

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Nitrované cyklické nukleotidy jako nové složky signálních drah oxidu dusnatého

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Hana Beranová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Termín odevzdání práce:	20. 7. 2015
Rok:	2015

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 20. 7. 2015

Hana Beranová

Děkuji svému vedoucímu práce doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za odborné vedení, ochotu a čas věnovaný při zpracování teoretické i experimentální části bakalářské práce.

Dále děkuji kolektivu Katedry biochemie za vstřícnost a cenné rady při vypracovávání experimentální části.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Hana Beranová
Název práce	Nitrované cyklické nukleotidy jako nové složky signálních drah oxidu dusnatého
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Bakalářská práce je v teoretické části zaměřena na nitrované cyklické nukleotidy, především na cyklický 8-nitro-guanosinmonofosfát (8-nitro-cGMP). V úvodu jsou nejprve zmíněny obecné kapitoly zahrnující vznik, funkce a metabolismus oxidu dusnatého (NO), reaktivních forem kyslíku (ROS) a cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP). Následující kapitoly se zabývají vznikem, funkcí a metabolismem 8-nitro-cGMP se zaměřením na S-guanylace proteinů.

V praktické části práce byl syntetizován 8-nitro-cGMP a bylo ověřeno jeho působení na regulaci průduchů, klíčení semen a kořenový růst *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Columbia*.

Klíčová slova	8-nitro-cGMP, cGMP, S-guanylace, <i>Arabidopsis thaliana</i> , oxid dusnatý, reaktivní formy kyslíku
Počet stran	40
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname Hana Beranová

Title Nitrated cyclic nucleotides: new components of signalling pathways of nitric oxide

Type of thesis Bachelor

Department Department of biochemistry

Supervisor doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.

The year of presentation 2015

Abstract

In the theoretical part the bachelor thesis is focused to nitrated cyclic nucleotides, mainly cyclic 8-nitro-guanosine monophosphate (8-nitro-cGMP). The introductory chapter summarizes the actual knowledge about the formation and functions of nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP). The following chapters deal with the formation, functions and metabolism of 8-nitro-cGMP focusing to protein S-guanylation.

In the practical part, 8-nitro-cGMP was synthesized and its effect verified in the regulation of stomata closure, seed germination and root growth of *Arabidopsis thaliana* ecotype *Columbia*.

Keywords 8-nitro-cGMP, cGMP, S-guanylation, *Arabidopsis thaliana*, nitric oxide, reactive oxygen species

Number of pages 40

Number of appendices 0

Language Czech

Obsah

1 Úvod	1
2 Současný stav řešené problematiky	2
2.1 Oxid dusnatý.....	2
2.1.1 Signální dráhy oxidu dusnatého.....	3
2.2 Reaktivní formy kyslíku.....	4
2.2.1 Tvorba signálů ROS.....	4
2.3 Cyklický guanosinmonofosfát.....	6
2.3.1 Biosyntéza cyklického guanosinmonofosfátu.....	6
2.3.2 cGMP jako druhý posel.....	7
2.3.3 Funkce cGMP u živočichů a rostlin.....	7
2.3.3.1 Funkce cGMP u živočichů.....	7
2.3.3.2 Funkce cGMP u rostlin.....	8
2.3.4 Degradace cGMP.....	9
2.4 Cyklický 8-nitro-guanosinmonofosfát.....	10
2.4.1 Vznik 8-nitro-cGMP.....	11
2.4.2 Funkce 8-nitro-cGMP u živočichů.....	12
2.4.3 Funkce 8-nitro-cGMP u rostlin.....	13
2.4.4 Metabolismus 8-nitro-cGMP.....	16
2.4.4.1 Metabolismus 8-nitro-cGMP působením glutathion-S-transferas (GST)	16
2.4.4.2 Metabolismus 8-nitro-cGMP působením thiolového aniontu (HS-).....	16
2.4.5 Funkce 8-nitro-cGMP v S-guanylylaci proteinů.....	17
2.4.5.1 S-guanylace proteinu Keap1.....	18
2.4.5.2 S-guanylace proteinu H-Ras.....	19
3 Praktická část	20
3.1 Materiál a chemikálie.....	20

3.1.1 Rostlinný materiál	20
3.1.2 Použité chemikálie	20
3.2 Přístrojové vybavení.....	21
3.3 Metody	22
3.3.1 Příprava pufků a médií.....	22
3.3.1.1 Příprava fosfátového pufku.....	22
3.3.1.2 Příprava pufků pro otevírání průduchů.....	22
3.3.1.3 Příprava pevného MS média	22
3.3.1.5 Příprava MES pufku	22
3.3.1.6 Příprava pufku s DAF-2.....	22
3.3.2 Sterilizace semen.....	22
3.3.3 Syntéza peroxynitritu	22
3.3.4 Syntéza 8-nitroguaninu	23
3.3.5 Syntéza 8-nitro-cGMP	23
3.3.6 Mikroskopické pozorování průduchů <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
3.3.7 Vyhodnocení šířky průduchové štěrbiny	24
3.3.8 Kultivace semenáčků <i>Arabidopsis thaliana</i> na pevném agarovém MS médiu	24
4 Výsledky a diskuze	25
4.1 Syntéza 8-nitroguaninu	25
4.2. Syntéza 8-nitro-cGMP	25
4.3 Vliv testovaných látek na uzavření průduchů	25
4.4 Vliv testovaných látek na klíčení semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
4.5 Vliv testovaných látek na růst kořenů	32
5 Závěr.....	35
6 Použitá literatura	36
7 Seznam použitých zkratk.....	39

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se biologických funkcí cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) a cyklického 8-nitro-guanosinmonofosfátu (8-nitro-cGMP) u živočichů a rostlin.

V experimentální části bakalářské práce bylo cílem provést syntézu 8-nitro-cGMP a ověřit jeho biologické účinky při regulaci uzavírání průduchů, klíčení semen a růstu kořenového systému.

1 Úvod

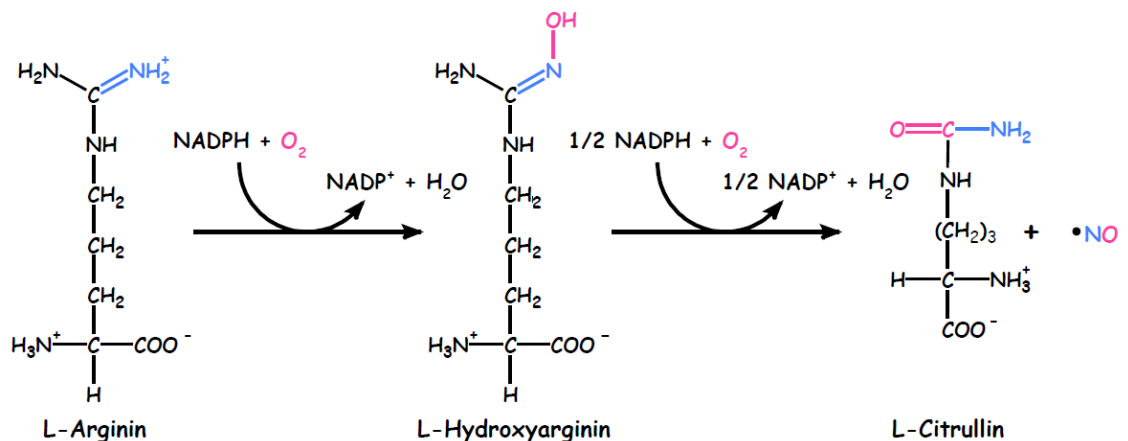
Živočichové i rostliny jsou během svého života vystaveny měnícím se vlivům prostředí. Pro vyrovnání těchto měnících se vlivů organismy vyvinuly nejrůznější obranné mechanismy. Jednou z molekul zapojujících se do obranných mechanismů u živočichů i rostlin je cyklický 8-nitroguanosinmonofosfát (8-nitro-cGMP). 8-nitro-cGMP je unikátní molekula, která vzniká z guanosintrifosfátu (GTP) v odpovědi na přítomnost reaktivních forem kyslíku (ROS) a oxidu dusnatého (NO).

Role 8-nitro-cGMP v živočišných buňkách byla prozkoumána dobře, zatímco v rostlinných buňkách nejsou mechanismy působení 8-nitro-cGMP objasněné úplně. 8-nitro-cGMP byl detekován u živočichů v srdeční tkáni po infarktu myokardu. Jeho přítomnost má prospěšný vliv na rekonvalescenci srdeční tkáně (Nishida *et al.*, 2012). U rostlin 8-nitro-cGMP způsobuje uzavírání průduchů (Joudoi *et al.*, 2013), ale jeho další biologické účinky v rostlinách dosud nebyly testovány. Tato bakalářská práce se zabývá působením 8-nitro-cGMP na rostliny.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je plynná signální molekula, která je zapojena v různých fyziologických i patofyziologických procesech. NO je velmi reaktivní radikál, který může difundovat buněčnými membránami a tak může také plnit funkci jako druhý posel. Oxid dusnatý má vliv na řadu procesů, které probíhají v rostlinách, jako jsou klíčení semen, růst kořenů, biosyntéza chlorofylu, tvorba buněčné stěny, senescence a buněčná smrt. NO také indukuje uzavírání průduchů a inhibuje otevírání průduchů v listech. U živočichů hraje oxid dusnatý roli v regulaci mnoha fyziologických jevů jako je vaskulární a neuronová signální transdukcce, obrana hostitele, infekce, zánětlivá onemocnění a regulace buněčné smrti (Ihara *et al.*, 2011b). Oxid dusnatý hraje významnou roli zejména jako signální látka v kardiovaskulárním systému a v mozku (Chlieh *et al.*, 2011).



Obr. 1 – Schéma biosyntézy oxidu dusnatého a L-citrulinu z L-argininu katalyzované NOS.

Oxid dusnatý může mít v závislosti na řadě faktorů dva odlišné efekty: cytoprotekci a cytotoxicitu. Rozdíl mezi těmito efekty záleží zejména na koncentraci a chemické reaktivitě NO a RNS v daném místě buňky nebo tkáně (Zaki *et al.*, 2009). Nadbytek produkce NO je pravděpodobnou příčinou různých patofyziologických stavů jako jsou záněty, rakovina, neurodegenerativní a kardiovaskulární onemocnění (Ihara *et al.*, 2011b).

U savců je oxid dusnatý syntetizován pomocí tří rozdílných isoformů synthasy oxidu dusnatého (NOS) (EC 1.14.13.39): neuronální NOS (nNOS), indukibilní NOS (iNOS) a

endotheliální NOS (eNOS). NOS katalyzují oxidaci L-argininu na L-citrulin za uvolnění NO (Obr. 1). Signální dráhy NO mohou být klasifikovány do dvou základních skupin: cGMP-dependentní (kanonická NO/cGMP cesta) a cGMP-independentní (nekanonická NO-indukující posttranslační modifikace) (Ahmed *et al.*, 2011).

2.1.1 Signální dráhy oxidu dusnatého

Oxid dusnatý je součástí signálních a regulačních drah vnitrobuněčné regulace a mezibuněčné komunikace. Přenos signálu zahrnuje signální molekulu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), která je vytvořena z guanosintrifosfátu (GTP) za katalýzy rozpustnou guanylátcyklasou (sGC). Molekula cGMP se váže na alosterické regulační domény cílových proteinů, včetně proteinových kinas, iontových kanálů a fosfodiesteras. To umožní buňce adaptovat se na změny podmínek prostředí a s tím spojeným stresem (Sawa *et al.*, 2013).

Mezi další signální dráhy NO, které jsou nezávislé na cGMP, patří reakce NO s ROS, nitrosylace thiolových skupin cysteinů, nitrace tyrosinů, reakce s thioley, vazba NO na hemové proteiny, nitrace mastných kyselin a aktivace kaskády proteinkinas (Piterková *et al.*, 2008).

Účinky NO jsou připisovány také z něj vycházejícím reaktivním formám kyslíku a dusíku (RNOS) včetně oxidu dusičitého (NO_2) a peroxynitritu (ONOO^-). Tyto sloučeniny jsou vytvářeny reakcí oxidu dusnatého s molekulárním kyslíkem a reaktivními formami kyslíku (ROS). Peroxynitrit je považován za silné oxidační a nitrační činidlo, které má významnou úlohu také v různých patofyziologických situacích. Při fyziologickém pH peroxynitrit existuje jednak ve formě ONOO^- , jednak jako konjugovaná kyselina ONOOH . Peroxynitrit se rychle rozkládá za vzniku oxidu dusičitého (NO_2) a hydroxylového radikálu (OH^\cdot). Mezi RNOS dále řadíme nitrylchlorid (NO_2Cl), který je tvořen reakcí dusitanů (NO_2^-) a kyseliny chlorné (HClO), a oxid dusičitý (NO_2), který je tvořen reakcí NO s molekulárním kyslíkem (Ihara *et al.*, 2011b).

Pokud hladina RNOS převyšuje buněčnou antioxidační kapacitu, může dojít k nitračnímu a oxidačnímu poškození nukleových kyselin, proteinů, lipidů a dalších sloučenin. RNOS mají silný oxidační a nitrační potenciál a mohou způsobit oxidaci některých složek nukleových kyselin (např. guaninu nebo adeninu) za vzniku nitračních a oxidačních derivátů guaninu a adeninu (8-nitroguanin a 8-nitroadenin). Tyto látky

byly identifikovány v tkáních při různých zánětlivých onemocněních (rakovina, virová pneumonie a jiné zánětlivé stavy) (Ihara *et al.*, 2011b).

Nitrované mastné kyseliny vznikají vnesením nitroskupiny do mastné kyseliny, dojde tak k substituci na jednom z uhlíků nenasyčených vazeb. Nitrované mastné kyseliny patří mezi důležité signální molekuly, které jsou tvořeny v odpovědi na zánětlivé a oxidační procesy a jsou zapojené do antioxidačních signálních drah (Němčáková *et al.*, 2010). Nitrace proteinů probíhá navázáním nitroskupiny na tyrosin proteinu. Zvýšená hladina nitrovaných proteinů byla prokázána v časných i pokročilých stádiích neurodegenerativních a kardiovaskulárních chorob (Hnízdová *et al.*, 2009).

2.2 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou redukované deriváty molekulárního kyslíku. Mezi ROS řadíme: superoxidový anion – O_2^- , peroxid vodíku – H_2O_2 , singletový kyslík – O_2 , hydroxylový radikál – HO^\cdot , ozon – O_3 nebo kyselina chlorná – $HClO$. Tyto látky jsou produkovány během energetického metabolismu nebo při obranných procesech buněk v reakci na infekci tkání vyvolanou patogeny. Nebezpečnost ROS spočívá v jejich vysoké reaktivitě a možné oxidační modifikaci řady biomolekul. ROS jsou vskutku schopné vyvolat mnohá onemocnění: infekce, rakovina, metabolická onemocnění (např. arterosklerosa, diabetes mellitus) a neurologická onemocnění (např. Alzheimerova choroba) (Akaike *et al.*, 2013).

