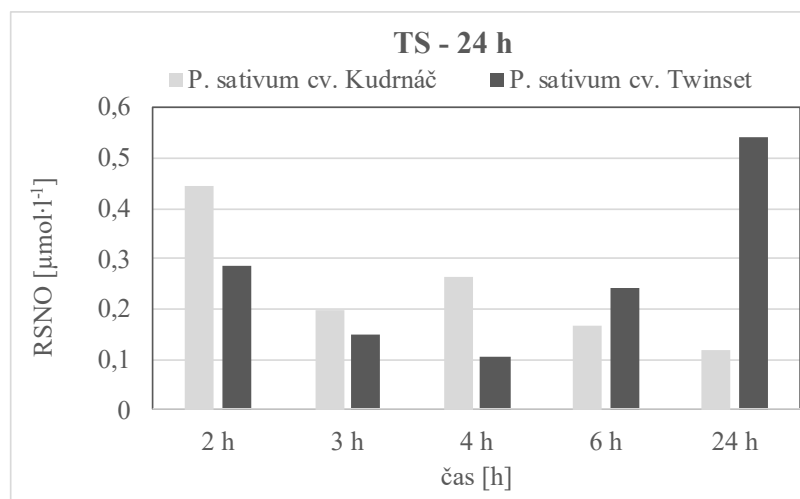
Pro výpočet koncentrace celkových RSNO ve vzorku byla sestavena kalibrační křivka s využitím standardu GSNO o koncentraci 1, 5, 10, 25 a 50 µmol·l⁻¹ (Obr. 24).



Obr. 24 Kalibrační křivka stanovená pro detekci S-nitrosothiolů (RSNO) NO analyzátořem s využitím standardu S-nitrosoglutathionu (GSNO). Měření proběhlo v technickém triplikátu.

4.2.2.2 Orientační stanovení RSNO s využitím NO analyzátořu

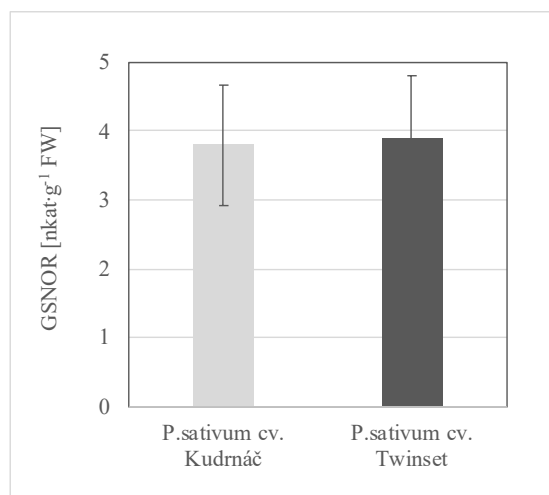
Z důvodů velmi nízkého signálu pro RSNO detekovaného v rostlinných vzorcích s využitím NO analyzátořu bylo provedeno pouze orientační stanovení RSNO v extraktech nadzemních částí rostlin obou genotypů vystavených po celou dobu experimentu TS (Obr. 25). Extrakce byla provedena pomocí činidla Griess A a pro detekci RSNO byla použita trijodidová RS. Změny v obsahu RSNO v průběhu TS odpovídají změnám detekovaným Savillovou metodou. V případě rostlin *P. sativum* cv. Twinset byl zachycen pokles obsahu RSNO do 4. h po zahájení experimentu a následný významný nárůst obsahu RSNO. V případě *P. sativum* cv. Kudrnáč byl zaznamenán pokles obsahu RSNO v průběhu experimentu. Z důvodů velmi nízkých signálů na úrovni detekčního limitu stanovených metodou využívající NO analyzátoř, bylo stanovení RSNO v biologickém triplikátu realizováno Savillovou metodou (kap. 4.2.1).



Obr. 25 Obsah S-nitrosothiolů (RSNO) v extraktech (v činidle Griess A) nadzemní části obou kultivarů *P. sativum* cv. Kudrnáč a cv. Twinset vystavených dlouhodobému teplotnímu stresu po dobu 24 h (TS 24 h). Pro detekci byla použita trijodidová reakční směs. Koncentrace RSNO je uvedena v jednotkách $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jedná se o orientační měření, které nebylo provedeno v biologickém triplicátu.

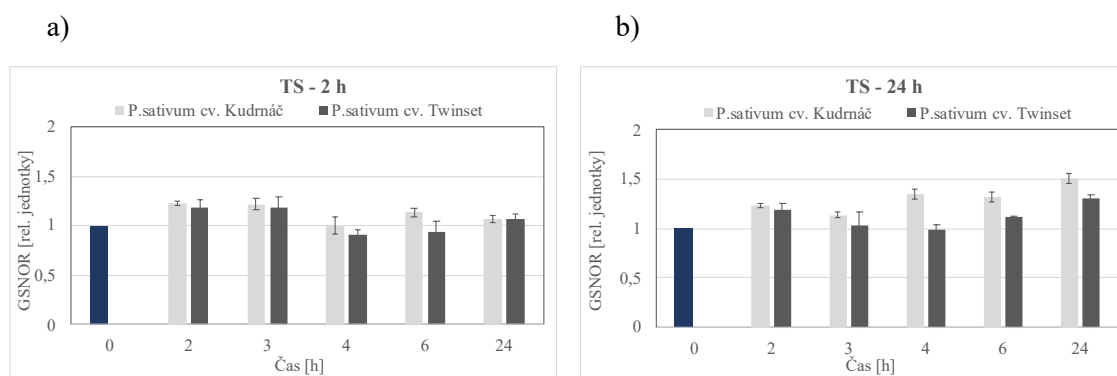
4.3 Stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy

Enzym GSNOR, katalyzující NADH-dependentní redukci substrátu GSNO, je jedna z klíčových složek obranného mechanismu zabráňující nadměrné akumulaci RSNO za stresových i fyziologických podmínek. Aktivita GSNOR byla stanovena spektrofotometricky v extraktech nadzemních částí obou genotypů hrachu setého při 340 nm, kdy detekujeme pokles absorbance v důsledku spotřeby kofaktoru NADH za současné redukce GSNO. Aktivita GSNOR byla přepočtena na gram čerstvé váhy ($\text{nkat}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$) a vztažena k aktivitě GSNOR kontrolních nestresovaných rostlin v daném časovém intervalu. Aktivita GSNOR byla za fyziologických podmínek u obou genotypů hrachu srovnatelná (Obr. 26).



Obr. 26 Aktivita S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) stanovená u extraktů nadzemní části obou kultivarů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset za fyziologických podmínek. Experiment byl realizován v technickém a biologickém triplikátu.

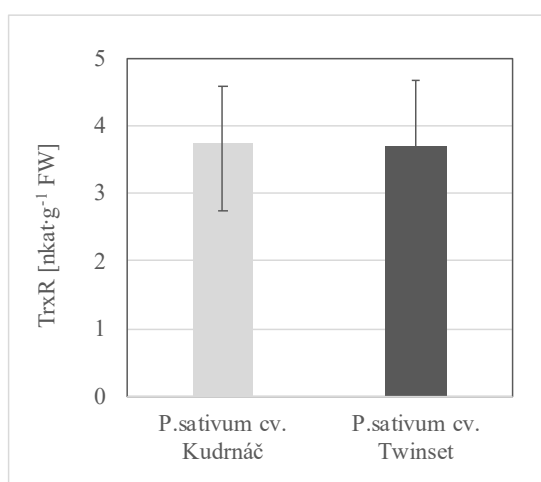
U obou kultivarů hrachu setého vystaveného TS byla pozorována změna v aktivitě GSNOR v závislosti na délce působení TS. Po 2 h působení TS bylo pozorováno u obou kultivarů zvýšení aktivity GSNOR přibližně o 20 % (Obr. 27). V případě krátkodobého TS se aktivita GSNOR do 24 h po zahájení experimentu snížila zpět na fyziologické hodnoty. Nebyl pozorován rozdíl ve změnách aktivity GSNOR u jednotlivých genotypů hrachu (Obr. 27a). V případě kontinuálního vystavení rostlin TS byl zaznamenán u obou genotypů postupný nárůst aktivity GSNOR (Obr. 27b). Detekované změny byly významnější u genotypu *P. sativum* cv. Kudrnáč, kdy po 24 h působení TS se zvýšila aktivita GSNOR až o 50 % v porovnání s kontrolními rostlinami.



Obr. 27 Změna aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) stanovené v nadzemní části obou kultivarů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset vystavených krátkodobému (TS 2 h) a stálému teplotnímu stresu (TS 24 h). Aktivita GSNOR byla vztažena ke kontrolním vzorkům v daném časovém intervalu. Experiment byl realizován v technickém a biologickém triplikátu.

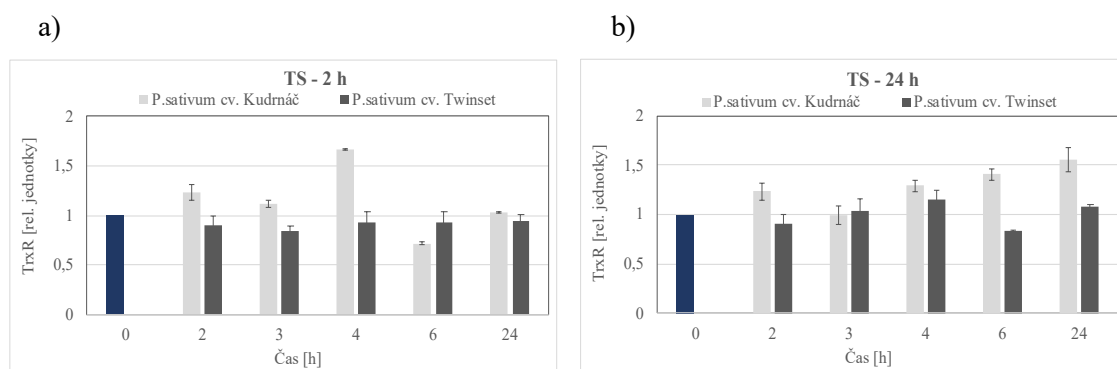
4.4 Stanovení aktivity thioredoxinreduktasy

Enzym TrxR je druhou klíčovou složkou regulující nadměrnou akumulaci RSNO. Aktivita TrxR byla stanovena spektrofotometricky. TrxR katalyzuje přeměnu substrátu DTNB za současné oxidace NADPH. Produkt reakce lze detekovat spektrofotometricky při 412 nm. Aktivita TrxR byla přepočtena na gram čerstvé váhy ($\text{nkat}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$). Aktivita TrxR byla za fyziologických podmínek u obou genotypů hrachu srovnatelná (Obr. 28).



Obr. 28 Aktivita thioredoxinreduktasy (TrxR) stanovená u extraktů nadzemní části obou kultivarů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset za fyziologických podmínek. Experiment byl realizován v technickém a biologickém triplikátu.