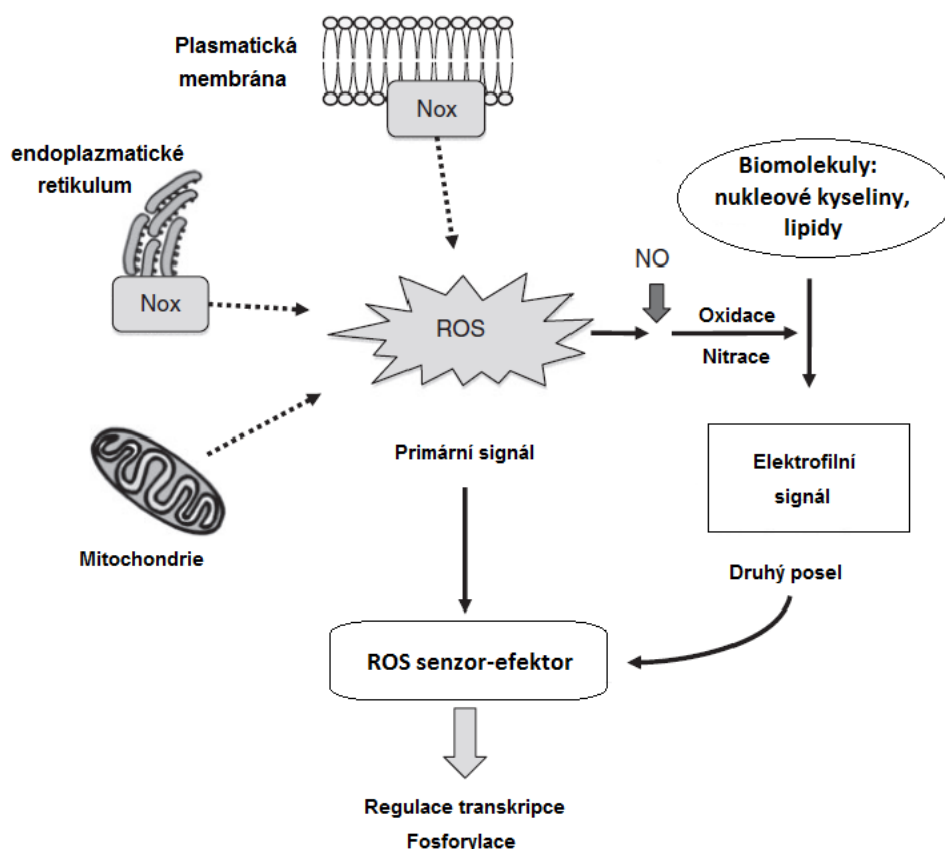
Enzymy významně přispívající k produkci ROS, jako např.: NADPH oxidasa (Nox) (EC 1.6.3.1), jsou produkovány mnoha typy buněk a jsou považovány za antimikrobiální efekторы. Nedávné studie ukazují, že tyto látky mají funkci ve fagocytujícím imunitním systému, epiteliálním systému a endokrinním systému (Akaike *et al.*, 2013). Podle dřívějších studií se vědci domnívali, že ROS způsobují v mnoha případech nespecifická oxidační poškození biologických molekul. Dnes víme, že ROS nemají pouze negativní, ale také pozitivní účinky pokud je jejich hladina udržována na fyziologických hladinách a pokud ROS reagují za vzniku meziproduktů s cytoprotektivními funkcemi. ROS se zapojují v mnoha fyziologických funkcích, které regulují buněčnou signální transdukcí (Akaike *et al.*, 2013).

2.2.1 Tvorba signálů ROS

ROS jsou mimořádně reaktivní nízkomolekulární sloučeniny, které jsou velmi nestabilní v biologických systémech. Specifická signální funkce ROS závisí na

produkčních systémech ROS a jejich chemické reaktivitě v různých buněčných oddílech.

Tvorba ROS v buňce vychází z různých zdrojů, např. z Nox v plazmatické membráně, z endoplazmatického retikula nebo z dýchacího řetězce v mitochondriích (Obr. 2). ROS jsou reaktivními primárními signály a interagují přímo nebo nepřímo s mnoha senzory molekulami v buňce. Při přímém přenosu signálu dochází k aktivaci tzv. senzorů-efektorů ROS. Při nepřímém přenosu signálu je nutná současná přítomnost NO. Dochází tak k oxidaci nebo nitraci různých biomolekul (proteiny, lipidy, nukleové kyseliny) za vzniku stabilnějších druhých poslů, jako je například 8-nitro-cGMP. Primární signály a druzí poslové dále interagují se senzory-efektory ROS, které zprostředkovávají odezvy na transkripční a posttranslační úrovni (Akaike *et al.*, 2013).



Obr. 2 – Schéma buněčných signálních mechanismů ROS (upraveno podle Akaike *et al.*, 2013).

Regulace hladiny ROS v buňkách souvisí s aktivitou enzymů metabolismu ROS: superoxidodismutasy (SOD) (EC 1.15.1.1), katalasy (EC 1.11.1.6), glutathionperoxidasy (GPx) (EC 1.11.1.9) a peroxireduktasy (EC 1.11.1.15). SOD je enzym, který katalyzuje dismutaci superoxidového anionradikálu na peroxid vodíku. Katalasa a peroxireduktasa

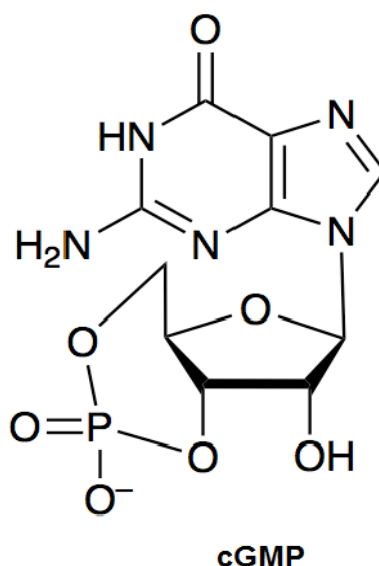
katalyzují rozklad a redukci peroxidu vodíku. GPx katalyzuje rozklad peroxidu vodíku za přítomnosti redukovaného glutathionu (Nishida *et al.*, 2014).

2.3 Cyklický guanosinmonofosfát

2.3.1 Biosyntéza cyklického guanosinmonofosfátu

Cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) je cyklický guaninový nukleotid vznikající z guanosintrifosfátu (GTP) katalytickým působením enzymu, který byl nazván guanylátcyklasa (GC) (EC 4.6.1.2). U obratlovců byly identifikovány dvě formy guanylátcyklasy: membránově vázané GC (pGC) a rozpustné GC (sGC). Tyto enzymy jsou aktivovány v odpovědi na konkrétní signály: sGC je obvykle aktivován vazbou NO a pGC je aktivován peptidovými ligandy a natriuretickými peptidy (NP). Natriuretickými peptidy jsou atriální NP (ANP), mozkový (BNP) a NP typu C (CNP) (Sprengel a Nikolaev, 2013). Guanylátcyklasa může být aktivována také ROS, které vznikají v odpovědi na oxidační a metabolický stres (Sawa *et al.*, 2013).

Guanylátcyklasa hraje klíčové role v mnoha biologických procesech u rostlin. GC se účastní transdukce signálních drah rostlinných hormonů, zejména v NO-dependentní signalizaci a v odpovědi rostlin na biotický a abiotický stres (Meier *et al.*, 2009).



Obr. 3 – Vzorec cyklického guanosinmonofosfátu (převzato ze Saito *et al.*, 2008).

Intracelulární cGMP se může vázat na alosterické regulační domény cílových proteinů: cGMP-dependentní proteinkinasy G (PKG), fosfodiesterasy a iontové kanály.

To má za následek mnoho biologických účinků, které pomáhají buňkám přizpůsobit se na změny podmínek prostředí a metabolická poškození.

2.3.2 cGMP jako druhý posel

cGMP hraje významnou roli jako takzvaný druhý posel stejně jako cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), ovšem koncentrace cGMP je v tkáních mnohem nižší než koncentrace cAMP.

Jako druhý posel se označuje malá signální molekula, která zvyšuje svou koncentraci v buňce po navázání ligandu na receptor. Díky malé velikosti druhého posla je umožněna snadná difúze po celé buňce. Jednou z funkcí druhého posla je zesílení signálu, který do buňky přichází přes receptor. Po vykonání dané funkce druhého posla jeho koncentrace v buňce rychle klesá. Produkce druhých poslů je typická pro receptory, které jsou spřaženy s G-proteiny (Chong a Victorino, 2005).

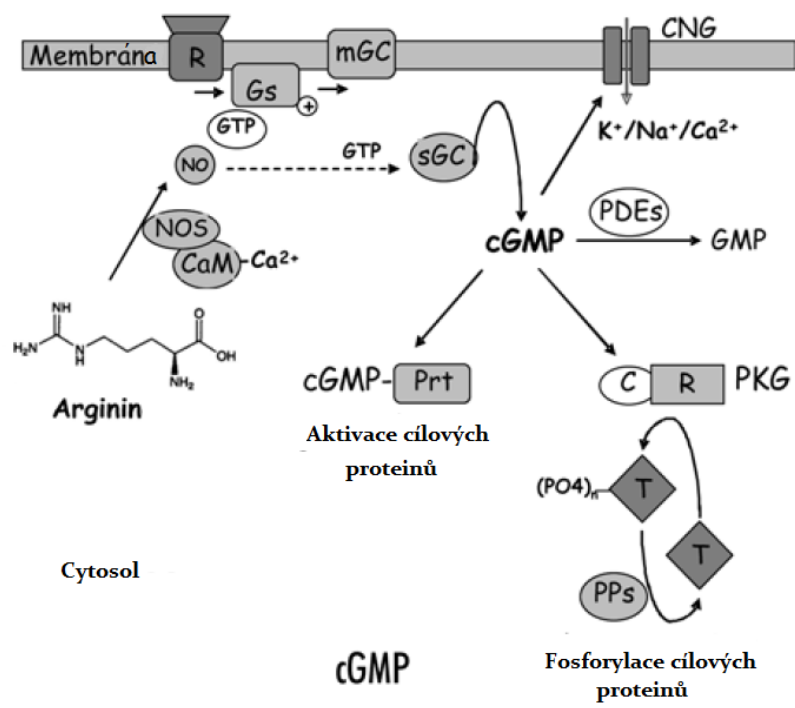
Proteinkinasa G je dimer skládající se z katalytické a regulační podjednotky. cGMP se váže do specifických míst na regulačních podjednotkách PKG a aktivuje podjednotky katalytické. Katalytické podjednotky umožní fosforylaci cílových míst v proteinech a zprostředkovávají rozmanité funkce: regulaci vaskulárního tonu, gastrointestinální funkce a neuronální aktivitu. Regulační podjednotka je schopna blokovat aktivní místa na jednotce katalytické (Sprenger a Nikolaev, 2013).

2.3.3 Funkce cGMP u živočichů a rostlin

V živočišných buňkách byla role cyklických nukleotidů dobře popsána, zatímco v rostlinných buňkách nejsou mechanismy působení cyklických nukleotidů objasněné úplně. Ovšem v posledních letech byly získány nové poznatky o úloze cGMP a GC v rostlinách (Martinez-Atienza *et al.*, 2007).

2.3.3.1 Funkce cGMP u živočichů

Řada podnětů vede ke zvýšení aktivity rozpustné guanylátcyklasy, která katalyzuje produkci cyklického guanosinmonofosfátu. cGMP je klíčová signální molekula, která se podílí na relaxaci hladkého svalstva, inhibici agregace krevních destiček, signalizaci homeostatické regulace, hraje důležitou roli ve smyslových systémech včetně zraku a čichu a reguluje řadu intracelulárních procesů (např. aktivaci neutrofilů) (Joudoi *et al.*, 2013; Chlieh *et al.*, 2011).



Obr. 4 – Schéma signálních drah cGMP v živočišných buňkách – Přítomnost NO vede prostřednictvím G-proteinu ke stimulaci GC a zvýšení buněčné hladiny cGMP. cGMP může být degradován pomocí specifických fosfodiesteras (PDE) za vzniku GMP. cGMP může také přímo aktivovat cGMP-závislé proteiny a iontové kanály (cyclic nucleotide gated – CNG). cGMP aktivuje cGMP-dependentní proteinkinasy G (PKG), které mohou fosforylovat velký počet cílových proteinů (target - T) a vyvolat tak buněčnou odezvu. R – receptor, Gc – G-protein, NOS – synthasa oxidu dusnatého, PPs – fosfatasa, CaM – calmodulin (upraveno podle Martinez-Atienza *et al.*, 2007).

2.3.3.2 Funkce cGMP u rostlin

Studie posledních let ukazují, že cyklické nukleotidy (cAMP a cGMP) jsou zapojeny v mnoha důležitých procesech u rostlin (regulace otevírání stomat, iontových kanálů na membránách, funkce chloroplastů, signalizační funkce rostlinných hormonů, regulační funkce homeostázy K⁺, Ca²⁺ a Na⁺, odpovědi na stresové podněty a genová transkripce). Hladiny cGMP v semenáčcích *Arabidopsis thaliana* jsou výrazně zvýšeny v odpovědi na zasolení a osmotický stres, což ukazuje na komplexní roli cGMP ve stresových odpovědích (Meier *et al.*, 2009).

cGMP reaguje na světlo a je zapojený v regulaci biosyntézy antokyanů a společně s Ca²⁺ aktivuje úplný vývoj chloroplastů (Teng *et al.*, 2010). Během výstavby chloroplastů cGMP vyvolává indukci genů, které kódují chalkonsynthasy (CHS) (EC 2.3.1.74), klíčové enzymy v biosyntéze antokyanů (Martinez-Atienza *et al.*, 2007, Chlieh *et al.*, 2011).

Syntéza cGMP je vyvolána v odpovědi na aktivaci signálních drah fytohormonů. Gibbereliny (GA) mohou vyvolat zvýšení hladiny cGMP a přítomnost cGMP je potřebná pro produkci a sekreci α -amylasy v semenech ječmene. cGMP je pozitivní regulátor klíčení u *Arabidopsis thaliana* (Chlieh *et al.*, 2011, Teng *et al.*, 2010). GA a cGMP interagují s dalším rostlinným hormonem: kyselinou abscisovou (ABA). Kyselina abscisová způsobuje uzavírání stomat přes meziprodukty zahrnující NO a H₂O₂. Díky blízkému vztahu mezi klíčením semen, fytohormony a cGMP, vědci došli k závěru, že cGMP možná reguluje klíčení semen díky interakci s fytohormony (GA, ABA), avšak zatím neexistují žádné studie, které by jednoznačně potvrzovaly funkci cGMP při klíčení (Chlieh *et al.*, 2011).

Pokud dojde k interakci mezi patogenem a korespondujícími geny rezistence v rostlině, dochází k aktivaci obranných mechanismů rostliny. Tento proces vyvolává produkci cGMP a mnoha signálních molekul: jasmonát (JA), ethylen, kyselina salicylová (SA) a v pozdější fázi také transkripční aktivaci obranných genů. Tyto odpovědi jsou často doprovázeny hostitelskou buněčnou smrtí, která je charakteristická tvorbou neurotických lézí v infikované oblasti (Meier *et al.*, 2009).

V případě nerozpoznání patogenu rostlinou je umožněn růst patogenu. Virulentní patogeny mohou vyvolat aktivaci rostlinného obranného mechanismu, který však není stejný jako ochranný mechanismus vyvolaný nevirulentním patogenem. Receptorové proteiny nerozpoznávají (ne)virulentní molekuly přímo, ale přes molekulový meziprodukt. Pozdější vyvolání cGMP nevirulentní infekcí je v souladu s předchozí detekcí patogenu a aktivací obranných odpovědí (Meier *et al.*, 2009).

U rostlin bylo zaznamenáno zvýšení hladin cGMP u smrku (*Picea abies*), tabáku (*Nicotiana tabacum*), sóji (*Glycine max*) a u *Arabidopsis thaliana*. V rostlinách inhibitory živočišné guanylátcyklasy zabránily indukované buněčné smrti rostlin a neindukovanému uzavření průduchů (Joudoi *et al.*, 2013).

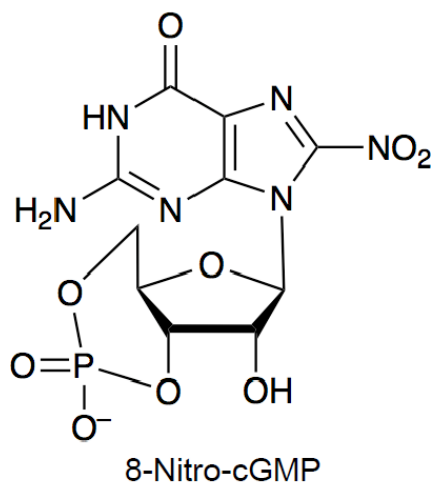
2.3.4 Degradace cGMP

Fosfodiesterasy (PDE) jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) a cyklického adenosin monofosfátu (cAMP). Při této reakci vznikají příslušné 5-monofosfáty. Fosfodiesterasy patří do 21-členné genové rodiny, v rámci které jsou seskupeny podle jedenácti různých primárních isoenzymů (s celkovým počtem 48 izoforem) na základě substrátové aktivity, selektivity a regulačních mechanismů. PDE5, PDE6 a PDE9 jsou vysoce selektivní pro cGMP,

zatímco PDE1, PDE2 a PDE11 mají substrátovou afinitu pro oba adeninové nukleotidy: cAMP a cGMP. Inhibitory fosfodiesteras zabraňují degradaci cGMP, čímž se zvyšují anebo prodlužují jeho účinky (Sawa *et al.*, 2013).

2.4 Cyklický 8-nitro-guanosinmonofosfát

Cyklický 8-nitro-guanosinmonofosfát (8-nitro-cGMP) je nitrovaný cyklický nukleotid odvozený od cyklického guanosinmonofosfátu. Výzkumy posledních let ukazují, že 8-nitro-cGMP je velmi důležitá signální molekula v biologických systémech. 8-nitro-cGMP je produkován za fyziologických a patofyziologických podmínek. 8-nitro-cGMP má jedinečné elektrofilní vlastnosti. 8-nitro-cGMP může sloužit jako jedinečný druhý posel regulující signální dráhy ROS v přítomnosti oxidu dusnatého (Ahmed *et al.*, 2012).



Obr. 5 – Vzorec cyklického 8-nitro-guanosinmonofosfátu (převzato ze Saito *et al.*, 2008).

8-nitro-cGMP může chránit buňky před oxidačním stresem, který souvisí s cytotoxicitou. Endogenní nukleotidy nacházející se v buňkách mohou být citlivé na hladinu ROS (Ihara *et al.*, 2011b).

Významná úloha 8-nitro-cGMP v signálních funkcích v biologických systémech je zprostředkována jeho dvojitým mechanismem účinku: kanonickou NO- a cGMP-závislou cestou a elektrofilní redoxní signalizací (Ahmed *et al.*, 2011).

K vyvolání nitrace guaninových nukleotidů není dostačující přítomnost pouze NO. K nitraci guaninových nukleotidů je třeba reaktivních forem kyslíku (ROS) nebo reaktivních forem dusíku (RNS) (Ihara *et al.*, 2011a). Peroxynitrit je schopen nitrovat guaninové nukleotidy, přičemž účinnost nitrace se mění v závislosti na struktuře

nukleotidů. GTP vykázal nejvyšší produkci nitrovaných nukleotidů. Účinnost nitrace pak klesá v následujícím pořadí: guanosin-5-difosfát, guanosinmonofosfát, cGMP. GTP je tedy považován za primární cíl pro biologické nitrace v buňkách za tvorby nitrovaného GTP (Sawa *et al.*, 2013).

Dalším účinným mechanismem pro nitraci guaninových nukleotidů mohou být reakce katalyzované myeloperoxidase (MPO) v přítomnosti H_2O_2 . MPO reaguje s H_2O_2 za vzniku meziprojektu MPOI, který může dále oxidovat dusíkaté sloučeniny za vzniku NO_2 . MPOI může také přímo oxidovat guaninové nukleotidy za vzniku guaninových radikálů. Takto vytvořené guaninové radikály mohou reagovat s NO_2 za vzniku nitrovaných guaninových nukleotidů (Sawa *et al.*, 2013).

Poslední studie nasvědčují, že nitrované deriváty jako je 8-nitro-cGMP, hrají ochrannou funkci v buněčné signalizaci. 8-nitro-cGMP působí jako buněčná signální molekula a signální kaskáda NO/8-nitro-cGMP působí při ochraně buňky (Sawa *et al.*, 2013).

Biochemické analýzy za použití purifikovaných enzymů (PDE1 a PDE5) zjistily, že 8-nitro-cGMP je odolný vůči hydrolyze závislé na aktivitě PDE (Sawa *et al.*, 2013).

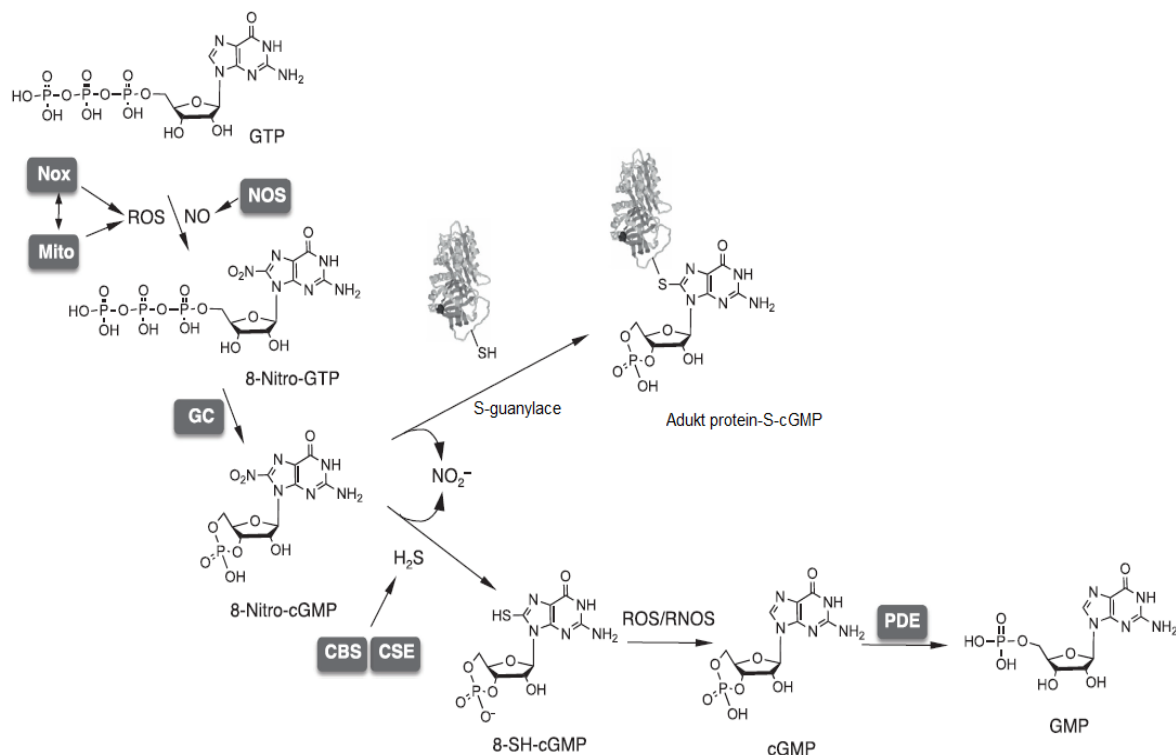
2.4.1 Vznik 8-nitro-cGMP

Studie ukázaly důležitost různých enzymů při tvorbě 8-nitro-cGMP: synthasy oxidu dusnatého (NOS), NADPH oxidasy (Nox) a guanylátacykly (GC). Různé izoformy NOS mohou hrát důležitou roli při vzniku 8-nitro-cGMP v různých tkáních a buňkách: vysoká aktivita indukibilní NOS (iNOS) může hrát významnou roli při tvorbě 8-nitro-cGMP v buňkách a tkáních, ve kterých probíhají zánětlivé procesy. Neuronální NOS (nNOS) může přispívat ke tvorbě 8-nitro-cGMP v dopaminergních neuronech (Sawa *et al.*, 2013).

Tvorba 8-nitro-cGMP (Obr. 6) vychází z guanosintrifosfátu (GTP), který reaguje s oxidem dusnatým (NO) a reaktivními formami kyslíku (ROS) za vzniku 8-nitro-GTP. Reakcí ROS a NO dochází ke vzniku RNOS. Příkladem RNOS je mimo jiné peroxynitrit ($ONOO^-$), což je velmi silné oxidační a nitrační činidlo a je tvořen reakcí NO a superoxidu (O_2^-). 8-nitro-GTP je přeměňován působením guanylátacykly na 8-nitro-cGMP. Předpokládá se tedy, že nitrace GTP je hlavní cestou, při které se tvoří 8-nitro-cGMP v buňkách (Akaike *et al.*, 2013).

Velmi důležitým faktorem při tvorbě 8-nitro-cGMP je jeho kritická závislost na buněčné produkci ROS, které mají původ v mitochondriálních komplexech I a III.

Pokud byly použity lapače ROS jako superoxid-dismutasa (SOD) nebo tiron (kyselina 1,2-dihydroxy-3,5-benzendisulfová), došlo téměř k úplnému zastavení produkce 8-nitro-cGMP, ale přitom hladina cGMP nebyla ovlivněna (Sawa *et al.*, 2013).



Obr. 6 – Vznik a metabolismus 8-nitro-cGMP. GC-guanylátcyklasa, CBS - cystathion- β -synthasa, CSE – cystathion- γ -lyasa, PDE - fosfodiesterasa, ROS - reaktivní formy kyslíku, RNOS - reaktivní formy kyslíku a dusíku (upraveno podle Sawa *et al.*, 2013).

Další možnou cestu vzniku 8-nitro-cGMP představuje reakce cGMP s peroxynitritem nebo s dusitanem a peroxidem vodíku v reakci katalyzované peroxidasami. Reaktivní formy dusíku (RNS) tedy vyvolávají nitraci cGMP a tvorba 8-nitro-cGMP je závislá na současné produkci NO i ROS. Reakcí samotného NO s cGMP ovšem 8-nitro-cGMP nevzniká (Okamoto *et al.*, 2010).

2.4.2 Funkce 8-nitro-cGMP u živočichů

Výsledky studií na zvířecích modelech poskytly důkazy o tom, že 8-nitro-cGMP je přítomný v tkáních za fyziologických podmínek a může být považován za relevantní signální molekulu *in vivo*. Sawa *et al.* (2007) použil savčí buňky k prokázání průběhu NO-dependentní nitrace cGMP za fyziologických a patofyziologických podmínek. Tento nitrovaný derivát aktivuje cGMP-dependentní proteinkinasu, která indukuje vazodilataci a inhibuje vazokonstrikci.

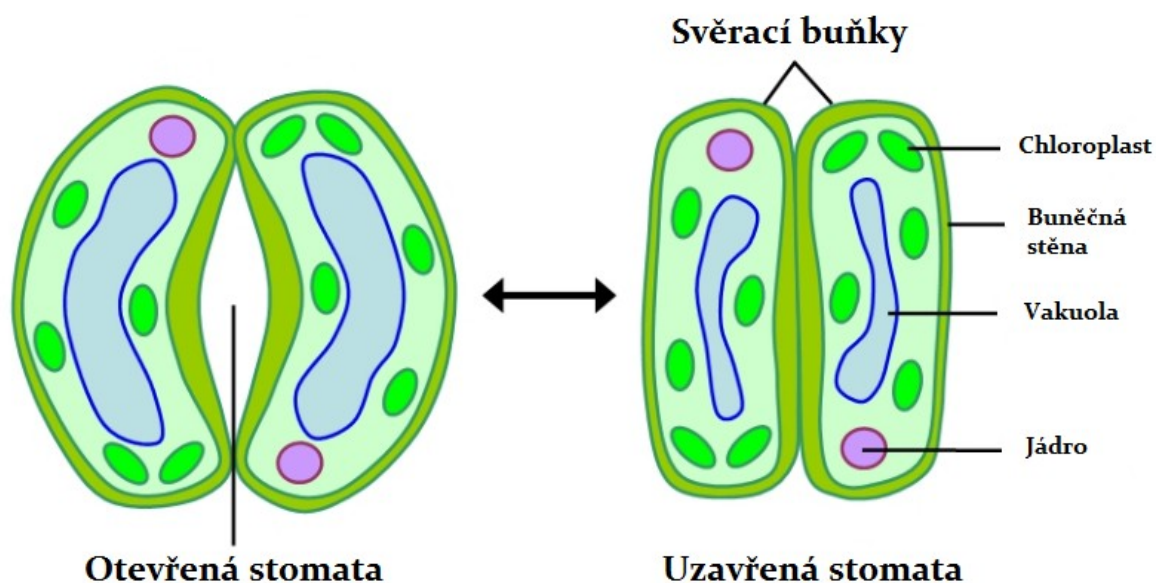
Tvorba 8-nitro-cGMP byla také prokázána v srdeční tkáni myši. Onemocnění srdce je jedním z nejčastějších onemocnění v moderní společnosti. ROS a NO vytvořené z iNOS a Nox2 hrají významnou roli při vyvolání srdečních onemocnění. 8-nitro-cGMP byl produkován v myších srdcích po infarktu myokardu nebo při vysokém krevním tlaku. Přítomnost 8-nitro-cGMP nebyla prokázána v aortě diabetických myši (Sawa *et al.*, 2013) a v srdcích iNOS-deficientních myši po infarktu myokardu (Akaike *et al.*, 2013). Podle Nishida *et al.* (2012) může mít aplikace 8-nitro-cGMP po infarktu myokardu prospěšné účinky na rekonvalescenci srdce a srdeční remodelaci.

Bylo prokázáno, že také LPS a ATP indukují v srdečních buňkách produkci NO prostřednictvím iNOS. Aktivace buněčné kultury krysích neonatálních srdečních myocytů a fibroblastů přidavkem ATP nebo LPS, vedla ke tvorbě endogenního 8-nitro-cGMP. Tento fakt vedl k závěru, že srdeční buňky v odpovědi na stimulaci pomocí rozdílných agonistů aktivně produkují 8-nitro-cGMP v iNOS-závislém mechanismu (Akaike *et al.*, 2013).