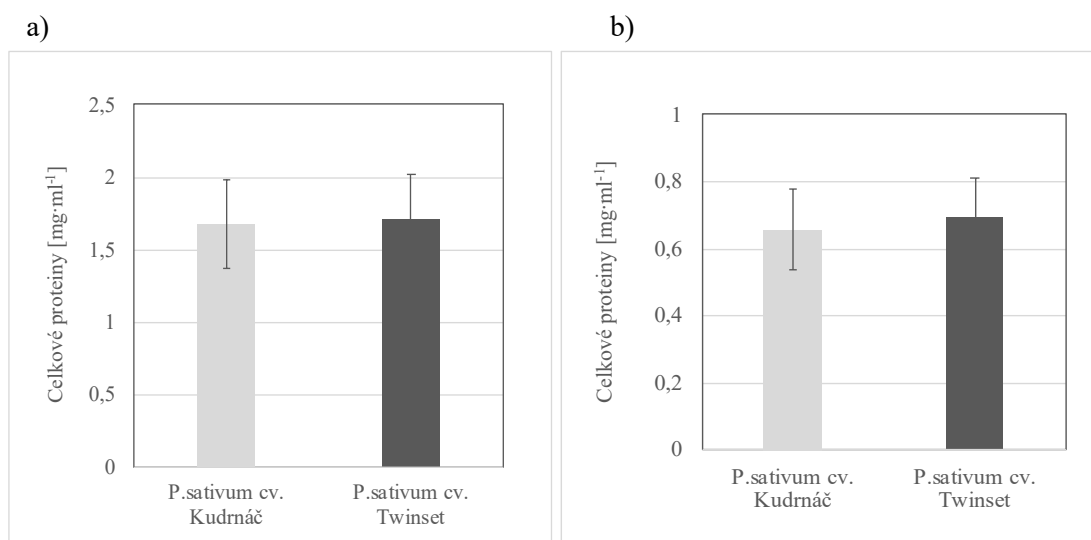
Po 2 h TS byl zaznamenán nárůst aktivity TrxR (cca o 30 %) pouze u rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč (Obr. 29). U tohoto kultivaru vystaveného krátkodobému TS bylo detekováno významné skokové navýšení TrxR aktivity (cca o 70 %) 4 h po zahájení experimentu. Následně aktivity TrxR byly srovnatelné s aktivitami detekovanými v kontrolních rostlinách. U rostlin *P. sativum* cv. Twinset vystavených krátkodobému TS byla po celou dobu experimentu pozorována mírně snížená aktivita TrxR (cca o 5-15 % oproti kontrolním vzorkům) (Obr. 29a). V případě stálého TS u rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč byl zaznamenán postupný nárůst aktivity TrxR. 24 h po zahájení experimentu byla aktivita TrxR cca o 60 % vyšší oproti kontrolnímu vzorku. Změny v aktivitách TrxR u rostlin *P. sativum* cv. Twinset podobně jako v případě krátkodobého stresu byly minimální. V případě dlouhodobého působení TS byl zaznamenán mírný nárůst aktivity 4 h po zahájení experimentu (cca o 15 %) (Obr. 29b).



Obr. 29 Změna aktivity thioredoxinreduktasy (TrxR) stanovené v nadzemní části obou kultivarů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset vystavených krátkodobému (TS 2 h) a stálému teplotnímu stresu (TS 24 h). Aktivita TrxR byla vztažena ke kontrolním vzorkům v daném časovém intervalu. Experiment byl realizován v technickém a biologickém triplikátu.

4.5 Stanovení proteinů

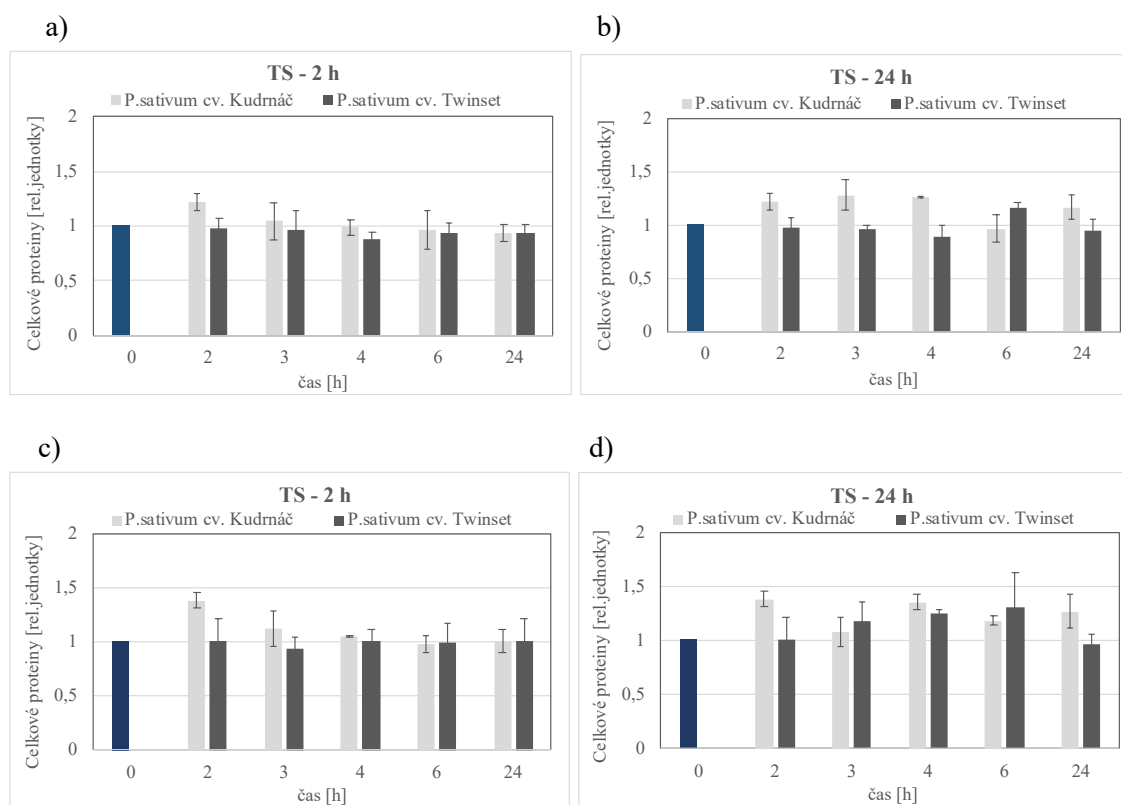
Koncentrace celkových proteinů v extraktech nadzemní části hrachu byla stanovena spektrofotometricky metodou Bradforda. Pro výpočet byla použita kalibrační křivka s příslušnou rovnicí lineární regrese. Koncentrace je uvedena v jednotkách $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, přičemž u obou genotypů hrachu (*P. sativum* cv. Kudrnáč a cv. Twinset) rostoucích za fyziologických podmínek byly hodnoty v rámci stejného použitého extrakčního pufru srovnatelné (Obr. 30). Při porovnání množství vyextrahovaných celkových proteinů při použití dvou extrakčních roztoků lze pozorovat, že v extraktech získaných použitím extrakčního pufru pro stanovení aktivity GSNOR ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pufr pH 7,5; 0,2% Triton X-100; $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT; $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ AEBSF) byla zaznamenána více než 2x vyšší koncentrace celkových proteinů (Obr. 30a) oproti extraktům získaných použitím extrakčního pufru pro stanovení aktivity TrxR ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátový pufr pH 7; $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA- Na^+)(Obr. 30b).



Obr. 30 Obsah celkových proteinů stanovený v extraktech nadzemní části obou kultivarů hrachu (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset) rostoucích za fyziologických podmínek. Byly použity 2 odlišné extrakční pufrů a) pro stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) a b) pro stanovení aktivity thioredoxinreduktasy (TrxR) (složení v kap. 3.1.5). Experimenty byly realizovány v technickém a biologickém triplikátu.

Detekované změny v obsahu celkových proteinů po vystavení rostlin krátkodobému TS při použití dvou různých extrakčních roztoků byly srovnatelné. Zvýšený obsah proteinů byl zaznamenán pouze u *P. sativum* cv. Kudrnáč po 2 h od zahájení experimentu. V případě kultivaru *P. sativum* cv. Twinset nebyl detekován významný vliv TS na obsah proteinů (Obr. 31a, c).

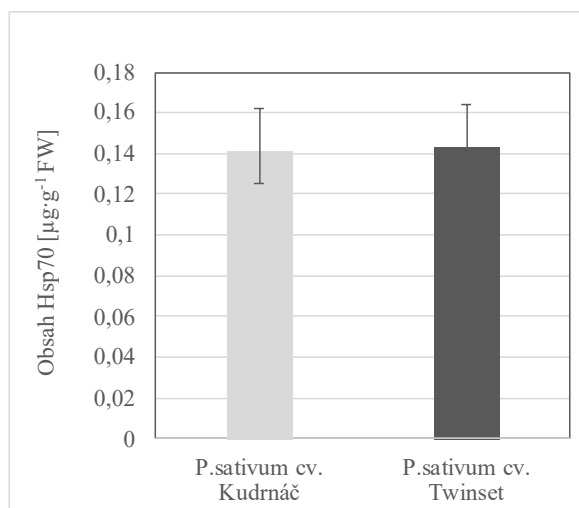
V případě stálého vystavení rostlin TS u *P. sativum* cv. Kudrnáč byla zaznamenána zvýšená koncentrace proteinů (cca o 20-40 %) po celou dobu experimentu a to v případě obou forem extrakcí (Obr. 31b, d). Zatímco u *P. sativum* cv. Twinset bylo detekováno zvýšení obsahu proteinů pouze po 6 h působení TS při použití extrakčního pufru pro stanovení aktivity GSNOR (složení v kap. 3.1.5) (Obr. 31b), v případě použití extrakčního pufru pro stanovení aktivity TrxR (složení v kap. 3.1.5) byl zvýšený obsah proteinů detekován po 3-6h působení TS (Obr. 31d).



Obr. 31 Změna koncentrace celkových proteinů v extraktech nadzemní části u obou kultivarů hrachu (*P. sativum* cv. Kudrnáč a cv. Twinset) vystavených a) a c) krátkodobému (TS 2 h), b) a d) dlouhodobému (TS 24 h) teplotnímu stresu. Byl použit extrakční pufr pro stanovení aktivity a) a b) S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR), c) a d) thioredoxinreduktasy (TrxR) (složení v kap. 3.1.5). Experiment byl realizován v technickém a biologickém triplikátu.