2.4.3 Funkce 8-nitro-cGMP u rostlin

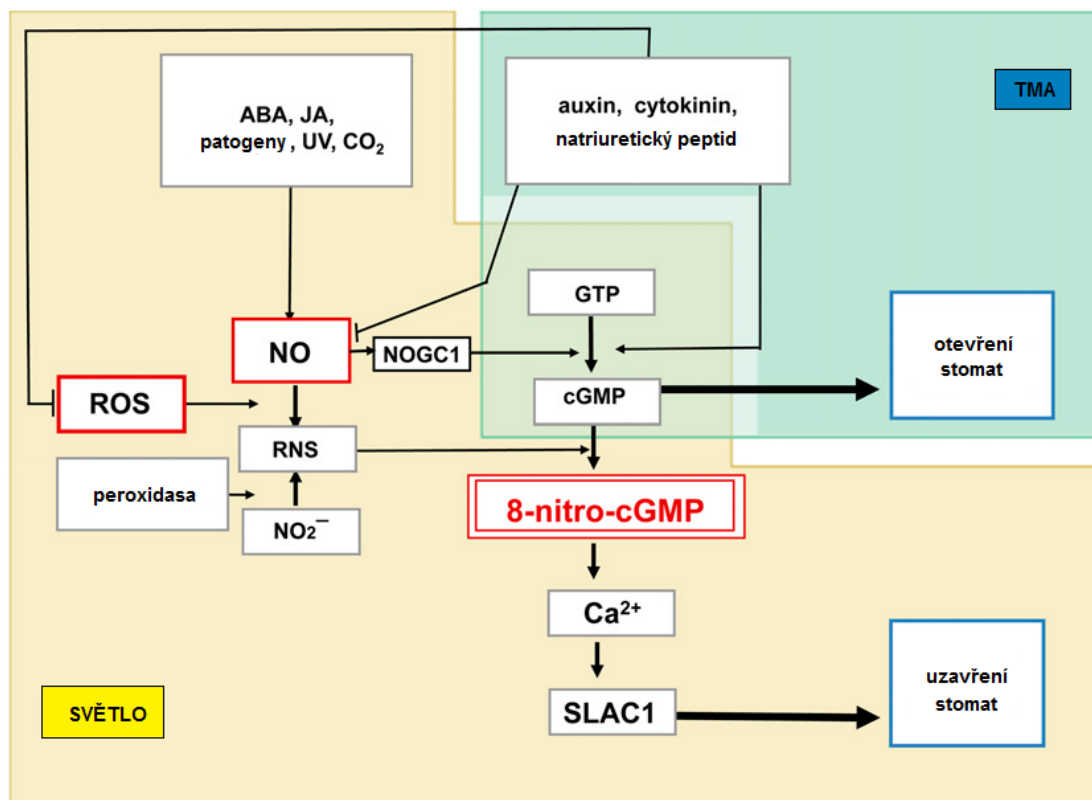
Signální funkce 8-nitro-cGMP u rostlin byly zatím popsány pouze v regulaci průduchů (Joudoi *et al.*, 2013). Průduchy (stomata) jsou regulované póry, které se nacházejí na povrchu rostlin a slouží k výměně plynů a vody mezi rostlinou a okolím. Průduchy jsou tvořeny dvojicí svěřacích buněk a průduchovou štěrbinou. Pokud dojde ke zvýšení turgorového tlaku ve svěřacích buňkách, dochází ke zvětšení průduchové štěrbinou a průduch se otevře. Naopak snížení turgorového tlaku ve svěřacích buňkách vede k následnému uzavření průduchů.

Otevření nebo uzavření průduchů je velmi úzce spjato s fotosyntézou. Průduchy rostlina vylučuje vodu a přijímá CO₂. Za normálních podmínek jsou průduchy na světle otevřené (probíhá fotosyntéza) a ve tmě jsou naopak uzavřené (fotosyntéza je neaktivní). Otvírání a uzavírání průduchů je mimo jiné regulováno vlhkostí, světlem, koncentrací oxidu uhličitého, patogeny a rostlinnými hormony. Svěřací buňky poskytují vhodný modelový systém pro studium přenosu signálu. Za nedostatku vody, kdy dochází k poklesu vodního potenciálu rostliny, dochází k syntéze kyseliny abscisové (ABA). Kyselina abscisová reguluje signální kaskádu, která vede k uzavření průduchu (Joudoi *et al.*, 2013).



Obr. 7 – Schematický náčrt otevřených a uzavřených průduchů.

V nedávno publikované studii bylo popsáno, že 8-nitro-cGMP vyvolává uzavírání průduchů na světle. Endogenní syntéza 8-nitro-cGMP ve svěracích buňkách je vyvolána v přítomnosti kyseliny abscisové, NO a ROS. Bylo zjištěno, že exogenní aplikace ABA, NO a ROS zvyšuje hladinu 8-nitro-cGMP ve svěracích buňkách. 8-nitro-cGMP spouští uzavírání průduchů, zatímco membránu-prostupující substituční analog cGMP, cyklický 8-bromguanosin-3,5-monofosfát (8-brom-cGMP) uzavření průduchů nevyvolává. Naproti tomu ve tmě bylo pozorováno, že pouze 8-brom-cGMP vyvolává otevření průduchů (Joudoi *et al.*, 2013). Zdá se tedy, že signální dráha NO a 8-nitro-cGMP je odlišná od klasické NO/cGMP dráhy (Obr. 8).



Obr. 8 – Schéma signálních drah 8-nitro-cGMP ve svěracích buňkách. Stimulační látky: kyselina abscisová (ABA), jasmonát (JA), UV, vysoká koncentrace CO_2 a patogeny vyvolávají na světle syntézu oxidu dusnatého (NO). NO vyvolává produkci cGMP přes NO-dependentní guanylátcyklasu1 (NOGC1). Stejně stimulační látky vyvolávají produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou reagovat s NO za vzniku RNS. Takto vytvořené RNS reagují s cGMP za vzniku 8-nitro-cGMP. 8-nitro-cGMP spouští cytoplazmatické zvýšení Ca^{2+} a aktivaci pomalého aniontového kanálu (slow anion channel 1 – SLAC1), což vyvolává uzavření stomat. Ve tmě další rostlinné hormony (auxiny, cytokininy a natriuretické peptidy) vyvolávají snížení hladiny NO a ROS a zvýšení cGMP, což má za následek otevření stomat (upraveno podle Joudoi *et al.*, 2013).

Patogeny vyvolávají rychlou produkci NO a H_2O_2 . Tyto látky spouštějí signální dráhy vedoucí k aktivaci obranných odpovědí rostlin, které zahrnují expresi genů pro obranné účely, hypersenzitivní reakce a uzavření průduchů. Kromě toho jsou NO a H_2O_2 důležité signální molekuly, které jsou zapojeny do významných fyziologických procesů jako je vývoj kořene, kořenový gravitropismus a klíčení semen. NO a ROS byly identifikovány jako základní složky signální kaskády, která vede k uzavření průduchů. To je způsobeno v reakci na jasmonát, UV, tmu a vysokou koncentraci oxidu uhličitého. V reakci na stresové faktory ochranné buňky generovaly ROS a NO současně, to znamená, že ROS a NO mají synergické působení v buněčné signalizaci a uzavírání průduchů. Nové poznatky o 8-nitro-cGMP naznačují, že signální dráhy ROS a NO se ve stomatech sbíhají v kroku nitrace guaninových nukleotidů (Joudoi *et al.*, 2013).

2.4.4 Metabolismus 8-nitro-cGMP

Oxidační stres v buňkách vyvolává tvorbu celé řady elektrofilních molekul včetně 8-nitro-cGMP. V buňkách je 8-nitro-cGMP relativně stabilní sloučenina, která zajišťuje signalizační funkce. 8-nitro-cGMP je zřejmě mnohem méně reaktivní než další endogenní elektrofilní, například nitrované mastné kyseliny. Podle aktuálních znalostí může být 8-nitro-cGMP metabolizován několika způsoby: reakcí s glutathionem katalyzovanou enzymy glutathion-S-transferasami (GST), thiolovým aniontem a thiolovými skupinami proteinů (S-guanylace).

2.4.4.1 Metabolismus 8-nitro-cGMP působením glutathion-S-transferas (GST)

Reakce nukleofilní thiolové skupiny glutathionu (GSH) s řadou elektrofilních sloučenin je katalyzována enzymy rodiny glutathion-S-transferas (GST, EC 2.5.1.13). Reaktivní elektrofilní, které se tvoří v buňkách v odpovědi na stres, jsou takto detoxifikovány pomocí GST. Předpokládá se, že by 8-nitro-cGMP mohl sloužit jako substrát GST, ovšem toto nebylo experimentálně prokázáno s použitím různých izoform GST. Díky nízké reaktivitě 8-nitro-cGMP vůči redukovanému glutathionu a nízké přeměně působením GST může 8-nitro-cGMP sloužit jako stabilní signální redoxní molekula (Akaike *et al.*, 2013).

2.4.4.2 Metabolismus 8-nitro-cGMP působením thiolového aniontu (HS⁻)

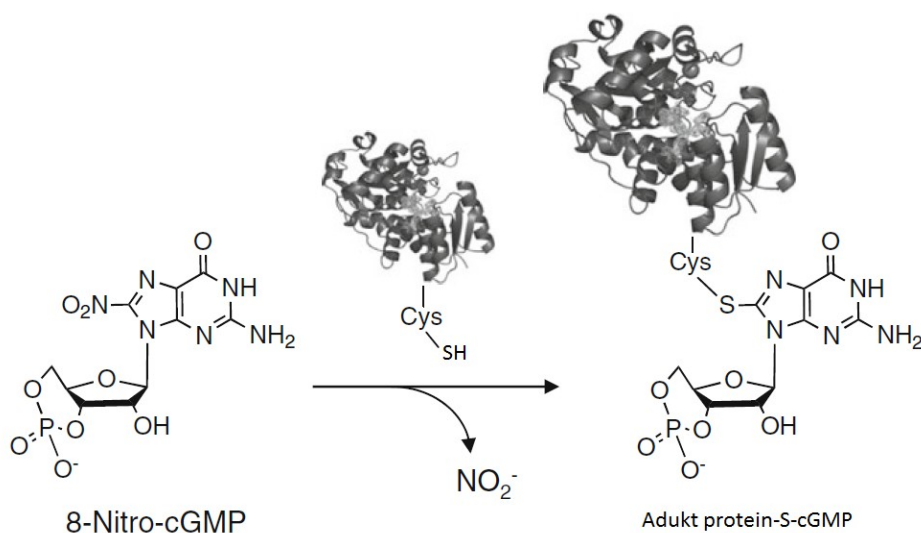
Sulfan je nejmenší thiol, který je utvářen v buňkách živočichů i rostlin prostřednictvím metabolismu cysteinu. Biosyntéza sulfanu probíhá působením dvou klíčových enzymů cystathion- β -synthasy (CBS) (EC 4.2.1.22) a cystathion- γ -lyasy (CSE) (EC 4.4.1.1). Ve vyšších koncentracích je sulfan velmi silný jed. Ovšem za kontrolované produkce na vhodném místě v nízkých koncentracích má sulfan protizánětlivé a antioxidační účinky. Protože rychlostní konstanta reakce H_2S a ROS má relativně malou hodnotu, nepředpokládá se, že by sulfan mohl být přímo lapačem ROS. Reakcí 8-nitro-cGMP se sulfanem dochází ke vzniku 8-SH-cGMP. 8-SH-cGMP je patrně velmi stabilním konečným produktem thiolových derivátů a 8-nitro-cGMP (Akaike *et al.*, 2013, Ida *et al.*, 2014).

2.4.5 Funkce 8-nitro-cGMP v S-guanylacii proteinů

Díky vysokému elektrofilitě 8-nitro-cGMP ochotně reaguje s vysoce nukleofilními thiolovými skupinami proteinových cysteinů za současného uvolnění nitro skupiny, která je nositelkou elektrofily. Dochází ke vzniku aduktu protein-S-cGMP. Tato reakce je známa jako tzv. S-guanylace (Obr. 9). Proteiny nesoucí vysoce reaktivní thiolovou skupinu cysteinu mohou být tedy možnými cíli pro S-guanylacii. Výsledný S-guanylovaný protein je stabilní vůči působení silných denaturačních a redukčních činidel jako jsou močovina a dithiothreitol (Sawa *et al.*, 2013).

Cystein je nejvíce nukleofilní aminokyselinou a tudíž ochotně reaguje s oxidanty (např. ROS) a elektrofilny endogenního nebo exogenního původu. Ovšem ne všechny cysteinové skupiny daného proteinu podléhají S-guanylacii. Pokud jsou některé thiolové skupiny deprotonizovány na thiolový anion ochotněji reagují s NO, RNOS a dalšími elektrofilny (Ahmed *et al.*, 2011).

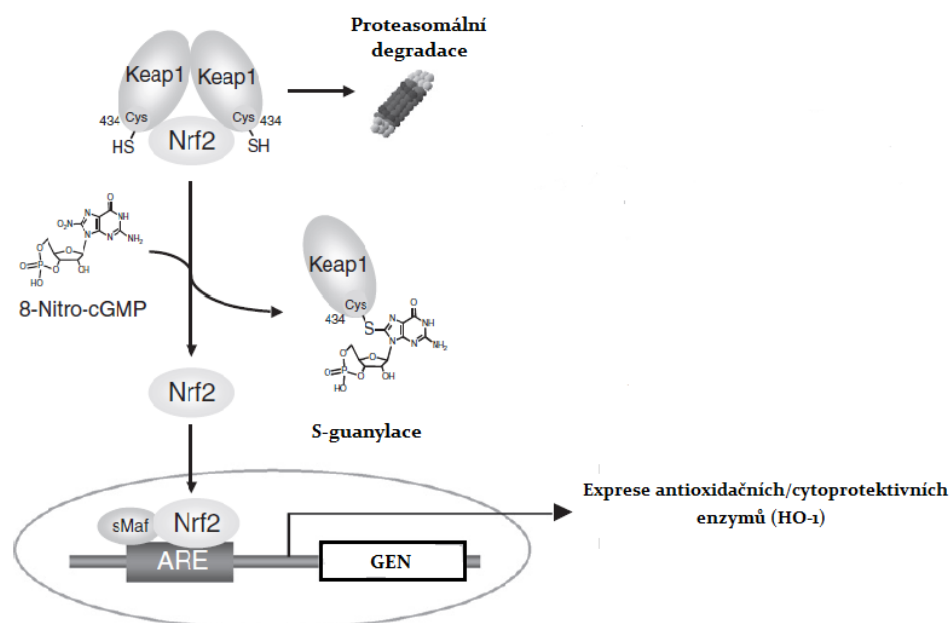
Modifikace thiolové skupiny cysteinu způsobené ROS a RNS mají důležitou funkci v regulaci aktivity mnoha proteinů a enzymů (oxidoreduktas, proteas, proteinkinasy a fosfatasy). Důležitost regulace thiolových meziproductů zahrnuje: I. inhibici enzymů přes modifikaci aktivního centra thiolů, II. thiolovou modifikaci, která je vyvolána funkčními a alosterickými modifikacemi (alosterická regulace) a III. regulaci interakcí protein-protein (Ahmed *et al.*, 2011).



Obr. 9 – Schéma reakce elektrofilní molekuly 8-nitro-cGMP s thiolovou skupinou proteinového cysteinu (upraveno podle Ahmed *et al.*, 2011).