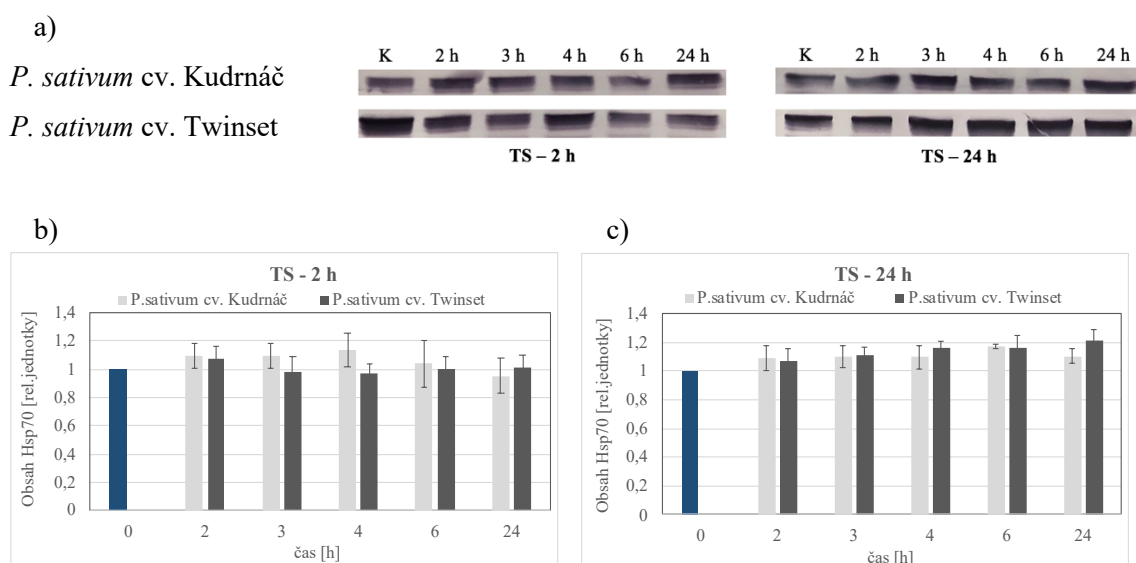
4.6 Detekce heat shock proteinů 70 metodou Western blot

Tvorba Hsp patří mezi důležité ochranné mechanismy napomáhající skládání a seskupení proteinů za fyziologických podmínek, nicméně jsou taktéž zodpovědné za znovusložení proteinů při působení stresu. TS patří mezi typické spouštěče zvýšení tvorby Hsp. Chaperony Hsp70 tvoří vysoce konzervovaný genetický systém a jejich syntéza je v reakci na stres univerzální. Detekce obsahu Hsp70 byla provedena metodou Western blot. Byly analyzovány extrakty nadzemních částí u obou kultivarů hrachu (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset) vystavených krátkodobému a stálému TS. Intenzita signálu byla vyhodnocena denzitometricky v programu ImageJ. Množství Hsp70 bylo vyhodnoceno na základě použití standardu Hsp70 o známé koncentraci a přepočteno na $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW. Množství Hsp70 bylo za fyziologických podmínek u obou genotypů hrachu srovnatelné (Obr. 32).



Obr. 32 Obsah heat shock proteinu 70 (Hsp70) v nadzemní části obou kultivarů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset rostoucích za fyziologických podmínek. Koncentrace Hsp70 je uvedena v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé váhy (FW). Experiment byl realizován v biologickém triplikátu.

V případě krátkodobého TS byl po 2 h vystavení rostlin působení zvýšené teploty zaznamenán mírný nárůst obsahu Hsp70 (cca o 10 %) u obou genotypů (*P. sativum* cv. Kudrnáč a cv. Twinset). U kultivaru *P. sativum* cv. Kudrnáč byl zvýšený obsah Hsp70 (cca o 10-15 %) detekován i po ukončení TS a to až do 6 h od zahájení experimentu. Naopak u *P. sativum* cv. Twinset byl obsah Hsp70 po ukončení TS srovnatelný s kontrolou (Obr. 33a, b). U rostlin vystavených dlouhodobému TS byla zaznamenána postupně se zvyšující produkce Hsp70 (v rozmezí 10-20 %) u obou genotypů hrachu po celou dobu experimentu (Obr. 33a, c).



Obr. 33 Změna obsahu heat shock proteinu 70 (Hsp70) stanovená v extraktech nadzemní části obou kultivarů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset vystavených krátkodobému (TS

2 h) a stálému teplotnímu stresu (TS 24 h). a) imunochemická detekce Hsp70, b) změny v obsahu Hsp70 (po denzitometrickém vyhodnocení intenzity bandů Hsp70 v programu ImageJ). Experiment byl realizován v biologickém triplikátu. K směsný extrakt ze všech kontrolních rostlin daného kultivaru.

5 DISKUZE

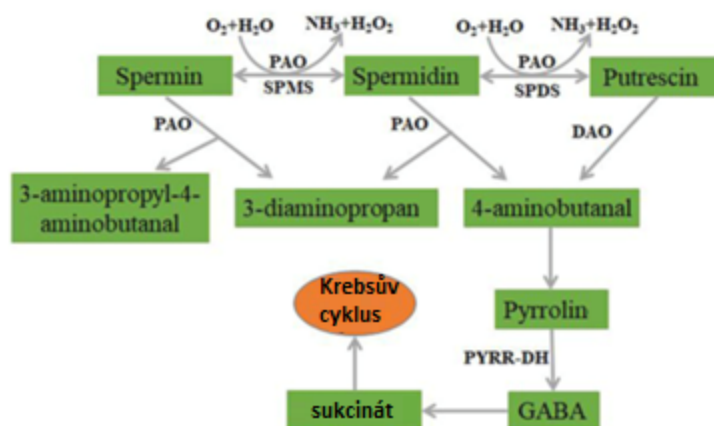
Mezi významné faktory ovlivňující fyziologické, biochemické a metabolické procesy u rostlin patří působení vysokých teplot, které mají negativní dopad na růst a vývoj celé rostliny. TS se následně projevuje v zemědělství nízkou produktivitou a zhoršenou kvalitou plodin. Rostlina je schopna v reakci na stres aktivovat řadu obranných mechanismů, mezi které patří zvýšená produkce signálních molekul, zejména ROS a RNS (Gill a Tuteja, 2010a). Dále je TS spojen se zvýšenou syntézou Hsp, fytohormonů (zejména ABA) či různých antioxidantů (Li *et al.*, 2018). V reakci na stresové podmínky byla prokázána také zvýšená produkce PA (Alcázar *et al.*, 2006).

Téma řešené v předložené diplomové práci je součástí projektu zaměřeného na úlohu PA a enzymů jejich metabolismu v obranné reakci rostlin na TS, a to zejména v souvislosti s možnou regulační funkcí NO. Práce navazuje na výsledky publikované v diplomové práci Mgr. Jany Štanclové obhájené v roce 2019. Hlavním cílem experimentální části předložené diplomové práce bylo studium vlivu krátkodobého (2 h) a dlouhodobého (24 h) TS (45 °C) na hladinu PA (Put, Cad, Spd, Spm), produkci Hsp70, obsah RSNO a aktivitu enzymů regulující jejich nadměrnou produkci – GSNOR a TrxR u dvou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset lišících se odolností vůči některým patogenům.

Po expozici rostlin TS byly pozorovány rozdílné odpovědi na úrovni studovaných parametrů u zvolených genotypů hrachu. Jedním z dílčích cílů bylo studium vlivu TS na změnu hladiny PA, které hrají důležitou roli v regulaci růstu za fyziologických i stresových podmínek (Hussain *et al.*, 2011). Mezi nejstudovanější PA patří Put, Cad, Spd a Spm. Obsah PA je značně ovlivněn produkcí ROS. Např. ve studii Shopova (2020) porovnávali účinky ROS ($^1\text{O}_2$ a O_2^-) na změnu hladiny endogenních PA (Put, Spm, Spd) a enzymové aktivity PAO a DAO u hrachu setého. Každá forma ROS vykazovala opačný účinek jak na hladinu PA, tak na aktivitu enzymů katabolizující PA, což poukazuje na skutečnost, že závisí na přítomnosti specificky indukovaných ROS (Shopova *et al.*, 2020). Změna v hladině PA byla pozorována také u rostlin rajčete vystavených vysokým a nízkým teplotám (Upadhyay *et al.*, 2020). Byl zaznamenán opačný efekt u obou typů stresu, kdy u vysokých teplot (24 h při 42 °C) došlo k poklesu hladiny Put a Spd a zároveň k vyšší expresi S-adenosylmethionindekarboxylasy a ADC katalyzující syntézu PA, zatímco u nízkých teplot (24 h při 4 °C) byl pozorován opak. Produkce PA je důležitá také pro zvýšení termotolerance rostlin, která byla předmětem studie Collado-González

(2021), kde pozorovali účinky exogenní aplikace argininu na vlastnosti rostlin kvěťáku vystaveném TS. Bylo zjištěno, že kombinace vysoké teploty (35 °C) a exogenní aplikace Arg zvýšila antioxidační aktivitu, celkový obsah fenolických sloučenin, polyaminů a proteinů. Pozitivní vliv zvýšené hladiny PA na termotoleranci a fyziologické procesy v rostlině vystavené TS byl studován také v práci Luo (2020) u rostlin jetele, u kterého pozorovali účinky exogenní aplikace Spd na zvýšení hladiny Put, Spd, Spm a celkové akumulace PA, nicméně bylo zaznamenáno také zrychlení jejich oxidace. Dále byla pozorována vyšší akumulace GABA, která je zahrnuta v obraně proti stresu (Podlešáková *et al.*, 2018). Exogenní aplikace Spd způsobila také zvýšení biosyntézy a snížení degradace chlorofylu během působení TS, což zpomalilo stárnutí rostliny. V neposlední řadě byl pozorován pozitivní vliv na regulaci exprese Hsp70 napomáhající správnému skládání proteinů při působení TS (Luo *et al.*, 2020). V této diplomové práci výsledky z analýzy stanovení PA v nadzemní části rostlin u obou genotypů hrachu pomocí UHPLC-MS poukazují na skutečnost, že u *P. sativum* cv. Twinset dochází vlivem působení krátkodobého (2 h) TS k vyšší stimulaci produkce PA, obzvláště Put a Spm, v porovnání s *P. sativum* cv. Kudrnáč, u kterého byla detekována pouze mírně zvýšená produkce Spm. Souvislost lze pozorovat i v intenzitě změn v zastoupení Put a Spm, který je následně z Put syntetizován. Nejvyšší nárůst je pozorován v případě krátkodobého stresu 4 h po zahájení experimentu, kdy naopak byl detekován významný pokles obsahu Spm. Rozdíl v reakci kultivarů na TS byl pozorován i v případě Spd, kdy naopak byla po 2 h TS detekovaná zvýšená produkce u *P. sativum* cv. Kudrnáč, zatímco hladina Spd byla u *P. sativum*, cv. Twinset snížena. U obou genotypů byl následně pozorován v případě krátkodobého stresu pokles hladiny Spd. V případě dlouhotrvajícího TS byly u obou genotypů detekovány největší změny v produkci Spd a to po 3 h působení TS. S výjimkou Spm byl zaznamenán po 24 h pokles v hladinách stanovovaných PA. Z výsledků vyplývá, že změny v obsahu PA po vystavení rostlin TS budou záviset jak na použitém kultivaru hrachu, tak typu stresu (krátkodobý x dlouhodobý) a projeví se v rozdílném zastoupení jednotlivých forem PA.

S obsahem PA úzce souvisí i možné změny v aktivitách enzymů katabolismu PA v rámci obranných reakcí na TS. Na Obr. 34 jsou přehledně uvedeny změny v rámci katabolismu PA, které mohou vést až k produkci GABA.



Obr. 34 Schéma znázorňující katabolismus polyaminů v rostlině. GABA kyselina γ -aminomáselná, PAO polyaminoxidasa, DAO diaminoxidasa, SPMS sperminsynthasa, SPDS spermidinsynthasa (převzato a upraveno z Chen *et al.*, 2019).

Během oxidace PA prostřednictvím katalýzy PAO a DAO vzniká H_2O_2 jako vedlejší produkt (Cona *et al.*, 2006). Jedná se o důležitou signální molekulu zprostředkovávající buněčnou smrt, hypersenzitivní odpověď a expresi obranných genů. Vzniklé aminoaldehydy se následně účastní syntézy sekundárních metabolitů a vzniku tolerance vůči abiotickému stresu (Cona *et al.*, 2006). V následujících krocích katabolismu PA sehrává důležitou roli enzym AMADH, který katalyzuje přeměnu aminoaldehydů na příslušnou aminokyselinu. Je produkována např. GABA, jejíž akumulace je při působení stresových podmínek nezbytná pro správný růst rostliny (Chen *et al.*, 2019). Je známo, že exogenní aplikace GABA vede ke zvýšení tolerance rostlin vůči stresu prostřednictvím modulace exprese genů spojených s rostlinnou signalizací, regulací transkripce, biosyntézou fytohormonů, produkcí ROS a metabolismem PA (Podlešáková *et al.*, 2018). Dále je známo, že inhibice enzymu AMADH má za následek snížení produkce GABA, která v rámci regulace rostlinné odpovědi na stres zahrnuje také kontrolu produkce NO, jehož nadměrná akumulace může způsobit nitrosační stres (Corpas a Barroso, 2013). GABA může vznikat nejen rozkladem PA, ale také z Glu za katalýzy glutamátdekarboxylasy. Metabolismus Glu je modulován prostřednictvím signalizace fytohormonů a zároveň je regulován produkcí NO a ROS (Podlešáková *et al.*, 2018). Při porovnání změn v hladinách PA a aktivitách DAO a AMADH, které byly detekované v rámci diplomové práce Jany Štanclové (Štanclová, 2019) je zřejmé, že podobně jako v případě zvýšené produkce PA u *P. sativum* cv. Twinset byla po krátkodobém stresu stanovena také významně zvýšená aktivita AMADH, naopak u *P. sativum* cv. Kudrnáč byla aktivita AMADH po 2 h stresu významně snížena. V případě

dlouhodobého stresu u *P. sativum* cv. Kudrnáč byla aktivita AMADH významně snížena po celou dobu experimentu, zatímco u *P. sativum* cv. Twinset nebyly změny v aktivitě AMADH detekovány. Je zajímavé, že v případě DAO byla aktivita v důsledku krátkodobého i dlouhodobého stresu u obou kultivarů snížena s výjimkou mírného nárůstu aktivity u *P. sativum* cv. Kudrnáč 4 h po zahájení experimentu v případě krátkodobého stresu.

Při působení abiotického stresu dochází v rámci obranného mechanismu ke zvýšené produkci RNS, z nichž nejdůležitější úlohu zastává molekula NO, která je schopna interagovat s thiolovými skupinami proteinů za vzniku RSNO (Fancy *et al.*, 2017). Tato PTM zvaná S-nitrosylace je považována za jednu z nejdůležitějších modifikací v rámci regulace proteinů zahrnutých v obraně proti stresu. Mezi enzymy, jejichž aktivita může být regulována prostřednictvím S-nitrosylace, patří např. antioxidační enzymy (CAT, SOD, APX), enzymy fotosyntézy (Rubisco), GSNOR či NADPH oxidasa (Hu *et al.*, 2015; Lindermayr, 2018; Puyaubert *et al.*, 2014). V rámci pilotních experimentů (nepublikované výsledky diplomové práce J. Štanclové (2019) a bakalářské práce K. Vrbové (2019)) bylo potvrzeno, že v případě AMADH se může na regulaci aktivity tohoto enzymu podílet NO prostřednictvím S-nitrosylace. Byl prokázán inhibiční efekt u hrachu setého ošetřeného donory NO. Tento způsob regulace nebyl pozorován v případě DAO (bakalářská práce K. Vrbová, 2019). Jedním z původních cílů této diplomové práce bylo prokázání S-nitrosylace klíčových enzymů katabolismu PA, ale z časových důvodů (omezení výuky na VŠ v důsledku pandemie) nebyly již realizovány experimenty využívající metodu biotin switch, které by potvrdily předpokládanou roli S-nitrosylace v regulaci aktivity AMADH. V rámci této části studie byly detekovány změny v produkci RSNO u extraktů z nadzemní části obou genotypů hrachu v závislosti na délce působení TS a tyto výsledky byly porovnány s výsledky diplomové práce Štanclové (2019), kde byla studována změna aktivit enzymů AMADH a DAO u rostlin hrachu vystavených TS (stejně podmínky). U extraktů z nadzemní části rostlin *P. sativum* cv. Twinset vystavených krátkodobému TS byl ve 4 h experimentu detekován významný pokles zastoupení RSNO (cca o polovinu nižší oproti kontrolní rostlině), zatímco byla detekována více než dvojnásobně zvýšená aktivita AMADH. Tyto výsledky poukazují na možný inhibiční efekt S-nitrosylace na aktivitu enzymu AMADH v průběhu TS.

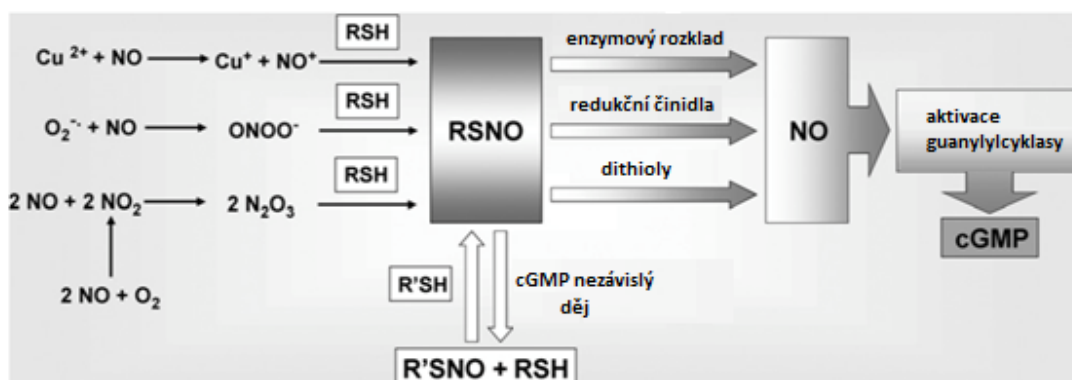
PTM S-nitrosylací patří mezi reverzibilní mechanismus a vzniklé RSNO mohou být regulovány enzymovými drahami zahrnujícími klíčové denitrosylační enzymy GSNOR a TrxR za fyziologických a stresových podmínek (Hess a Stamler, 2012). V práci Corpas

(2008b) se zabývali studiem metabolismu RNS u extraktů z nadzemní části hrachu setého vystaveného různým abiotickým stresům, včetně TS (1 h 30 °C; 1 h 35 °C; 4 h 38 °C). Expozice TS způsobila až trojnásobné zvýšení obsahu RSNO oproti kontrole, což bylo detekováno pomocí chemiluminiscenční metody s využitím NO analyzátoru. Bylo pozorováno také 50% zvýšení aktivity GSNOR pomocí spektrofotometrického měření. Dalším dílčím cílem předložené diplomové práce bylo stanovení vlivu TS na aktivity enzymů GSNOR a TrxR. Nejvýznamnější změny v aktivitách studovaných enzymů byly detekovány v případě dlouhotrvajícího TS u *P. sativum* cv. Kudrnáč a to 24 h po zahájení experimentu, kdy byl současně detekován i pokles hladiny RSNO. Opačný efekt je pozorován u *P. sativum* cv. Twinset, u dlouhodobého i krátkodobého TS, kdy nedochází v daném časovém intervalu k významným změnám aktivit GSNOR a TrxR, ale naopak je detekována zvýšená produkce RSNO. V případě krátkodobého TS u *P. sativum* cv. Twinset se detekovaná zvýšená aktivita zejména TrxR 3 h po zahájení experimentu může podílet na zaznamenaném poklesu obsahu RSNO po 4 h experimentu.

V rámci diplomové práce byly použity dvě metody stanovení RSNO: chemiluminiscenční metoda a spektrofotometrická Savillova metoda, které se liší specifitou, citlivostí, finanční a časovou náročností. Chemiluminiscenční metoda využívající skleněnou aparaturu s NO analyzátozem je vhodná především z důvodů nízkého detekčního limitu, nicméně její provedení je časově náročnější a zahrnuje složitější preanalytickou úpravu vzorků (Giustarini et al., 2007). Pro stanovení RSNO pomocí chemiluminiscence je nejčastěji využívána trijodidová metoda, která vyžaduje preanalytickou úpravu vzorku přidávkem sulfanilamidu v kyselém prostředí pro odlišení signálu odpovídající RSNO či dusitanům, které způsobují interferenci (Marley 2000). Ve vzorku jsou v menším množství obsaženy také nitrosylované komplexy železa, které lze odlišit použitím HgCl₂ (Basu 2008). Větší specifitu pro stanovení RSNO vykazuje Cu⁺/Cys metoda, neboť nedochází k interferenci dusitanů a dusičnanů (příp. dalších NO_x) díky přítomnosti neutrálního prostředí v RS. Během reakce dochází k transnitrosaci mezi RSNO a přítomného Cys, vzniklý NO⁺ je redukován pomocí Cu⁺ za vzniku NO a Cu²⁺, který je zpět redukován pomocí Cys (Giustarini et al., 2007). V mé práci bylo provedeno testování trijodidové a Cu⁺/Cys RS a zároveň byl porovnán vliv dvou extrakčních činidel (PBS a Griess A) na stanovení RSNO u extraktu nadzemní části *P. sativum* cv. Kudrnáč vystaveném 2 h TS (odebráno po 6 h od začátku experimentu). U vzorků po extrakci do PBS byl pozorován značně vyšší signál v porovnání signálu u vzorků po extrakci do Griess A. Je zřejmé, že Griess A obsahující sulfanilamid v kyselém prostředí

eliminovat přítomné dusitany. Výsledné signály u vzorků po extrakci do Griess A detekovaných v trijodidové a Cu^+/Cys RS potvrzují vysokou účinnost Cu^+/Cys RS na eliminaci dusitanů. Bylo taktéž potvrzeno, že typ extrakce při použití Cu^+/Cys RS neměl vliv na detekovaný signál. Lze pozorovat, že použití Cu^+/Cys RS je na eliminaci dusitanů účinnější, než extrakce v činidlo Griess A. Množství detekovaných RSNO v extraktu se blížil limitu detekce a kvantifikace ($\text{LOD} = 0,06 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $\text{LOQ} = 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Mito *et al.*, 2017). Z tohoto důvodu bylo provedeno pouze orientační stanovení RSNO v extraktech nadzemních částí obou genotypů hrachu vystavených po celou dobu experimentu TS (45°C). Extrakce byla provedena v Griess A s použitím trijodidové RS. Byl pozorován stejný trend ve změnách obsahu RSNO u obou genotypů hrachu v porovnání se Savillovou metodou. Množství detekovaných RSNO se blížil LOD a LOQ u extraktů obou genotypů hrachu. Vzhledem k orientačním výsledkům detekovaného množství RSNO v extraktech nadzemní části hrachu by bylo vhodné pro následující použití této metody stanovit kalibrační přímku v rozpětí $0\text{--}5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Z důvodů nízkých signálů získaných chemiluminiscenční metodou bylo stanovení RSNO v biologickém triplikátu realizováno pouze Savillovou metodou. Tato spektrofotometrická metoda je rychlá, levná a nenáročná, ale má mnoho nevýhod. Stanovení RSNO je ovlivněno značným množstvím interferentů (dusitany, thioly, askorbát, ionty kovů), je méně citlivá ($\text{LOD} = 0,77 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $\text{LOQ} = 2,57 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a je zapotřebí velké množství extraktu (Mito *et al.*, 2017). Značný rozdíl v detekci RSNO při použití chemiluminiscenční a Savillovy metody mohl být způsoben několika faktory. Jedním z nich je přítomnost interferujících látek ve vzorku, které mohou dávat falešně pozitivní výsledky, přičemž každá metoda je ovlivněna jinými interferenty. Také je důležitá správná manipulace se vzorkem, který musí být udržován při nízkých teplotách (4°C) a ve tmě kvůli vysoké citlivosti vazby S-NO na přímé světlo (Giustarini *et al.*, 2007). Výsledky mohly být ovlivněny nejen přípravou a preanalytickou úpravou vzorku, ale také nedostatečnou účinností RS, která musí být při použití chemiluminiscenční metody během měření vyměňována. Otázkou zůstává, zda by použití většího objemu vzorku aplikovaného do RS neposkytovalo spolehlivější výsledky. U nastavení NO analyzátoru hraje roli také zvolení rozsahu měření. Dle Mito (2017) nebylo dosaženo LOD ($0,06 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) pravděpodobně z důvodu nedostatečné citlivosti detekce. Detekce RSNO u chemiluminiscenční metody mohou být zkreslené také z důvodu dodatečné S-nitrosace, které se dá dle Marley (2000) zabránit použitím N-ethylmaleimidu zajišťující

alkylaci volných -SH skupin a stabilizaci RSNO. Obecně je známo, že stanovení RSNO *in vivo* je velmi obtížné, neboť je jejich koncentrace v biologických materiálech nízká a detekce je ztížena také jejich vysokou nestabilitou v důsledku neenzymové a enzymové degradace či přítomností přechodných kovů, kyslíku a světla (Obr. 35) (Stamler a Toone, 2002).