2.4.5.1 S-guanylace proteinu Keap1

Jedním z popsaných cílů pro S-guanylace je protein Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein). Keap1 je považován za intracelulární sensorický protein citlivý na redoxní změny, protože obsahuje vysoce reaktivní cysteinová residua. Keap1 je negativním regulátorem transkripčního faktoru Nrf2 (NF-E2-related factor 2). Po modifikaci proteinu Keap1 S-guanylací je uvolněná aktivní forma Nrf2 translokována do jádra, kde spouští expresi antioxidantních, cytoprotektivních a detoxifikačních enzymů, včetně enzymu hemoxygenasy-1 (HO-1), která přispívá k adaptačním odpovědím na oxidační stres (Obr. 10). Naopak vazbou nemodifikovaného Keap1 na Nrf2 je inhibována transkripční aktivita Nrf2, přičemž komplex proteinů Keap1- Nrf2 zůstává lokalizován v cytosolu s následnou rapidní degradací Nrf2 v proteasomech (Okamoto *et al.*, 2010, Saito *et al.*, 2012, Sawa *et al.*, 2007).



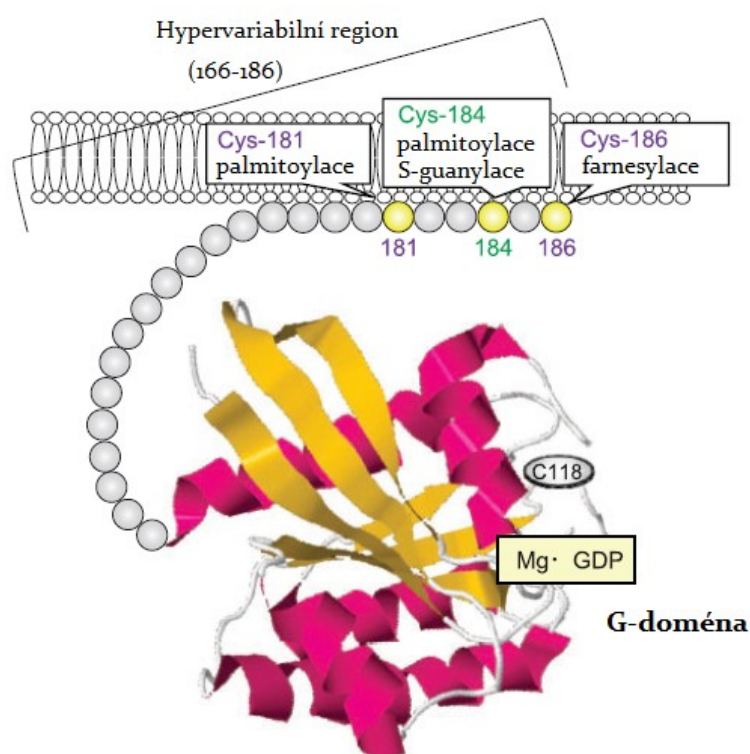
Obr. 10 – Schéma regulace transkripce antioxidantních enzymů vyvolaná prostřednictvím S-guanylace thiolových skupin cysteinu proteinu Keap1. ARE - antioxidant responsive element (upraveno podle Akaike *et al.*, 2010).

Studie používající hmotnostní spektrometrii ukázaly, že S-guanylace proteinu Keap1 v C6 buňkách se vyskytovala převážně na Cys434. Rentgenová krystalografická analýza ukázala, že Cys434 leží v blízkosti vazebného místa pro Nrf2 a hraje roli v umožnění interakce proteinů Keap1-Nrf2. S-guanylace Cys434 může usnadnit disociaci transkripčního faktoru Nrf2 z Keap1 (Sawa *et al.*, 2013).

Podobně jako u živočichů může 8-nitro-cGMP prostřednictvím S-guanylace senzorkého proteinu Keap1 indukovat antioxidační adaptivní reakce v buňkách bakterií, vedoucí k expresi genů kódujících antioxidační enzymy nebo enzymy II. fáze detoxikace (Ahmed *et al.*, 2012).

2.4.5.2 S-guanylace proteinu H-Ras

Protein H-Ras (Obr. 11) neboli transformní protein p21 je enzym, který je u lidí kódovaný genem *HRAS*. H-Ras obsahuje cysteinová residua, na kterých může probíhat S-guanylace.



Obr. 11 – Schéma struktury proteinu H-Rasa a umístění cysteinových residuí, které jsou náchylné k mnoha modifikacím včetně S-guanylace (upraveno podle Akaike *et al.*, 2013).

Strukturní změny srdce během chronického poškození jsou obvykle následkem zánětlivých procesů nebo dědičných poruch. H-Ras zprostředkovává signální cesty, které vedou k hypertrofickým kardiomyopatiím nebo kongenitálním srdečním defektům. Nitrační nebo oxidační stres způsobený ROS a RNOS může vyvolat buněčnou odezvu prostřednictvím modifikace proteinu H-Ras. Bylo prokázáno, že S-guanylace H-Ras při srdečním zánětu byla vyvolána pomocí meziproductu - 8-nitro-cGMP (Akaike *et al.*, 2013).

3 Praktická část

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Rostlinný materiál

- Semena *Arabidopsis thaliana* (ekotyp *Columbia*)

3.1.2 Použité chemikálie

- Agar (Sigma-Aldrich, Německo)
- Butan-1-ol (Lach-Ner, Česká republika)
- Carboxy-PTIO (Enzo LifeSciences Inc., USA)
- Cyklický 8-bromoguanosin-3',5'-monophosphate, sodná sůl (Sigma-Aldrich, USA)
- DAF-2 (Alexis Corporation, Švýcarsko)
- DAF-2 DA (Alexis Corporation, Švýcarsko)
- Dimethyl sulfoxid 99,9% (Sigma-Aldrich, USA)
- Dusitan sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Ethanol 96% (Lachema, Česká republika)
- Guanin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydroxid draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid draselný (Merck, Německo)
- Chlorid vápenatý (Penta, Česká republika)
- Chloroform (Merc KGaA, Německo)
- Isopentylnitrit 96% (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina iminoctová (Sigma-Aldrich, USA)
- MES hydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- Methanol (Lach-Ner, s.r.o., Czech Republic)
- Murashige and Schoog Basal Medium (Sigma-Aldrich, USA)
- Peroxid vodíku 30% (Lach-Ner, Česká republika)
- Propan-2-ol (Sigma-Aldrich, USA)
- Sacharosa (Sigma-Aldrich, USA)

- S-nitrosoglutathion (preparát připravený doc. Petřivalským)

3.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- Autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Box Biohazard Bioban 48 (Schoeller)
- Centrifuga Rotanta 460R (Schoeller)
- Digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo)
- Digitální předvážky (KERN, Německo)
- Elektromagnetická míchačka (IKA, Německo)
- Fotoaparát Sony A330
- Laminární box (Schoeller, ČR)
- Lyofilizátor (Leybold, Německo)
- Míchačka magnetická (IKA, Německo)
- Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA)
- Mikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko)
- Sterilizátor parní TUTNAUER (Tuttnauer)
- Termostat (Grant, UK)
- Třepačka vortex V-1 Plus (Biosan SIA)
- Třepačka VXR basic (IKA, Německo)
- Váhy Denver Summit (Biolink)
- Vortex (Stuart, UK)

3.3 Metody

3.3.1 Příprava pufřů a médií

3.3.1.1 Příprava fosfátového pufru

Navážka 1,79 g NaH_2PO_4 byla rozpuštěna ve vodě. Bylo upraveno pH na hodnotu 7,0 a objem byl doplněn na 100 ml.

3.3.1.2 Příprava pufru pro otevírání průduchů

Navážky 0,15 g KCl; 0,2 g kyseliny iminoctové a 0,39 g Mes hydrátu byly rozpuštěny ve vodě. Pomocí KOH bylo upraveno pH na hodnotu 6,15 a objem byl doplněn na 200 ml.

3.3.1.3 Příprava pevného MS média

Navážky 5 g sacharosy, 1,15 g MS soli a 0,25 g MES byly rozpuštěny ve vodě, bylo upraveno pH na hodnotu 5,9 pomocí KOH. Poté byl objem doplněn na 0,5 l a byly přidány 4 g agaru. Roztokem byl vysterilizován v autoklávu.

3.3.1.5 Příprava MES pufru

Navážka 56 mg CaCl_2 byla rozpuštěna ve vodě ($c=50$ mM). Navážky 195 mg MES a 7 mg KCl byly rozpuštěny ve vodě. K roztoku bylo přidáno 0,2 ml 50 mM roztoku CaCl_2 . Pomocí KOH bylo upraveno pH na hodnotu 7,0 a objem byl doplněn na 100 ml.

3.3.1.6 Příprava pufru s DAF-2

Do 10 ml MES pufru bylo přidáno 5 μl zásobního 5 mM roztoku DAF-2.

3.3.2 Sterilizace semen

Semena *Arabidopsis thaliana* byla sterilizována 70% etanolem po dobu 2 minut. Po odsátí ethanolu byla semena dvakrát propláchnuta sterilní deionizovanou vodou. Dále byla semena sterilizována roztokem Sava (ředěno vodou 1:1) po dobu 20 minut. Semena byla sedmkrát propláchnuta sterilní deionizovanou vodou.

3.3.3 Syntéza peroxynitritu

Bylo smícháno 9 ml 0,55 M NaOH a 10 ml isopropanolu. Za stálého míchání bylo pomalu přidáno 0,47 ml 30% H_2O_2 a 0,54 ml isopentylnitritu. Směs byla promíchávána

na míchačce po dobu 10 minut při teplotě 25 °C. Vodná fáze byla promyta čtyřikrát dvojnásobným objemem chloroformu, tedy čtyřikrát 40 ml chloroformu.

3.3.4 Syntéza 8-nitroguaninu

Navážka 0,018 g guanin hydrochloridu byla rozpuštěna v 10 ml 0,1 M fosfátového pufru. Za stálého míchání byly přidány 4 ml 10 mM peroxynitritu. Dále byla směs zneutralizována pomocí HCl.

Pro odstranění zbytku H₂O₂ byl vzniklý roztok promyt na komerční SPE kolonce s reverzní fází (Phenomenx Strata C18, 1,5 x 10 cm). Kolonka byla nejprve čtyřikrát promyta 2 ml 100% methanolu a čtyřikrát 2 ml destilované vody. Poté byla nanesena reakční směs po smíchání roztoků peroxynitritu a guaninhydrochloridu. Kolonka byla poté čtyřikrát propláchnuta 2 ml vody a postupně 2 ml 1%, 10%, 50% a 100% methanolu. Jednotlivé frakce byly zachyceny a uschovány v ledničce pro další analýzu.

3.3.5 Syntéza 8-nitro-cGMP

Do šroubovací plastové zkumavky bylo naváženo 5 mg 8-Br-cGMP a 5 mg NaNO₂. Bylo přidáno 1,5 ml DMSO obsahující 23 mM HCl. Vzorek byl ponechán na termostatu po dobu 5 dní při 70 °C. Poté bylo upraveno pH reakční směsi na hodnotu 9 pomocí přídatku 17,5 µl 0,1 M NaOH. Do zkumavky byly přidány 3 ml butanolu a 2 ml vody. Směs byla promíchána na vortexu a zkumavka byla poté centrifugována pro oddělení vrstev. Byla odebrána vodná fáze a pipetována po 0,5 ml do 1,5 ml mikrozkušavek. Vzorky byly lyofilizovány a poté uloženy do mrazicího boxu (-20 °C).

3.3.6 Mikroskopické pozorování průduchů *Arabidopsis thaliana*

Byly nachystány vzorky epidermis spodní strany listu *Arabidopsis thaliana* pro mikroskopické pozorování (epidermální stripy). List *Arabidopsis thaliana* byl pomocí pásky připevněn na podložku spodní stranou nahoru. Byly nachystány pásky 0,5 x 1 cm, do kterých byly vyříznuty otvory pomocí skalpelu o velikosti cca 2 mm². Tyto pásky byly přilepeny na spodní stranu listu, uhlazeny a následně došlo k pomalému stržení epidermis. Takto připravené stripy byly uchovávány v pufru pro otevírání průduchů. Připravené epidermální stripy byly dále inkubovány ve 12-jamkových destičkách v následujících roztocích: pufr pro otevírání průduchů (kontrolní vzorek) nebo pufr s přidávanými látkami ve výsledné koncentraci 46; 4,6; 0,46; 0,046 µM 8-nitro-cGMP; 10 µM ABA; 0,1 mM GSNO. Stripy byly inkubovány po dobu 2 h na světle. Jako

referenční vzorek byly použity epidermální stripy inkubované v pufru po stejnou dobu ve tmě.

3.3.7 Vyhodnocení šířky průduchové štěrbin

Bylo provedeno mikroskopické pozorování referenčních vzorků a vzorků po inkubaci s danými látkami (46 μM ; 4,6 μM ; 0,46 μM a 0,046 μM 8-nitro-cGMP; ABA a GSNO). Byly vyfotografovány jednotlivé preparáty s reprezentativním počtem průduchů při stonásobném zvětšení. V programu *ImageJ* 1.33 software (National Institute of Health, USA) byla změřena šířka průduchové štěrbin u jednotlivých vzorků.

3.3.8 Kultivace semenáčků *Arabidopsis thaliana* na pevném agarovém MS médiu

Byly připraveny zásobní roztoky: 200 μM 8-nitro-cGMP, 200 μM ABA a 10 mM GSNO. Bylo připraveno 80 ml sterilního agarového MS média. Médium bylo rozlito po 20 ml do menších nádob. První nádoba byla použita jako kontrola. Do druhé nádoby bylo přidáno 45 μl 200 μM 8-nitro-cGMP, do třetí 200 μl 200 μM ABA, a do čtvrté 200 μl 10 mM GSNO, ke kterému bylo přidáno 10 μl HCl pro lepší rozpustnost. Média byla rozlita na sterilní Petriho misky po 6 ml. Po ztuhnutí byla na jednotlivá média přenesena sterilní semena *Arabidopsis thaliana*. Petriho misky byly obaleny parafilmem, obaleny alobalem a uloženy na 4 dny do lednice. Poté byly Petriho misky přemístěny do fytotronu. Po třech dnech byly Petriho misky vyfotografovány a byla spočítána vyklíčená semena. Po pěti dnech byly Petriho misky vyfotografovány a bylo zváženo deset semenáčků z každé misky.

Pro přípravu vertikálních agarových misek bylo připravené agarové MS médium nalito do čtyř čtvercových Petriho misek. První miska sloužila jako kontrola. Do druhé misky bylo přidáno 115 μl 200 μM 8-nitro-cGMP, do třetí 500 μl 200 μM ABA a do čtvrté 500 μl 10 mM GSNO, ke kterému bylo přidáno 10 μl HCl pro lepší rozpustnost. Po ztuhnutí byla média rozříznuta sterilním skalpelem asi 3 cm od okraje po celé délce. Do řezu byla přenesena sterilní semena *Arabidopsis thaliana*. Misky byly obaleny parafilmem, zabaleny do alobalu a přeneseny do lednice na 4 dny. Poté byly misky přeneseny do fytotronu. Po čtyřech dnech byla změřena délka kořenů. Po deseti dnech byla změřena délka kořenů a misky byly vyfotografovány.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Syntéza 8-nitroguaninu

Z výchozích sloučenin guaninhydrochloridu a peroxynitritu byla podle návodu v literatuře provedena syntéza 8-nitroguaninu. Reakční roztok byl zneutralizován pomocí HCl a byl nanesen na SPE kolonku s reverzní fází C18. Byly zachytávány jednotlivé frakce vzorku a frakce eluované vodnými roztoky 1, 10, 50 a 100% methanolu. V daných vzorcích bylo proměřeno absorpční spektrum v rozsahu 340-450 nm. Výsledky ve srovnání se spektry publikovanými v literatuře nepotvrdily přítomnost 8-nitroguaninu, proto jsme s touto metodou dále nepracovali.

4.2. Syntéza 8-nitro-cGMP

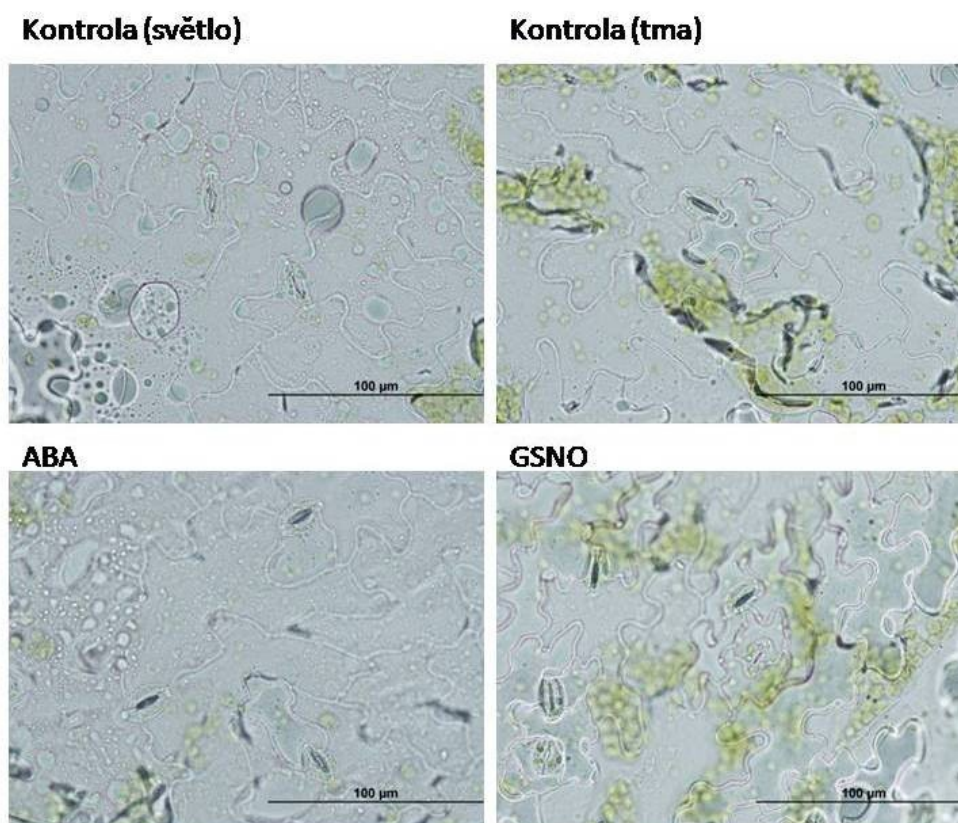
Syntéza 8-nitro-cGMP byla provedena podle postupu publikovaného v článku Sawa *et al.* (2007). Syntéza 8-nitro-cGMP vycházela z výchozí látky 8-Br-cGMP nitrované NaNO₂ v kyselém prostředí. Navážka 5 mg 8-Br-cGMP a 5 mg NaNO₂ byla rozpuštěna v DMSO a HCl a reakční směs byla inkubována po dobu 5 dní při teplotě 70 °C na termostatu. Poté bylo upraveno pH pomocí NaOH a byl přidán butanol a voda. Směs byla promíchána na vortexu. Byla odebrána vodná fáze, která byla rozpipetována po 0,5 ml do 1,5 ml mikrozkušavek. Vzorky byly lyofilizovány a uloženy do mrazáku při teplotě -20 °C pro další použití. Výtěžkem této reakce bylo osm mikrozkušavek s 8-nitro-cGMP o průměrné hmotnosti 0,18 mg. Výtěžnost reakce byla 14,4 %. Výtěžnost syntézy podle článku Sawa *et al.* (2007) byla 20,8 %. Pro použití 8-nitro-cGMP během dalších pokusů byl vzorek po lyofilizaci rozpuštěn ve vodě tak, aby výsledná koncentrace zásobního roztoku 8-nitro-cGMP byla 4,6 mM.

4.3 Vliv testovaných látek na uzavření průduchů

Byla připravena řada vzorků epidermálních stripů listů *Arabidopsis thaliana*. Šest skupin vzorků bylo inkubováno na světle po dobu 2 hodin s testovanými látkami (46 μM; 4,6 μM; 0,46 μM a 0,046 μM 8-nitro-cGMP; 10 μM ABA a 0,1 mM GSNO), další dvě skupiny vzorků sloužily jako kontrola: stripy inkubované v pufru na světle a ve tmě. Cílem mikroskopického pozorování bylo pozorovat průduchy v epidermis a kvantifikovat jejich uzavření v závislosti na přidaných látkách. Předpokladem bylo, že kyselina abscisová bude vyvolávat uzavření průduchů (Bright *et al.*, 2006), GSNO, jako donor NO, bude také vyvolávat uzavření průduchů (Tossi *et al.*, 2014) a 8-nitro-cGMP bude

vyvolávat uzavření průduchů (Joudoi *et al.*, 2013). Použití 8-nitro-cGMP o různých koncentracích sloužilo pro potvrzení hypotézy, že míra uzavření průduchů je závislá na koncentraci 8-nitro-cGMP v inkubačním pufu.

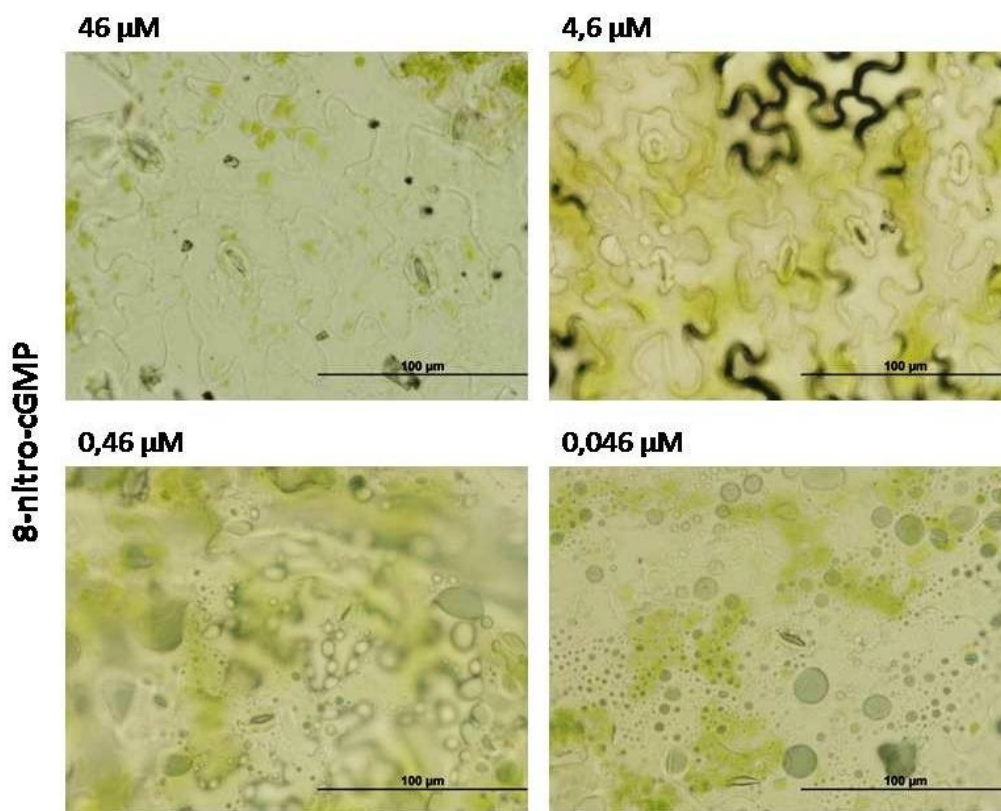
Na Obr. 12 můžeme pozorovat průduchy u kontrolních preparátů inkubovaných na světle a ve tmě a průduchy u preparátů inkubovaných s 10 μ M ABA a 0,1 mM GSNO. Otevřené průduchy lze dobře pozorovat u kontrolního preparátu inkubovaného na světle. Naopak uzavřené průduchy lze dobře pozorovat u kontrolního preparátu inkubovaného ve tmě a u preparátu inkubovaných s ABA a GSNO.



Obr. 12 – Mikroskopické snímky epidermis spodní strany listu *Arabidopsis thaliana* inkubované 2 hodiny s testovanými látkami (zvětšeno 400 x).

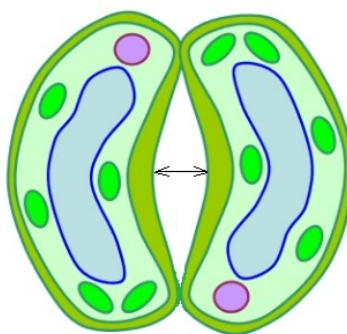
Na Obr. 13 můžeme pozorovat průduchy u preparátů inkubovaných s 8-nitro-cGMP (46 μ M; 4,6 μ M; 0,46 μ M a 0,046 μ M). U preparátů inkubovaných s 46 μ M a 4,6 μ M 8-nitro-cGMP je dobře pozorovatelné uzavření průduchů. Uzavření průduchů u vzorků inkubovaných s 46 μ M 8-nitro-cGMP bylo větší než u vzorků inkubovaných s 4,6 μ M 8-nitro-cGMP. U preparátů inkubovaných s 0,46 μ M a 0,046 μ M došlo k částečnému uzavření průduchů, které bylo ovšem menší než uzavření, které vyvolal 46 μ M 8-nitro-

cGMP. Tyto výsledky jsou v souladu s předpoklady dle publikované literatury (Joudoi *et al.*, 2013).



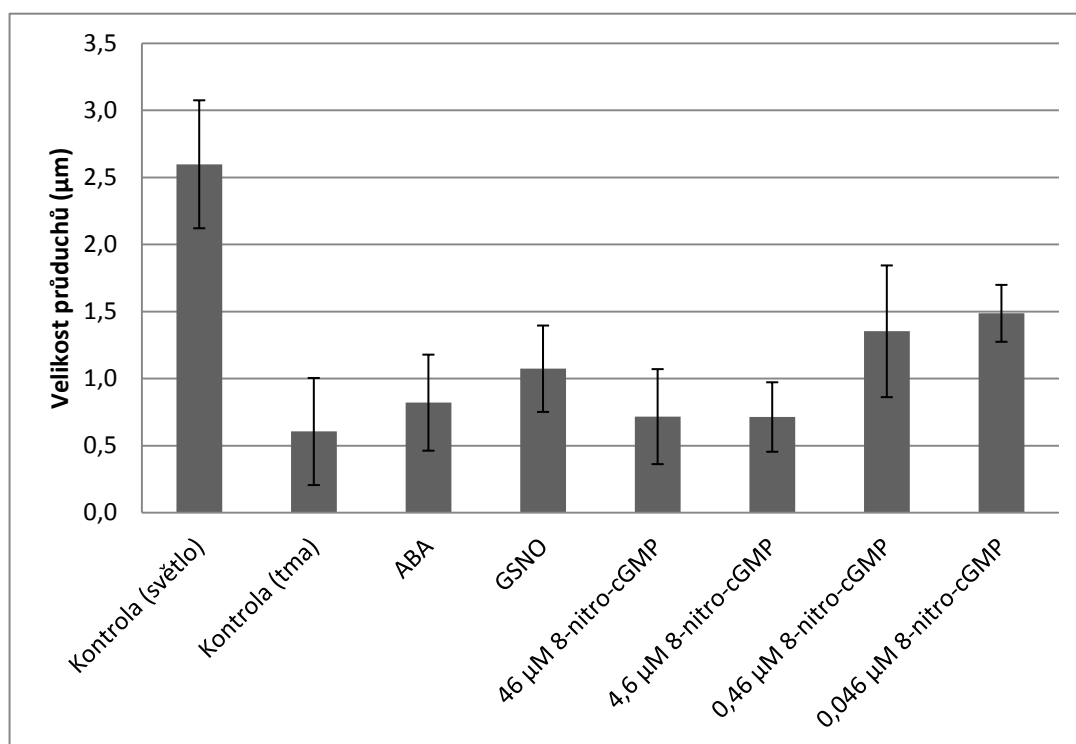
Obr. 13 – Porovnání vlivu různých koncentrací 8-nitro-cGMP na uzavření průduchů na epidermálních stripech *A. thaliana* (zvětšeno 400 x).

Na mikroskopu byly vyfotografovány jednotlivé preparáty s reprezentativním počtem průduchů při stonásobném zvětšení. V programu *ImageJ* 1.33 software (National Institute of Health, USA) byla změřena šířka průduchové štěrbinu u jednotlivých vzorků (viz. Obr. 14).



Obr. 14 – Schematický nákres průduchu (šipkou je označena šířka průduchové štěrbinu, která byla měřena v programu *ImageJ*).

Z grafu na Obr. 15 je patrné, že největší šířka průduchové štěrby byla naměřena u kontrolního preparátu, který byl uchovávan pouze v pufru pro otevření průduchů na světle ($2,6 \pm 0,47 \mu\text{m}$). Naopak nejmenší průduchová štěrbina byla naměřena u kontrolního preparátu, který byl uchován v pufru ve tmě ($0,6 \pm 0,39 \mu\text{m}$). Tato pozorování jsou v souladu s poznatky o regulaci uzavírání průduchů světlem. Na světle jsou průduchy otevřené kvůli probíhající fotosyntéze. Naopak ve tmě, kdy je fotosyntéza neaktivní, jsou průduchy uzavřené.



Obr. 15 – Vyhodnocení vlivu testovaných látek na uzavření průduchů v epidermálních stripech listů *Arabidopsis thaliana*.