Obr. 35 Shrnutí hlavních metabolických drah S-nitrosothiolů (RSNO). cGMP cyklický guanosinmonofosfát, ONOO⁻ peroxydusitan, O₂⁻ superoxidový radikál, RSH a R'SH thioily, NO⁺ nitrosylový kation (převzato a upraveno z Giustarini *et al.*, 2007).

Z výsledků stanovení RSNO Savilovou metodou u extraktů z nadzemní části rostlin hrachu vystavených po 2 h TS byl pozorován nárůst hladiny RSNO pouze u *P. sativum* cv. Twinset. U tohoto kultivaru byl pozorován pokles obsahu RSNO do 4 h TS a poté se hladina RSNO postupně zvyšovala. Nejvýznamnější nárůst obsahu RSNO byl detekován po 24 h a to jak v případě krátkodobého tak i dlouhodobého TS. U *P. sativum* cv. Kudrnáč byl zaznamenán pokles obsahu RSNO. Kultivary hrachu použité ve studii se liší odolností vůči patogenu, z výsledků je zřejmé, že v rámci obranných reakcí budou důležitou roli hrát RNS, jejichž produkce byla po TS detekována vyšší právě u na tatogeny odolnějšího kultivaru *P. sativum* cv. Twinset.

Při působení TS dochází k denaturaci a chybnému skládání proteinů, proto je indukována zvýšená produkce Hsp pro obnovení jejich konformace v rámci obranné reakce na abiotický stres (Swindell *et al.*, 2007). Zvýšená produkce Hsp je hlavním znakem pro vysokoteplotní stres, nicméně jejich role je zahrnuta také při působení dalších stresových faktorů, jako je chlad, sucho, salinita, patogenní infekce či oxidační stres (Jacob *et al.*, 2017). Zvýšená exprese Hsp je spojena se zvýšením tolerance u rostlin vystavených TS, nicméně mechanismus, prostřednictvím kterého Hsp napomáhají rostlinám získat termotoleranci je stále předmětem výzkumu (Mishra *et al.*, 2018).

Je známo, že Hsp fungují ve spojení s Hsf, které hrají klíčovou roli v signální kaskádě zprostředkující expresi a regulaci genů souvisejících s obranou proti abiotickému stresu (Guo *et al.*, 2016). Produkce Hsp souvisí s metabolismem ROS, což bylo pozorováno ve studii Hu (2010), kde byla studována interakce mezi Hsp70 a antioxidační odpovědí vyvolanou ABA v kukuřici vystavené suchu či teplu. Kromě zvýšení aktivity antioxidačních enzymů (CAT, SOD, APX, GR) bylo pozorováno značné zvýšení produkce Hsp70 a H₂O₂ vlivem působení sucha, tepla, či jejich kombinací. Jejich produkce byla zastavena příslušnými inhibitory (inhibitor biosyntézy ABA: wolframan; lapač H₂O₂: KI; inhibitor Hsp70: quercetin), naopak exogenní aplikace ABA měla za následek ještě intenzivnější produkci Hsp70 a H₂O₂ a zvýšení aktivit antioxidačních enzymů. Experimenty ve studii potvrdily, že produkce H₂O₂ (indukovaná přidávkem ABA) zvyšuje produkci Hsp70 a reguluje aktivitu antioxidačních enzymů, čímž dochází k potlačení hladiny ROS (Hu *et al.*, 2010). Dílčím cílem diplomové práce byla detekce Hsp70 v extraktech nadzemní části obou genotypů hrachu vystavených TS. Je zajímavé, že v rámci naší studie nebyly detekované příliš významné změny v produkci Hsp 70. Rovněž změny v zastoupení proteinů v důsledku TS nebyly výrazné. Pouze v případě rostlin *P. sativum* cv. Kudrnáč, které byly po celou dobu experimentu vystaveny expozici 45 °C byla pozorována mírně zvýšená produkce proteinů (cca o 10-20 %).

Z dosud dosažených výsledků byly nejvýznamnější změny ve studovaných parametrech detekovány v případě *P. sativum* cv. Twinset po vystavení krátkodobému stresu. V rámci obranných reakcí budou významnou roli mít PA, a rovněž enzym podílející se na jejich katabolismu AMADH, který dle předběžných výsledků může být regulován PTM S-nitrosylací. Rovněž změny v hladinách RSNO poukazují na tento předpokládaný regulační efekt. V rámci dalších experimentů je nutné vyřešit možnou roli GABA (produkt katabolismu PA) v obranné reakci rostlin (hrachu setého) na TS. Současně je nutné metodou biotin switch ověřit, zda dochází k PTM S-nitrosylaci u AMADH v reakci na TS a zda se uplatňuje regulační efekt AMADH v důsledku změn v produkci RNS. Změny aktivity GSNOR a TrxR se dle získaných výsledků mohou podílet na regulaci hladiny RSNO.

Dosažené dílčí výsledky, včetně výsledků dosažených v diplomové práci J. Štanclové (2019), které jsou zaměřené na aktivaci obranných mechanismů vlivem působení krátkodobého (2 h) a dlouhodobého (24 h) TS u *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset, jsou shrnuty na Obr. 36. Výsledky jsou uvedeny pomocí barevné škály

odpovídající intenzitě změny daného parametru vztaženého ke kontrolní rostlině (relativní jednotky) v daném časovém intervalu (2, 3, 4, 6 a 24 h).

a)

0,4	■
0,5	■
0,6	■
0,7	■
0,8	■
0,9-1,1	■
1,2	■
1,3	■
1,4	■
1,5	■
1,6	■

b)

	Parametr	2	3	4	6	24
metabolismus PA	Putrescin					
	Kadaverin					
	Spermidin					
	Spermin					
	AMADH					
	DAO					
metabolismus RNS	RSNO					
	GSNOR					
	TrxR					
stres	Hsp70					

c)

	Parametr	2	3	4	6	24
metabolismus PA	Putrescin					
	Kadaverin					
	Spermidin					
	Spermin					
	AMADH					
	DAO					
metabolismus RNS	RSNO					
	GSNOR					
	TrxR					
stres	Hsp70					

d)

	Parametr	2	3	4	6	24
metabolismus PA	Putrescin					
	Kadaverin					
	Spermidin					
	Spermin					
	AMADH					
	DAO					
metabolismus RNS	RSNO					
	GSNOR					
	TrxR					
stres	Hsp70					

e)

	Parametr	2	3	4	6	24
metabolismus PA	Putrescin					
	Kadaverin					
	Spermidin					
	Spermin					
	AMADH					
	DAO					
metabolismus RNS	RSNO					
	GSNOR					
	TrxR					
stres	Hsp70					

Obr. 36 Schématické znázornění dosažených dílčích výsledků v rámci řešeného projektu. Změny daného parametru jsou znázorněny pomocí barevné škály (a) odpovídající relativním jednotkám (vztaženo ke kontrole v daném časovém intervalu (2, 3, 4, 6 a 24 h)). Byl studován krátkodobý (b, c) a dlouhodobý (d, e) teplotní stres (45 °C) u extraktů nadzemní části obou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč (b, d) a *P. sativum* cv. Twinset (c, e). Červeně značené parametry byly stanoveny v předložené diplomové práci, černě značené parametry byly stanoveny v diplomové práci J. Štanclové (2019). AMADH aminoaldehyddehydrogenasa, DAO diaminoxidasa, RSNO S-nitrosothioly, GSNOR S-nitrosoglutathionreduktasa, TrxR thioredoxinreduktasa, Hsp70 heat

shock proteiny 70, APX askorbátperoxidasa, GPX guajakolperoxidasa, PA polyaminy, RNS/ROS reaktivní formy dusíku/kyslíku.

6 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše zaměřená na obranné mechanismy zahrnující metabolismus reaktivních forem kyslíku a dusíku s příslušnými enzymy, dále byla popsána role oxidu dusnatého v posttranslačních modifikacích se zaměřením na S-nitrosylaci proteinů. Nakonec byla popsána úloha polyaminů v reakci na abiotický stres a úloha heat shock proteinů v rostlině.

V experimentální části diplomové práce byl studován vliv krátkodobého a dlouhodobého působení teplotního stresu při 45 °C na rostlinnou produkci polyaminů a heat shock proteinů, změnu aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) a thioredoxinreduktasy (TrxR) a intenzitu S-nitrosylace. Pro studium byly použity extrakty nadzemní části dvou genotypů hrachu setého (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset), které se liší odolností vůči některým patogenům.

Z provedených experimentů lze vyvodit následující závěry:

1. Teplotní stres způsobil vyšší produkci polyaminů, zejména Put a Spm, u *P. sativum* cv. Twinset vystaveného krátkodobému (2 h) i stálému (24 h) TS. U *P. sativum* cv. Kudrnáč byla pozorována zvýšená produkce Spd, zejména po 3 h TS.
2. Krátkodobé působení TS na *P. sativum* cv. Twinset mělo vliv na snížení hladiny RSNO od 3. h po zahájení experimentu. Ve stejném časovém intervalu byl zaznamenán postupný nárůst aktivity AMADH (nepublikované výsledky J. Štanclové, 2019). Po 4 h experimentu byl obsah RSNO nejnižší, naopak aktivita AMADH byla nejvyšší. Pravděpodobnost inhibičního efektu aktivity AMADH S-nitrosylací je nutné potvrdit metodou biotin switch.
3. Působení stálého TS mělo za následek postupné zvyšování aktivity GSNOR a TrxR u *P. sativum* cv. Kudrnáč (nejvyšší po 24 h), současně došlo k poklesu hladiny RSNO. U *P. sativum* cv. Twinset byl pozorován opačný efekt (u krátkodobého i stálého TS). Enzymy GSNOR a TrxR se mohou podílet na regulaci hladiny RSNO.
4. Výsledky stanovení RSNO Savillovou a chemiluminiscenční metodou poskytují u obou genotypů vystavených dlouhodobému TS stejný trend, nicméně z důvodů detekčního limitu byla v práci použita pro stanovení obsahu RSNO Savillova metoda.