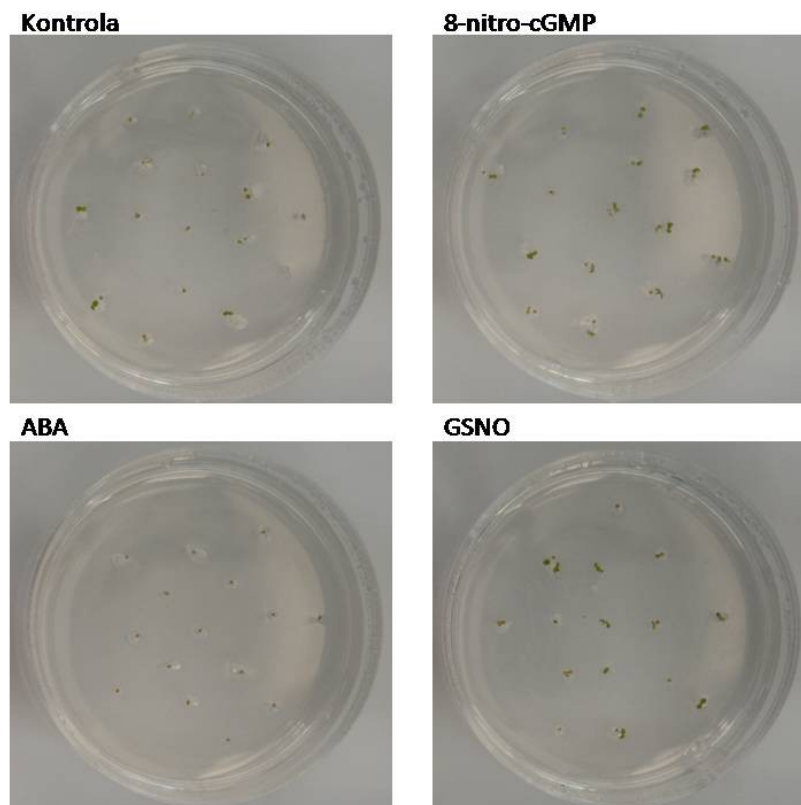
Kyselina abscisová v koncentraci $10 \mu\text{M}$ vyvolala uzavření průduchů ($0,8 \pm 0,36 \mu\text{m}$), které bylo téměř srovnatelné s kontrolním vzorkem uchovávaným ve tmě. Tento výsledek je v souladu se známým účinkem ABA jako rostlinného hormonu regulujícího uzavírání průduchů v odpovědi na vnější podněty (Bright *et al.*, 2006). GSNO v koncentraci $0,1 \text{ mM}$ také vyvolal výrazné uzavření průduchů, které ale bylo menší než uzavření, které vyvolala kyselina abscisová ($1,1 \pm 0,32 \mu\text{m}$). Tento výsledek je v souladu s popsanou funkcí NO jako signální látky účastnící se regulace uzavírání průduchů (Tossi *et al.*, 2014). $46 \mu\text{M}$ 8-nitro-cGMP vyvolal uzavření průduchů ($0,7 \pm$

0,35 μM). 4,6 μM 8-nitro-cGMP vyvolal také uzavření průduchů ($0,7 \pm 0,26 \mu\text{m}$). 0,46 μM 8-nitro-cGMP vyvolal mírné uzavření průduchů ($1,4 \pm 0,49 \mu\text{m}$) a 0,046 μM vyvolal také mírné uzavření průduchů ($1,5 \pm 0,21 \mu\text{m}$). Tato pozorování jsou v souladu s popsáním účinkem 8-nitro-cGMP u rostlin, kde 8-nitro-cGMP vyvolal uzavření průduchů listů inkubovaných na světle, zatímco 8-brom-cGMP vyvolal otevření průduchů listů inkubovaných ve tmě (Joudoi *et al.*, 2013). Se zmenšující se koncentrací 8-nitro-cGMP bylo pozorováno menší uzavření průduchů.

4.4 Vliv testovaných látek na klíčení semen *Arabidopsis thaliana*

Byly pořízeny fotografie jednotlivých misek se semeny *Arabidopsis thaliana* inkubovaných na pevném MS médiu po době 3 a 5 dnů (Obr. 16 a17). Byl spočítán počet vyklíčených semen *Arabidopsis thaliana* inkubovaných na pevném MS médiu po 3 dnech kultivace ve fytotronu a byla spočítána klíčivost (Tab. 1). U pětidenních semenáčků byla určena hmotnost skupiny deseti semenáčků z každé kultivační misky (Obr. 18). Předpokladem bylo, že kyselina abscisová bude inhibovat klíčení semen (Finkelstein *et al.*, 2002) a GSNO, jako dárce NO, bude vyvolávat klíčení semen (Corpas *et al.*, 2013). Testování funkce 8-nitro-cGMP v klíčení semen zatím nebylo popsáno v žádné vědecké publikaci.

Na obrázku 16 můžeme pozorovat klíčení u třídných semenáčků v závislosti na přidané látce. Na kontrolním médiu je patrný nárůst semenáčků. Semenáčky kultivované na médiu s 8-nitro-cGMP jsou v porovnání s kontrolními semenáčky větší. Klíčení semen kultivovaných na médiu s kyselinou abscisovou bylo zcela potlačeno. Tento výsledek je v souladu s teoretickou částí, protože kyselina abscisová inhibuje klíčení semen, a proto byly semenáčky značně menší. Semenáčky kultivované na médiu s GSNO byly větší než semenáčky kultivované na kontrolní misce. Tento výsledek je v souladu s teoretickou částí, protože GSNO podporuje klíčení semen a růst rostlin. Při porovnání semenáčků kultivovaných s 8-nitro-cGMP a GSNO jsme došli k závěru, že tyto látky mají téměř stejný účinek na klíčení semen.



Obr. 16 – Vliv testovaných látek na růst *Arabidopsis thaliana* kultivovaných na pevném agarovém MS médiu (třídenní semenáčky).

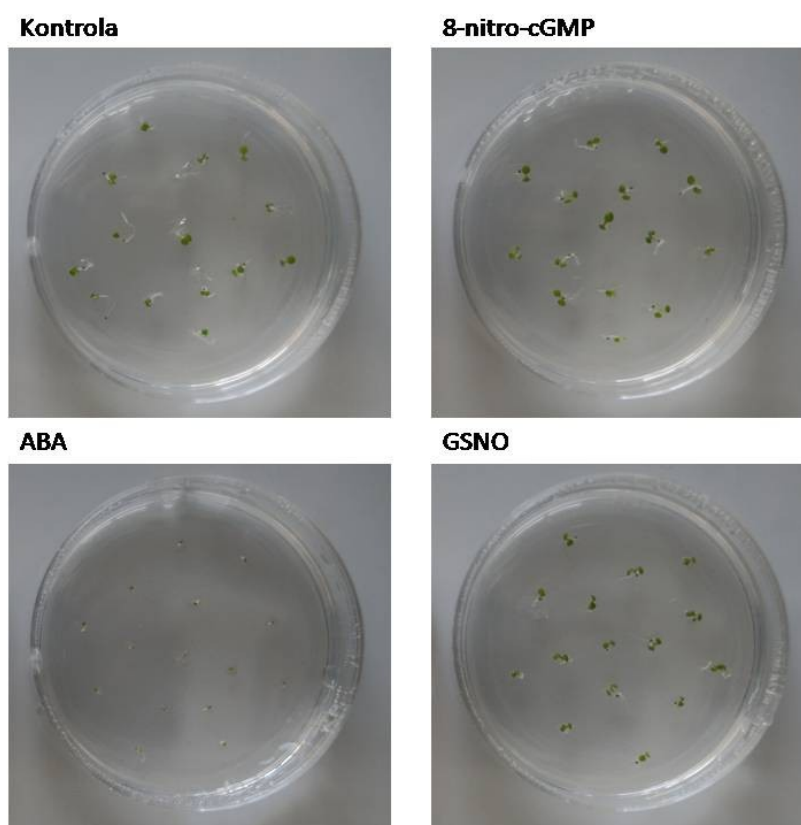
Tabulka 1 – Vliv testovaných látek na klíčivost semen *Arabidopsis thaliana* vyhodnocený po třídenní kultivaci

Látka	Vyklíčené	Nevyklíčené	Klíčivost (%)
Kontrola	15	0	100
8-nitro-cGMP	15	0	100
ABA	0	15	0
GSNO	12	3	80

Z tabulky 1 je patrné, že v kontrolní skupině semen na agarovém médiu bez přidaných látek došlo k vyklíčení všech semen. Semena kultivovaná na misce s 8-nitro-cGMP vyklíčila také všechna. Tento výsledek ukazuje, že 8-nitro-cGMP nemá inhibiční vliv na klíčení semen. Semena kultivovaná na misce s GSNO vyklíčila také téměř všechna (80%). Tento výsledek je v rozporu s teoretickými předpoklady. Předpokládalo se, že klíčivost semen inkubovaných s GSNO bude vyšší nebo srovnatelná s kontrolními semenáčky (Corpas *et al.*, 2013). Naopak semena kultivovaná na misce s kyselinou

abscisovou nevyklíčila vůbec. Tento výsledek je v souladu s očekáváním, protože kyselina abscisová má známý inhibiční účinek na klíčení semen (Finkelstein *et al.*, 2002).

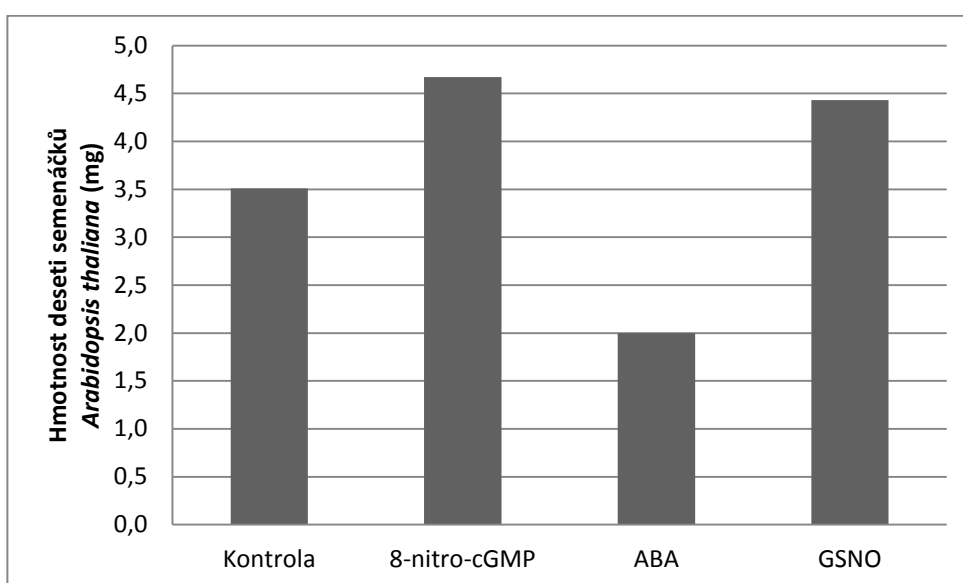
Na Obr. 17 můžeme pozorovat růst pětidenních semenáčků v závislosti na přidané látce. Na kontrolním médiu je patrný nárůst semenáčků. Semenáčky kultivované na médiu s 8-nitro-cGMP jsou v porovnání s kontrolními semenáčky větší. Semenáčky kultivované na médiu s kyselinou abscisovou jsou v porovnání s kontrolními semenáčky značně menší. Tento výsledek je v souladu s teoretickou částí. Kyselina abscisová inhibuje klíčení semen, a proto byly semenáčky značně menší. Semenáčky kultivované na médiu s GSNO byly větší než kontrolní miska. Tento výsledek je v souladu s teoretickou částí. GSNO podporuje klíčení semen a růst rostlin. Při porovnání pětidenních semenáčků kultivovaných s 8-nitro-cGMP a GSNO jsme došli k závěru, že 8-nitro-cGMP má větší účinek na klíčení semen a růst rostliny než GSNO.



Obr. 17 – Vliv testovaných látek na růst *Arabidopsis thaliana* kultivovaných na pevném agarovém MS médiu (pětidenní semenáčky).

Na Obr. 18 je přehled určených hmotností 10 pětidenních semenáčků *Arabidopsis thaliana* kultivovaných s 8-nitro-cGMP, ABA a GSNO. Semenáčky kultivované na

kontrolním médiu měly průměrnou hmotnost 3,51 mg. Z obrázku je patrné, že největší hmotnost (4,67 mg) byla zjištěna u semenáčků kultivovaných s 8-nitro-cGMP. Funkce 8-nitro-cGMP při klíčení a růstu rostlin zatím nebyla podle dostupné literatury nikým studována. Hmotnost semenáčků kultivovaných s GSNO (4,43 mg) byla vyšší než hmotnost kontrolních semenáčků. Tento výsledek je v souladu s teoretickou částí, protože GSNO jako donor NO podporuje růst rostliny (Corpas *et al.*, 2013). Nejmenší hmotnost (2,00 mg) byla navážena u semenáčků kultivovaných s ABA. Tento výsledek je v souladu s předpoklady, protože kyselina abscisová má inhibiční účinek na klíčení semen, a proto byly semenáčky menší než ostatní rostliny (Finkelstein *et al.*, 2002).



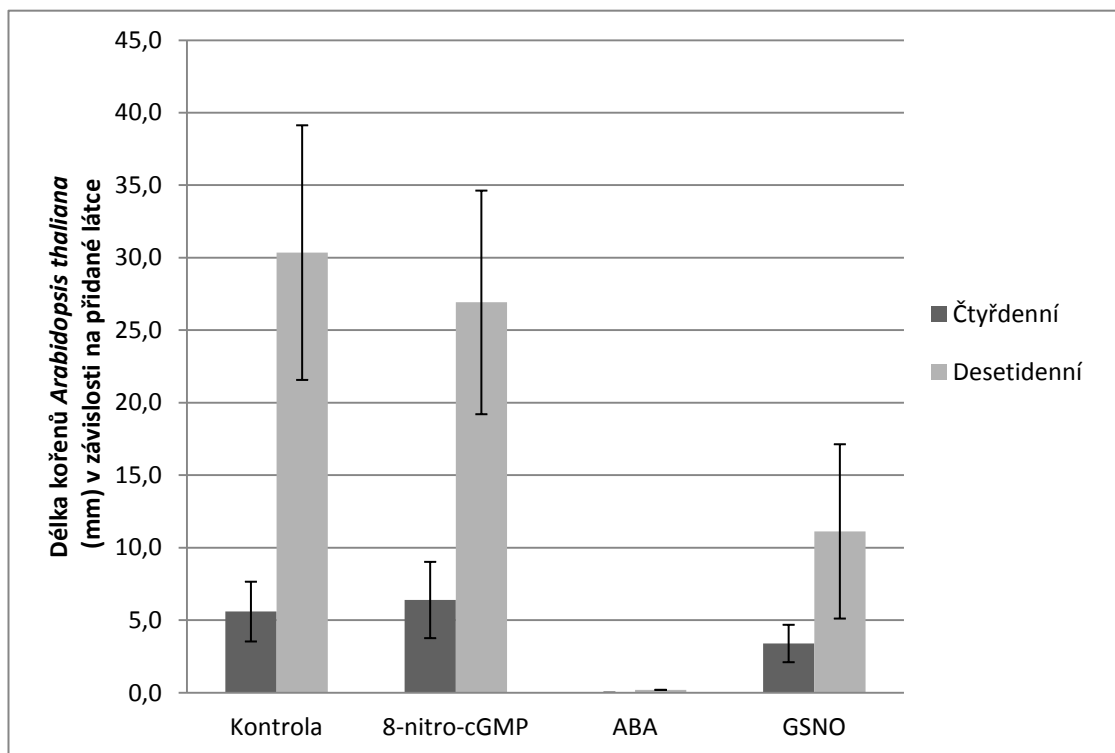
Obr. 18 – Vliv testovaných látek na hmotnost pětidenních semenáčků *Arabidopsis thaliana* kultivovaných na pevném agarovém MS médiu.