5. Vlivem TS u *P. sativum* cv. Twinset došlo ke stejnému účinku ve změně hladiny RSNO u obou forem TS. Po 4 h experimentu byl obsah RSNO významně snížený a naopak po 24 h byla zaznamenána intenzivní produkce RSNO. U *P. sativum* cv. Kudrnáč byl pozorován mírný vzrůst pouze po 2 h TS.
6. Produkce Hsp70 v reakci na působení stálého TS byla mírně zvýšená u obou genotypů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset po celou dobu experimentu.

Dosažené výsledky poukazují na možnou roli PA u hrachu setého v rámci obranných reakcí na TS. Změny v hladinách RSNO korespondující se změnami aktivity AMADH poukazují na možnost regulace enzymu PTM S-nitrosylací. GSNOR a zejména TrxR se dle získaných výsledků mohou podílet na regulaci hladiny RSNO.

7 LITERATURA

- Abat J.K., Mattoo A.K., Deswal R. (2008): S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata* – ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition. *Febs Journal* **275**, 2862-2872.
- Alcázar R., García-Martínez J.L., Cuevas J.C., Tiburcio A.F., Altabella T. (2005): Overexpression of ADC2 in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *The Plant Journal* **4**, 425-436.
- Alcázar R., Marco F., Cuevas J.C., Patroń M., Ferrando A., Carrasco P., Tiburcio A.F., Altabella T. (2006): Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters* **28**, 1867–1876.
- Alcázar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcio A.F. (2010): Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* **231**, 1237–1249.
- Alcázar R., Parker J.E. (2011): The impact of temperature on balancing immune responsiveness and growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **16**, 666-675.
- Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357**, 593–615.
- Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R., Mohanty P. (2008): Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research* **98**, 541-550.
- Amm I., Sommer T., Wolf D.H. (2014): Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1843**, 182-196.
- Amooghaie R., Moghym S. (2011): Effect of polyamines on thermotolerance and membrane stability of soybean seedling. *African Journal of Biotechnology* **10**, 9673–9679.
- Anjum N.A., Sofo A., Scopa A., Roychoudhury A., Gill S.S., Iqbal M., Lukatkin A.S., Pereira E., Duarte A.C., Ahmad I. (2015): Lipids and proteins-major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 4099–4121.
- Asada K. (1999): The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology* **50**, 601-639.
- Astier J., Gross I., Durner J. (2018): Nitric oxide production in plants: an update. *Journal of Experimental Botany* **69**, 3401-3411.
- Bahuguna R.N., Jagadish K.S.V. (2015): Temperature regulation of plant phenological development. *Environmental and Experimental Botany* **111**, 83-90.
- Bardwell J.C.A., Craig E.A. (1987): Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homolog in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **84**, 5177-5181.
- Basu S., Wang X.D., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B. (2008): Chemiluminiscent detection of S-nitrosated proteins: Comparison of tri-iodide, copper/CO/cysteine and modified copper/cystein methods. *Nitric Oxide* **440**, 137-156.
- Begara-Morales J.C., Sanchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Perez C., Lopez-Jaramillo J., Padilla M.N., Carreras A., Corpas F.J., Barroso J.B. (2014): Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **65**, 527-538.
- 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.
- Benhar M. (2015): Nitric oxide and the thioredoxin system: a complex interplay in redox regulation. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1850**, 2476-2484.
- Ben-Lulu S., Ziv T., Admon A., Weisman-Shomer P., Benhar M. (2014): A substrate trapping approach identifies proteins regulated by reversible S-nitrosylation. *Molecular and Cellular Proteomics* **13**, 2573–2583.

- Bhattacharjee S. (2005): Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant. *Current Science* **89**, 1113-1121.
- Borisjuk L., Macherel D., Benamar A., Wobus U., Rolletschek H. (2007): Low oxygen sensing and balancing in plant seeds: a role for nitric oxide. *New Phytologist* **176**, 813–823.
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999): Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* **140**, 103–125.
- Boyer J.S. (1982): Plant productivity and environment. *Science* **218**, 443–448.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Brown G.C. (2007): Nitric oxide and mitochondria. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **12**, 1024–1033.
- Bukau B., Horwich A.L. (1998): The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351–366.
- Camejo D., Rodriguez P., Morales M. A., Dell’amico J. M., Torrecillas A., Alarcon J. J. (2005): High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology* **162**, 281–289.
- Carey C.C., Gorman K.F., Rutherford S. (2006): Modularity and intrinsic evolvability of Hsp90-buffered change. *PLoS ONE* **1**, 1–6.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocana A.M., Carreras A., López-Jaramillo J., Luque F., Palma J.M., Pedrajas J.R., Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Gómez-Rodríguez M.V., Corpas F.J., Barroso J.B. (2009): Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4221–4234.
- Challinor A. J., Watson J., Lobell D. B., Howden S. M., Smith D. R., Chhetri N. (2014): A meta-analysis of crop yield under climate change and adaptation. *Nature Climate Change* **4**, 287–291.
- Chen C.B., Dickman M.B. (2005): Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**, 3459-3464.
- Chen X., Chen Q., Zhang X., Li R., Jia Y., Ef A., Jia A., Hu L., Hu X. (2016): Hydrogen sulfide mediates nicotine biosynthesis in tobacco (*Nicotiana tabacum*) under high temperature conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* **104**, 174-179.
- Chen D., Shao Q., Yin L., Younis A., Zheng B. (2019): Polyamine Function in Plants: Metabolism, Regulation on Development and Roles in Abiotic Stress Responses. *Frontiers in Plant Science* **9**.
- Collado-González J., Pinero M.C., Otalora G., Lopez-Marin J., del Amor F.M. (2021): Merging Heat Stress Tolerance and Health-Promoting Properties: The Effects of Exogenous Arginine in Cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis L.). *Foods* **10**.
- Collins A.R. (2001): Carotenoids and genomic stability. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **475**, 1-28.
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. (2006): Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in plant science* **11**, 80-88.
- Corpas F.J., Carreras A., Valderrama R., Chaki M., Palma J.M., del Río L.A., Barroso J.B. (2007a): Reactive nitrogen species and nitrosative stress in plants. *Plant Stress* **1**, 37–41.
- Corpas F.J., del Río L.A., Barroso J.B. (2007b): Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends in Plant Science* **12**, 436–438.
- Corpas F.J., del Río L.A., Barroso J.B. (2008a): Post-translational modifications mediated by reactive nitrogen species: Nitrosative stress responses or components of signal transduction pathways? *Plant Signaling and Behavior* **3**, 301–303.
- Corpas F.J., Chaki M., Fernández-Ocana A.M., Valderrama R., Palma J.M., Carreras A., Begara-Morales J.C., Airaki M., Del Río L.A., Barroso J.B. (2008b): Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1711-1722.
- Corpas F.J., Carreras A., Esteban F.J., Chaki M., Valderrama R., Del Río L.A., Barroso J.B. (2008b): Localization of S-nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and S-nitrosoglutathione reductase activity in plants. *Methods in Enzymology* **437**, 561–574.
- Corpas F.J., Palma J.M., del Río L.A., Barroso J.B. (2009): Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytologist* **184**, 9–14.

- Corpas F.J., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J.M., Barroso J.B. (2011): Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science* **181**, 604-611.
- Corpas F.J., Barroso J.B. (2013): Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New phytologist* **199**, 633-635.
- Cuevas J.C., Lopez-Cobollo R., Alcazar R., Zarza X., Koncz C., Altabella T., Salinas J., Tiburcio A.F., Ferrando A. (2008): Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiology* **148**, 1094–1105.
- Cunniff B., Snider G.W., Fredette N., Hondal R.J., Heintz N.H. (2013): A direct and continuous assay for the determination of thioredoxin reductase activity in cell lysates. *Analytical Biochemistry* **443**, 34-40.
- Dalton T.D., Shertzer H.G., Puga A. (1999): Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **39**, 67-101.
- Das K., Roychoudhury A. (2014): Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* **2**, 53.
- Del Rio L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gómez M., Barroso J.B. (2002): Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1255-1272.
- Ding X.Z., Tsokos G.C., Kiang J.G. (1998): Overexpression of HSP-70 inhibits the phosphorylation of HSF1 by activating protein phosphatase and inhibiting protein kinase C activity. *FASEB Journal* **12**, 451-459.
- Dixon D.P., Skipsey M., Edwards R. (2010): Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **71**, 338-350.
- Döring P., Treuter E., Kistner C., Lyck R., Chen A., Nover L. (2000): The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *Plant Cell* **12**, 265–278.
- Duhazé C., Gouzerh G., Gagneul D., Larher F., Bouchereau A. (2002): The conversion of spermidine to putrescine and 1,3-diaminopropane in the roots of *Limonium tataricum*. *Plant Science* **163**, 639-646.
- Dutta S., Mohanty S., Tripathy B. C. (2009): Role of temperature stress on chloroplast biogenesis and protein import in pea. *Plant Physiology* **150**, 1050–1061.
- Easton, D.P., Kaneko Y., Subjeck J.R. (2000): The Hsp110 and Grp170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones* **5**, 276-290.
- Fahad S., Hussain S., Saud S., Khan F., Hassan S., Amanullah, Nasim W., Arif M., Wang F., Huang J. (2016): Exogenously applied plant growth regulators affect heat-stressed rice pollens. *Journal of Agronomy and Crop Science* **202**, 139–150.
- Fancy N.N., Bahlmann A.K., Loake G.J. (2017): Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant Cell and Environment* **40**, 462-472.
- Fares A., Rossignol M., Peltier J.B. (2011): Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **416**, 331–336.
- Feng J., Wang C., Chen Q., Chen H., Ren B., Li X., Zuo J. (2013): S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nature Communications* **4**, 1529.
- Filippou P., Antoniou C., Fotopoulos V. (2013): The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Free Radical Biology and Medicine* **56**, 172–183.
- Foyer C.H., Halliwell B. (1976): The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**, 21-25.
- Foyer C.H., Noctor G. (2003): Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* **119**, 355-364.
- Foyer C.H., Noctor G. (2005): Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**, 1866-1875.

- Fragkostefanakis S., Röth S., Schleiff E., Scharf K. D. (2015): Prospects of engineering thermotolerance in crops through modulation of heat stress transcription factor and heat shock protein networks. *Plant Cell and Environment* **38**, 1881–1895.
- Freschi L. (2013): Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* **4**, 398.
- Friedlingstein P., Houghton R. A., Marland G., Hackler J., Boden T. A., Conway T. J., Canadell J.G., Raupach M.R., Ciais P., Le Quere C. (2010): Update on CO₂ emissions. *Nature Geoscience* **3**, 811–812.
- Frungillo L., Skelly M.J., Loake G.J., Spoel S.H., Salgado I. (2014): S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communications* **5**, 5401.
- Frydman J. (2001): Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual Review Biochemistry* **70**, 603–647.
- Fujimoto M., Nakai A. (2010): The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS Journal* **277**, 4112–4125.
- Fukuto J.M., Cisneros C.J., Kinkade R.L. (2013): A comparison of the chemistry associated with the biological signaling and actions of nitroxyl (HNO) and nitric oxide (NO). *Journal of Inorganic Biochemistry* **118**, 201–208.
- Ghezzi P., Bonetto V. (2003): Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* **3**, 1145–1153.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010a): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**, 909–930.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010b): Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior* **5**, 26–33.
- Gill S.S., Tuteja N. (2011): Cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 2.
- Giustarini D., Milzani A., Dalle-Donne I., Rossi R. (2007): Detection of S-nitrosothiols in biological fluids: A comparison among the most widely applied methodologies. *Journal of Chromatography* **851**, 124–139.
- Glover J.R., Lindquist S. (1998): Hsp104, Hsp70 and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**, 73–82.
- Gow A.J., Ischiropoulos H. (2001): Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *Journal of Cellular Physiology* **187**, 277–282.
- Gray S.B., Brady S.M. (2016): Plant developmental responses to climate change. *Developmental Biology* **419**, 64–77.
- Groppa M.D., Benavides M.P. (2008): Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* **34**, 35–45.
- Gross F., Durner J., Gaupels F. (2013): Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science* **4**, 419.
- Guerra D., Ballard K., Truebridge I., Vierling E. (2016): S-Nitrosation of Conserved Cysteines Modulates Activity and Stability of S-Nitrosogluthione Reductase (GSNOR). *Biochemistry* **55**, 2452–2464.
- Guo M., Liu J. H., Ma X., Luo D. X., Gong Z. H., Lu M. H. (2016). The plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T. (2011): On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* **16**, 160–168.
- Gupta K., Sengupta A., Chakraborty M., Gupta B. (2016): Hydrogen peroxide and polyamines act as double edged swords in plant abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1343.
- Hancock J.T., Whiteman M. (2016): Hydrogen sulfide signaling: Interactions with nitric oxide and reactive oxygen species. *Special issue: Respiratory Science* **1365**, 5–14.
- Hao G., Derakhshan B., Shi L., Campagne F., Gross S.S. (2006): SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine S-nitrosylation sites in complex protein mixtures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**, 1012–1017.
- Hartl F.U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571–580.

- Heath R.L., Packer L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, 180-198.
- Hedhly A. (2011): Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environmental and Experimental Botany* **74**, 9-16.
- Hess D.T., Stamler J.S. (2012): Regulation by S-nitrosylation of protein posttranslational modification. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 4411–4418.
- Hollander-Czytko H., Grabowski J., Sandorf I., Weckermann K., Weiler E.W. (2005): Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in *Arabidopsis* under stress conditions. *Journal of Plant Physiology* **162**, 767-770.
- Holmgren A., Bjornstedt M. (1995): Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biothiols, Pt B: Glutathione and thioredoxin: Thiols in signal transduction and gene regulation* **252**, 199-208.
- Hu X., Liu R., Li Y., Wang W., Tai F., Xue R., Li Ch. (2010): Heat shock protein 70 regulates the abscisic acid-induced antioxidant response of maize to combined drought and heat stress. *Plant Growth Regulation* **60**, 225-235.
- Hu J., Huang X., Chen L., Sun X., Lu C., Zhang L., Wang Y., Zuo J. (2015): Site-specific nitrosoproteomic identification of endogenously S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **167**, 1731-1746.
- Hussain S.S., Ali M., Ahmad M., Siddique K.H.M. (2011): Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances* **29**, 300–311.
- Hussain A., Mun B.G., Imran Q.M., Lee S.U., Adamu T.A., Shahid M., Kim K.M., Yun B.W. (2016): Nitric oxide mediated transcriptome profiling reveals activation of multiple regulatory pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **7**, 975.
- IPCC (2014): Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core Writing Team, R. K. Pachauri, L. A. Meyer, IPCC, Geneva **151**.
- Jacob P., Hirt H., Bendahmane A. (2017): The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal* **15**, 405-414.
- Jaffrey S.R., Snyder S.H. (2001): The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Science Signaling* **86**.
- 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.
- Kampinga H. H., Craig E.A. (2010): The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 579-592.
- Kanzaki H., Saitoh H., Ito A., Fujisawa S., Kamoun S., Katou S., Yoshioka H., Terauchi R. (2003): Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology* **4**, 383-391.
- Kasinathan V., Winkler A. (2004): Effect of reduced arginine decarboxylase activity on salt tolerance and on polyamine formation during salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **121**, 101–107.
- Kim B.H., Schoffl F. (2002): Interaction between *Arabidopsis* heat shock transcription factor 1 and 70 kDa heat shock proteins. *Journal of Experimental Botany* **53**, 371-375.
- Kim H. J., Hwang N. R., Lee K. J. (2007): Heat shock responses for understanding diseases of protein denaturation. *Molecules and Cells* **23**, 123-131.
- Kneeshaw S., Gelineau S., Tada Y., Loake G.J., Spoel S.H. (2014): Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Molecular Cell* **56**, 153–162.
- 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.
- Kotak S., Port M., Ganguli A., Bicker F., Koskull-Döring V. (2004): Characterization of C-terminal domains of *Arabidopsis* heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. *Plant Journal* **39**, 98–112.
- Kotak S., Larkindale J., Lee U., von Koskull-Döring P., Vierling E., Scharf K.D. (2007a): Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 310–316.

- Kotak S., Vierling E., Bäumlein H., von Koskull-Döring P. (2007b): A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 182–195.
- Kovacs I., Holzmeister C., Wirtz M., Geerlof A., Frohlich T., Romling G., Kuruthukulangarakoola G.T., Linster E., Hell R., Arnold G.J., Durner J., Lindermayr Ch. (2016): ROS-Mediated Inhibition of S-nitrosoglutathione Reductase Contributes to the Activation of Anti-oxidative Mechanisms. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1669.
- Krasensky-Wrzaczek J., Kangasjarvi J. (2018): The role of reactive oxygen species in the integration of temperature and light signals. *Journal of experimental botany* **69**, 3347-3358.
- Krishna P., Gloor G. (2001): The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* **6**, 238–246.
- Krukenberg K.A., Street T.O., Lavery L.A., Agard D.A. (2011): Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Quarterly Reviews of Biophysics* **44**, 229–255.
- Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. (2008): Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**, 367–381.
- Lal R. (2004): Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* **123**, 1–22.
- 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.
- Lee G.J., Vierling E. (2000): A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiology* **122**, 189–197.
- Lee U., Rioflorido I., Hong S.-W., Larkindale J., Waters E. R., Vierling E. (2007): The *Arabidopsis* ClpB/Hsp100 family of proteins: Chaperones for stress and chloroplast development. *Plant Journal* **49**, 115–127.
- Lee S., Kim S.M., Lee R.T. (2013): Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidant and Redox Signaling* **18**, 1165–1207.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J.M., Barroso J.B., Corpas F.J. (2011): Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 789–793.
- Li B.J., Gao K., Ren H.M., Tang W.Q. (2018): Molecular mechanisms governing plant responses to high temperatures. *Journal of Integrative Plant Biology* **60**, 757-779.
- Lillig C.H., Holmgren A. (2007): Thioredoxin and related molecules- from biology to health and disease. *Antioxidant & Redox Signaling* **9**, 25-47.
- Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., Durner J. (2006): Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 4285–4291.
- Lindermayr Ch. (2018): Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in plants: key role of S-nitrosoglutathione reductase. *Free Radical Biology and Medicine* **122**, 110-115.
- Lindquist S., Craig E.A. (1988): The heat-shock proteins. *Annual Review Genetics* **22**, 631–677.
- Liu J.H., Nakajima I., Moriguchi T. (2011): Effects of salt and osmotic stresses on free polyamine content and expression of polyamine biosynthetic genes in *Vitis vinifera*. *Biologia Plantarum* **55**, 340–344.
- Liu J. Z., Whitham S. A. (2013): Overexpression of a soybean nuclear localized type-III DnaJ domain-containing HSP40 reveals its roles in cell death and disease resistance. *Plant Journal* **74**, 110-121.
- Luebke J. L., Giedroc D. P. (2015): Cysteine sulfur chemistry in transcriptional regulators at the host-bacterial pathogen interface. *Biochemistry* **54**, 3235–3249.
- Luo L., Li Z., Tang M.Y., Cheng B.Z., Zeng W.H., Peng Y., Nie G., Zhang X.Q. (2020): Metabolic regulation of polyamines and c-aminobutyric acid in relation to spermidine-induced heat tolerance in white clover. *Plant Biology* **22**, 794-804.
- Maestri E., Klueva N., Perrotta C., Gulli M., Nguyen H. T., Marmiroli N. (2002): Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Molecular Biology* **48**, 667–681.
- Marley R., Feelisch M., Holt S., Moore K. (2000): A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radical Research* **32**, 1-9.

- Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2004): S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovascular Research* **62**, 43–52.
- Mioto P.T., Rodriguez-Ruiz M., Mot A.C., Zuccarelli R., Corpas J.F., Freschi L., Mercier H. (2017): Alternative fluorimetric-based method to detect and compare total S-nitrosothiols in plants. *Nitric Oxide* **68**, 7-13.
- Mishra D., Shekhar S., Singh D., Chakraborty S., Chakraborty N. (2018): Heat Shock Proteins and Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Regulation of Heat shock protein responses* **13**, 41-69.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.
- Mogk A., Schlieker C., Friedrich K.L., Schofield H.J., Vierling E., Bukau B. (2003): Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/ DnaK. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 31033–31042.
- Moller I.M., Jensen P.E., Hansson A. (2007): Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 459-481.
- Morimoto R.I. (1998): Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development* **12**, 3788-3796.
- Moschou P.N., Paschalidis K.A., Roubelakis-Angelakis K.A. (2008): Plant polyamine catabolism: The state of the art. *Plant Signaling & Behavior* **3**, 1061–1066.
- Mullineaux P.M., Rausch T. (2005): Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthetic Research* **86**, 459-474.
- Navrot N., Rouhier N., Gelhaye E., Jaquot J.P. (2007): Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* **129**, 185-195.
- Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C.H. (2002): Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1283-1304.
- Ohama N., Sato H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2017): Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in Plant Science* **22**, 53-65.
- Oliveira H.C., Salgado I., Sodek L. (2013): Involvement of nitrite in the nitrate-mediated modulation of fermentative metabolism and nitric oxide production of soybean roots during hypoxia. *Planta* **237**, 255–264.
- Ortega-Galisteo A.P., Rodriguez-Serrano M., Pazmino 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.
- Palavan-Unsal N., Arisan D. (2009): Nitric oxide signalling in plants. *Botanical Review* **75**, 203–229.
- Park C.J., Seo Y.S. (2015): Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity. *The plant pathology journal* **31**, 323.
- Parsell P. A., Lindquist S. (1993): The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics* **27**, 437–496.
- Petrov V., Hille J., Mueller-Roeber B., Gechev T.S. (2015): ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**, 69.
- Planchet E., Gupta K.J., Sonoda M., Kaiser W.M. (2005): Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant Journal* **41**, 732–743.
- Puyaubert J., Fares A., Reze N., Peltier J.B., Baudouin E. (2014): Identification of endogenously S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis* plantlets: Effect of cold stress on cysteine nitrosylation level. *Plant Science* **215**, 150-156.
- Queitsch C., Hong S. W., Vierling E., Lindquist S. (2000): Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 479-492.
- Quint M., Delker C., Franklin K.A., Wigge P.A., Halliday K.J., van Zanten M. (2016): Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nature Plants* **2**, 15190.
- Radi R. (2004): Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4003-4008.

- Raja V., Majeed, U., Kang H., Andrabi K.I., John R. (2017): Abiotic stress: interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environmental and Experimental Botany* **137**, 142-157.
- Ranson N.A., White H.E., Saibil H.R. (1998): Chaperonins. *Biochemical Journal* **333**, 233-242.
- Rasmussen S., Barah P., Suarez-Rodriguez M.C., Bressendorff S., Friis P., Costantino P., Bones A.M., Nielsen H.B. (2013): Transcriptome responses to combinations of stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **161**, 1783-1794.
- Romero-Puertas M.C., Corpas F.J., Sandalio L.M., Leterrier M., Rodriguez-Serrano M., del Rio L.A., Palma J.M. (2006): Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytologist* **170**, 43-52.
- Romero-Puertas M.C., Campostrini N., Mattè A., Righetti P.G., Perazzolli M., Zolla L., Roepstorff P., Delledonne M. (2008): Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**, 1459-1469.
- Roy M., Ghosh B. (1996): Polyamines, both common and uncommon, under heat stress in rice (*Oryza sativa*) callus. *Physiologia Plantarum* **98**, 196-200.
- Roychoudhury A., Basu S., Sengupta D.N. (2011): Amelioration of salinity stress by exogenously applied spermidine or spermine in three varieties of indica rice differing in their level of salt tolerance. *Journal of Plant Physiology* **168**, 317-328.
- Rumer S., Gupta K.J., Kaiser W.M. (2009): Plant cells oxidize hydroxylamines to NO. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2065-2072.
- Sage T.L., Bagha S., Lundsgaard-Nielsen V., Branch H.A., Sultmanis S., Sage R.F. (2015): The effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants. *Field Crops Research* **182**, 30-42.
- Sagor G.H., Berberich T., Takahashi Y., Niitsu M., Kusano T. (2012): The polyamine spermine protects *Arabidopsis* from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes. *Transgenic Research* **22**, 595-605.
- Salgado I., Oliveira H.C., Gaspar M. (2017): Plant nitric oxide signaling under environmental stresses. *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress* **1**, 345-370.
- Saville B. (1958): A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* **83**, 670-672.
- Scandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N. (1997): Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. *Cold Spring Harbor Monograph Series* **34**, 343-406.
- Scharf K. D., Berberich T., Ebersberger I., Nover L. (2012): The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta* **1819**, 104-119.
- Schirmer E.C., Glover J.R., Singer M.A., Lindquist S. (1996): Hsp100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in Biochemical Science* **21**, 289-296.
- Shao L., Majumdar R., Minocha S.C. (2012): Profiling the aminopropyltransferases in plants: their structure, expression and manipulation. *Amino acids* **42**, 813-830.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. (2002): Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1305-1319.
- Shirasu K. (2009): The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 139-164.
- Shopova E., Dimitrova S., Todorova D., Sergiev I. (2020): Comparative study of singlet oxygen and superoxide radical effects on endogenous polyamines and diamine and polyamine oxidase activities in young pea seedlings. *Comptes Rendus de l'academie Bulgare des Sciences* **73**, 1076-1085.
- Simontacchi M., Galatro A., Ramos-Artuso F., Santa-Maria G.E. (2015): Plant survival in a changing environment: The role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Singh R.J., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B. (1996): Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols, *Journal of Biological Chemistry* **271**, 18596-18603.
- Slocum R.D., Kaur-Sawhney R., Galston A.W. (1984): The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **235**, 283-303.

- Smirnoff N. (2005): Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* **3**, 53-86.
- 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-Biology and Chemistry* **4**, 57–66.
- Staab C.A., Hellgren M., Hoog J.O. (2008): Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3950–3960.
- Stamler J.S., Singel D.J., Loscalzo J. (1992): Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**, 1898–1902.
- Stamler J.S., Lamas S., Fang F.C. (2001): Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**, 675–683.
- Stamler J.S., Toone E.J. (2002): The decomposition of thionitrites. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**, 779-785.
- Sugio A., Dreos R., Aparicio F., Maule A.J. (2009): The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 642-654.
- Sun W.N., Van Montagu M., Verbruggen N. (2002): Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression* **1577**, 1–9.
- Sung D.Y., Kaplan F., Guy C.L. (2001): Plant Hsp70 molecular chaperones: protein structure, gene family, expression and function. *Physiologia Plantarum* **113**, 443-451.
- Sung D.Y., Kaplan F., Lee K.J., Guy C.L. (2003): Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science* **8**, 179-187.
- Sung M.S., Chow T.J., Lee T.M. (2011): Polyamine acclimation alleviates hypersalinity-induced oxidative stress in a marine green macroalga, *Ulva fasciata*, by modulation of antioxidative enzyme gene expression. *Journal of Phycology* **47**, 538–547.
- Swindell W.R., Huebner M., Weber A.P. (2007): Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* **8**, 125.
- Szarka A., Horemans N., Kovacs Z., Grof P., Mayer M., Banhegyi G. (2007): Dehydroascorbate reduction in plant mitochondria is coupled to the respiratory electron transfer chain. *Physiologia Plantarum* **129**, 225-232.
- Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuška P., Peč P. (2000): Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1480**, 329-341.
- Štanclová J. (2019): *Studium enzymů s diaminooxidásovou a aminoaldehyddehydrogenásovou aktivitou v reakci na teplotní stres hrachu setého (Pisum sativum)*. Diplomová práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Tada Y., Spoel S., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. (2008): Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952-956.
- Talipov M.R., Timerghazin Q.K. (2013): Protein control of S-nitrosothiol reactivity: interplay of antagonistic resonance structures. *Journal of Physical Chemistry B* **117**, 1827–1837.
- Terrile M.C., París R., Calderón-Villalobos L.I., Iglesias M.J., Lamattina L., Estelle M., Casalón C.A. (2012): Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the *Arabidopsis* TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *Plant Journal* **70**, 492–500.
- Tharmalingam S., Alhasawi A., Appanna V.P., Lemire J., Appanna V.D. (2017): Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications. *Biological Chemistry* **398**, 1193-1208.
- Tian J., Wang L.-P., Yang Y.-J., Sun J., Guo S.-R. (2012): Exogenous spermidine alleviates the oxidative damage in cucumber seedlings subjected to high temperatures. *Journal of American Society for Horticultural Science* **137**, 11–19.
- Tiburcio A.F., Altabella T., Bitrián M., Alcázar R. (2014): The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* **240**, 1-18.

- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E.I.S., Scherer G.F.E. (2006): Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology* **47**, 346–354.
- Tuteja N., Singh M.B., Misra M.K., Bhalla P.L., Tuteja R. (2001): Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology* **36**, 337-397.
- Tuteja N., Ahmad P., Panda B.B., Tuteja R. (2009): Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* **681**, 134-149.
- Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010): Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. *Journal of Molecular Biology* **396**, 870-882.
- Umbreen S., Lubega J., Cui B., Pan Q., Jiang J., Loake G.J. (2018): Specificity in nitric oxide signalling. *Journal of experimental botany* **69**, 3439-3448.
- Upadhyay R.K., Fatima T., Handa A.K., Mattoo A.K. (2020): Polyamines and Their Biosynthesis/Catabolism Genes Are Differentially Modulated in Response to Heat Versus Cold Stress in Tomato Leaves (*Solanum lycopersicum* L.). *Cells* **9**.
- Verchot J. (2012): Cellular chaperones and folding enzymes are vital contributors to membrane bound replication and movement complexes during plant RNA virus infection. *Frontiers of Plant Science* **3**, 275.
- Vierling E. (1991): The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 579–620.
- Vu J. C. V., Gesch R. W., Pennanen A. H., Allen L. H., Boote K. J., Bowes G. (2001): Soybean photosynthesis, Rubisco and carbohydrate enzymes function at supraoptimal temperatures in elevated CO₂. *Journal of Plant Physiology* **158**, 295–307.
- Walden R., Cordeiro A., Tiburcio A.F. (1997): Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiology* **113**,1009–1013.
- Wang W.X., Vinocur B., Altman A. (2003): Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**, 1–14.
- Wang W.X., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004): Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* **9**, 244–252.
- Wang Y., Yun B.W., Kwon E., Hong J.K., Yoon J., Loake G.J. (2006): S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1777–1784.
- Wang L., Guo Y.J., Jia L.X., Chu H.Y., Zhou S., Chen K.M., Wu D., Zhao L.Q. (2014): Hydrogen peroxide acts upstream of nitric oxide in the heat shock pathway in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* **164**, 2184-2196.
- Waters E.R., Lee G.J., Vierling E. (1996): Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* **47**, 325-338.
- Wilhelm E. P., Mullen R. E., Keeling P. L., Singletary G. W. (1999): Heat stress during grain filling in maize: effects of kernel growth and metabolism. *Crop Science* **39**, 1733–1741.
- Wilson I.D., Neill S.J., Hancock J.T. (2008): Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell and Environment* **31**, 622–631.
- Wojtaszek P. (2000): Nitric oxide in plants – To NO or not to NO. *Phytochemistry* **54**, 1–4.
- 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.
- Yamakawa H., Kamada H., Satoh M., Ohashi Y. (1998): Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* **118**, 1213–1222.
- Yamasaki H., Sakihama Y. (2000): Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* **468**, 89–92.

- Yamasaki H., Cohen M.F. (2006): NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends in Plant Science* **11**, 522–524.
- Yoshida T., Ohama N., Nakajima J., Kidokoro S., Mizoi J., Nakashima K., Maruyama K., Kim J.M., Seki M., Todaka D., Osakabe Y., Sakuma Y., Schoffl F., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2011): *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics* **286**, 321–332.
- Young J.C. Moarefi I., Hartl F.U. (2001): Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *Journal of Cell Biology* **154**, 267–273.
- 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.
- Zhang Z., Quick M.K., Kanelakis K.C., Gijzen M., Krishna P. (2003): Characterization of a plant homolog of Hop, a cochaperone of Hsp90. *Plant Physiology* **131**, 525–535.
- Zhao C., Liu B., Piao S., Wang X., Lobell D.B., Huang Y., Huang M., Yao Y., Bassu S., Ciais P., *et al.* (2017): Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **114**, 9326-9331.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ADC	arginindekarboxylasa
AIH	agmatiniminohydrolasa
AMADH	Aminoaldehyddehydrogenasa
AO	Aminoxidasa
APX	Askorbátperoxidasa
ASH	Kyselina askorbová (askorbát)
Cad	Kadaverin
CAT	Katalasa
CDPK	Ca ²⁺ -dependentní proteinkinasa
CPA	N-karbamoylputrescinamidohydrolasa
cv.	Kultivar
DAO	Diaminoxidasa
DHA	dehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
DTNB	5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoová) kyselina
DW	suchá váha (dry weight)
GABA	Kyselina γ -aminomáselná
GAP	Glyceraldehyd-3-fosfát
GPX	Guajakolperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	Glutathion
GSHPX	glutathionperoxidasa
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa

GSSG	Oxidovaný stav glutathionu
GST	Glutathion-S-transferasa
HMGS	S-(hydroxymethyl)glutathion
Hse	Elementy teplotního šoku (heat shock element)
Hsf	Heat shock faktor
Hsp	Heat shock proteiny
MDA	malondialdehyd
MDHA	monodehydroaskorbát
MDHAR	monodehydroaskorbátreduktasa
NOS	NO-synthasa
NR	Nitrátreduktasa
$O_2^{\cdot -}$	Superoxidový radikál
ONOO ⁻	Peroxydusitan
ODC	ornithindekarboxylasa
PA	Polyaminy
PAO	Polyaminoxidasa
PTM	Posttranslační modifikace
Put	putrescin
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RS	Reakční směs
RSNO	S-nitrosothioly
RUBISCO	ribulosa-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
SAHH	S-adenosylhomocysteinhydrolasa
SAM	S-adenosylmethionin
SNP	nitroprussid sodný

SOD	superoxiddismutasa
Spd	spermidin
SPDS	spermidinsynthasa
Spm	spermin
SPMS	sperminsynthasa
TNB	5-thionitrobenzoová kyselina
Trx	thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktasa
TS	Teplotní stres