4.5 Vliv testovaných látek na růst kořenů

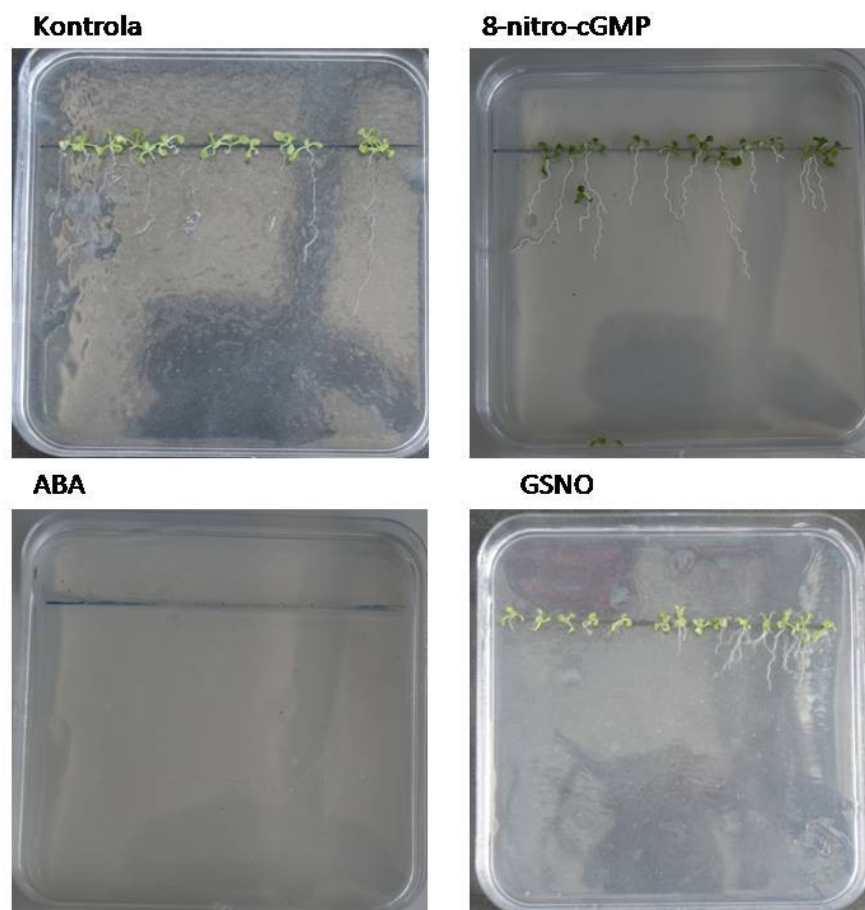
U semen *Arabidopsis thaliana* kultivovaných na vertikálním agaru byla po čtyřech dnech změřena průměrná délka kořenů. Po deseti dnech byly misky vyfotografovány a byla změřena průměrná délka kořenů. Předpokládali jsme, že kyselina abscisová bude inhibovat růst kořenů (Sharp a LeNoble 2002), a GSNO, jako dárce NO, bude stimulovat růst kořenů (Corpas *et al.*, 2013). Funkce 8-nitro-cGMP při růstu kořenů zatím není podložena žádnou vědeckou publikací.

Délka kořenů čtyřdenních semenáčků u kontrolní misky byla $5,6 \pm 2,06$ mm. Délka kořenů kultivovaných na médiu s 8-nitro-cGMP byla o 0,8 mm delší než u kontrolních kořenů ($6,4 \pm 2,63$ mm). Na médiu kultivovaném s kyselinou abscisovou nedošlo

k žádnému růstu kořenů. Tento výsledek je v souladu s teoretickou částí, protože kyselina abscisová inhibuje růst kořenů (Sharp a LeNoble 2002). Kořeny kultivované na médiu s GSNO vyrostly do průměrné délky $3,4 \pm 1,29$ mm. Tento výsledek je v rozporu s teoretickou částí, protože GSNO by měl podporovat růst kořenů (Corpas *et al.*, 2013). Výsledky mohly být zkreslené částečnou kontaminací tohoto vzorku nebo přidáním malého množství HCl pro zlepšení rozpustnosti GSNO.



Obr. 19 – Vliv testovaných látek na délky kořenů čtyřdenních a desetidenních semenáčků *Arabidopsis thaliana*.



Obr. 20 – Vliv testovaných látek na růst kořenů u desetidenních semenáčků *Arabidopsis thaliana*.

Kořeny desetidenních semenáčků u kontrolních vzorků vyrostly do průměrné délky $30,36 \pm 8,78$ mm. Délka kořenů kultivovaných na médiu s 8-nitro-cGMP byla o 3,36 mm kratší než u kontrolních kořenů ($26,92 \pm 7,71$ mm). Je nutné podotknout, že 8-nitro-cGMP je poměrně nová molekula a zatím nebyly prozkoumány pečlivě všechny mechanismy působení a interakce s prostředím. Na médiu kultivovaném s kyselinou abscisovou došlo k inhibici růstu kořenů. Tento výsledek je v souladu s teoretickou částí, protože kyselina abscisová inhibuje růst kořenů (Sharp a LeNoble, 2002). Kořeny kultivované na médiu s GSNO vyrostly do průměrné délky $11,13 \pm 6,01$ mm. Tento výsledek je v rozporu s teoretickou částí, protože GSNO by měl podporovat růst kořenů (Corpas *et al.*, 2013). Výsledky mohly být zkreslené částečnou kontaminací tohoto vzorku nebo přidáním malého množství HCl pro zlepšení rozpustnosti GSNO.

5 Závěr

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše týkající se biologických funkcí cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) a cyklického 8-nitro-guanosinmonofosfátu (8-nitro-cGMP) u živočichů a rostlin. Dále byly zpracovány literární rešerše zabývající se oxidem dusnatým, reaktivními formami kyslíku a S-guanylací proteinů.

Nejdůležitějšími výstupy z praktické části bakalářské práce, zaměřené na testování biologických vlastností 8-nitro-cGMP, jsou:

- V praktické části byla provedena syntéza 8-nitro-cGMP.
- Byl ověřen účinek 8-nitro-cGMP na uzavírání průduchů s využitím epidermálních stripů listů *Arabidopsis thaliana*.
- Byl pozorován stimulační účinek 8-nitro-cGMP v procesu klíčení semen *A. thaliana*.
- Nebyl pozorován významný vliv 8-nitro-cGMP na růst kořenů semenáčků *A. thaliana* na agarovém médiu.

V bakalářské práci byl ověřen účinek 8-nitro-cGMP na regulaci průduchů, klíčení a růst kořenů *Arabidopsis thaliana*. V budoucnu se nabízí detailnější prozkoumání funkce a úlohy 8-nitro-cGMP na vývoj a růst rostlin zavedenými experimentálními metodami.

6 Použitá literatura

- Ahmed K. A., Sawa T., Akaike T. (2011): Protein cysteine S-guanylation and electrophilic signal transduction by endogenous nitro-nucleotides. *Amino Acids* **41**, 123-130.
- Ahmed K. A., Sawa T., Ihara H., Kasamatsu S., Yoshitake J., Ramahan M., Okamoto T., Fujii S., Akaike T. (2012): Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signalling. *Biochemical Journal* **441**, 719-730.
- Akaike T. (2008): Protein S-guanylation induced by 8-nitro-cGMP. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **19**, S21-S21.
- Akaike T., Fujii S., Sawa T., Ihara H. (2010): Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **23**, 166-174.
- Akaike T., Ihara H., Sawa T. (2012): 8-SH-cGMP endogenously formed from 8-nitro-cGMP as a second messenger of hydrogen sulfide. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **27**, S14-S15.
- Akaike T., Nishida M., Fujii S. (2013): Regulation of redox signalling by an electrophilic cyclic nucleotide. *Journal of Biochemistry* **53**, 131-138.
- Aoki T., Ono K., Nakajima H., Yamaji R., Sawa T., Ihara H., Akaike T. (2010): Potential involvement of 8-nitro-cGMP in oxidative stress-induced inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **22**, S59.
- Bright J., Desikan R., Hancock J. T., Weir I. S., Neill S. J. (2006): ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal* **45**, 113 – 122.
- Corpas F. J., Alché J. D., Barroso J. B. (2013): Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in Plant Science* **4**, 126.
- Cosker F., Lima F. J. B., Lahlou S., Maghala P.J.C. (2014): Cytoprotective effect of 1-nitro-2-phenylethane in mice pancreatic acinar cells subjected to taurocholate: Putative role of guanylyl cyclase-derived 8-nitro-cyclic-GMP. *Biochemical Pharmacology* **91**, 191-201.
- Finkelstein R. R., Campala S. S. L., Rock C. C. (2002): Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *The Plant Cell* **14**, S15-S45.
- Fuchi Y., Sasaki S. (2012): Efficient covalent capture of 8-nitroguanosine via a multiple hydrogen-bonded complex. *Organic Letters* **16**, 1760-1763.
- Fujii S., Khan S., Ida T., Sawa T., Matsunaga T., Akaike T. (2014): 8-Nitro-cGMP-mediated autophagy in host defense and its regulation by hydrogen sulfide produced by bacteria. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **42**, 122-122.
- Fujii S., Sawa T., Ihara H., Tong K. I., Ida T., Okamoto T., Ahtesham A. K., Ishima Y., Motohashi H., Yamamoto M., Akaike T. (2010): The Critical Role of Nitric Oxide Signaling, via Protein S-Guanylation and Nitrated Cyclic GMP, in the Antioxidant Adaptive Response. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 23970-23984.
- Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2009): Nitrace proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické listy* **106**, 788-794.
- Huang G. F., Torrence P. F. (1977): Nitration of Pyrimidine Bases and Nucleotides by Nitronium Tetrafluoroborate. Synthesis of 5-Nitro-2'-deoxyuridine. *Journal of Organic Chemistry* **42**, 3821-3824.
- Chlieh F., Thomas L., Maronedze C., Irving H., Gehring C. (2011): Cyclic Nucleotides and Nucleotide Cyclases in Plant Stress Responses. In: *Abiotic Stress Response In Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. (Shanker A.K., Venkateswarlu B., eds.), Intech, 1-358.

Chong T. J., Victorino G. P. (2005): Cyclic nucleotide second messengers (cAMP and cGMP) play a central role in signal transduction and regulation of mesenteric postcapillary fluid leak. *The Journal of Trauma* **59**, 302-307.

Ida T., Sawa T., Ihara H., Tsuchiya Y., Watanabe Y., Kumagai Y., Motohashi H., Fujii S., Matsunaga T., Yamamoto M., Ono K., Fukuto J., Akaike T. (2014): Metabolism of 8-nitro-cGMP and regulation of electrophilic signaling by reactive sulfur species. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **42**, 126-127.

Ihara H., Ahtesham A. K., Ida T., Kasamatsu S., Kunieda K., Okamoto T., Sawa T., Akaike T. (2011a): Methodological proof of immunochemistry for specific identification of 8-nitroguanosine 3,5-cyclic monophosphate formed in glia cells. *Nitric Oxide* **25**, 169-175.

Ihara H., Sawa T., Nakabeppu Y., Akaike T. (2011b): Nucleotides function as endogenous chemical sensors for oxidative stress signaling. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **48**, 33-39.

Ishima Y., Hoshino H., Shinagawa T., Watanabe K., Akaike T., Sawa T., Kragh-Hansen U., Kai T., Watanabe H., Maruyama T., Otagiri M. (2012): S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **101**, 3222-3229.

Isner J. C., Maathuis F. J. M. (2011): Measurement of cellular cGMP in plant cells and tissues using the endogenous fluorescent reporter FlincG. *The Plant Journal* **65**, 329-334.

Isner J. C., Nühse T., Maathuis F. J. M. (2012): The cyclic nucleotide cGMP is involved in plant hormone signalling and alters phosphorylation of Arabidopsis thaliana root proteins. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3199-3205.

Ito C., Saito Y., Nozawa T., Fujii S., Sawa T., Inoue H., Matsunaga T., Khan S., Akashi S., Hashimoto R., Aikawa C., Takahashi E., Sagara H., Komatsu M., Tanaka K., Akaike T., Nakagawa I., Arimoto H. (2013): Endogenous Nitrated Nucleotide Is a Key Mediator of Autophagy and Innate Defense against Bacteria. *Molecular Cell* **52**, 794-804.

Joudoi T., Shichiri Y., Kamizono N., Akaike T., Sawa T., Yoshitake J., Yamada N., Iwai S. (2013): Nitrated Cyclic GMP Modulates Guard Cell Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 558-571.

Kurauchi Y., Hisatsune A., Isohama Y., Sawa T., Akaike T., Katsuki H. (2013): Nitric oxide/soluble guanylate cyclase signaling mediates depolarization-induced protection of rat mesencephalic dopaminergic neurons from mpp⁺ cytotoxicity. *Neuroscience* **231**, 206-215.

Ma N., Murata M., Ohnishi S., Thanan R., Hiraku Y., Kawanishi S. (2012): 8-Nitroguanine, a Potential Biomarker to Evaluate the Risk of Inflammation-Related Carcinogenesis. *Publisher Online*, <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/36394.pdf>.

Martinez-Atienza J., Ingelgem C. V., Roef L., Maathuis F. J. M. (2007): *Plant Cyclic Nucleotide Signalling* **6**, 540-543.

Meier S., Madeo L., Ederli L., Donaldson L., Pasqualini S., Gehring C. (2009): Deciphering cGMP signatures and cGMP-dependent pathways in plant defence. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 307-309.

Němčáková H., Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2010): Nitrované mastné kyseliny – nová skupina signálních molekul. *Chemické listy* **104**, 756-761.

Nishida M., Sawa T., Kitajima N., Ono K., Inoue H., Ihara H., Motohashi H., Yamamoto M., Suematsu M., Kurose H., Vliet A., Freeman B. A., Shibata T., Uchida K., Kumagai Y., Akaike T. (2012): Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature Chemical Biology* **8**, 714-724.

Nishida M., Toyama T., Akaike T. (2014): Role of 8-nitro-cGMP and its redox regulation in cardiovascular electrophilic signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **73**, 10-17.

- Okamoto T., Khan S., Oyama K., Fujii S., Sawa T., Akaike T. (2010): A New Paradigm for Antimicrobial Host Defense Mediated by a Nitrated Cyclic Nucleotide. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **46**, 14-19.
- Owusu B. Y., Stapley R., Akaike T., Patel R. P. (2013): Potential role for 8-Nitro-cGMP in nitrite-mediated hypoxic signaling. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **31**, S26-S27.
- Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008): Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chemické listy* **102**, 410-416.
- Rahaman M., Sawa T., Ahtesham A. K., Khan S., Inoue H., Irie A., Fujii S., Akaike T. (2014): S-Guanylation Proteomics for Redox-Based Mitochondrial Signaling. *Antioxidans & Redox Signaling* **20**, 295-307.
- Rawet-Slobodkin M., Elazar Z., (2013): 8-Nitro-cGMP-A New Player in Antibacterial Autophagy. *Molecular Cell* **52**, 767-768.
- Saito Y., Sawa T., Yoshitake J., Ito C., Fujii S., Akaike T., Arimoto H. (2012): Nitric oxide promotes recycling of 8-nitro-cGMP, a cytoprotective mediator, into intact cGMP in cells. *Molecular Biosystems* **8**, 2909-2915.
- Saito Y., Taguchi H., Fujii S., Sawa T., Kida E., Kabuto C., Akaike T., Arimoto H. (2008): 8-Nitroguanosines as chemical probes of the protein S-guanylation. *Chemical Communications* **45**, 5984-5986.
- Saito Y., Taguchi H., Fujii S., Sawa T., Kida E., Kabuto C., Akaike T., Arimoto H. (2008): 8-Nitroguanosines as chemical probes of the protein S-guanylation b. *Chemical Communications* **45**, 5984-5986.
- Sawa T., Ihara H., Ida T., Fujii S., Nishida M., Akaike T. (2013): Formation, signaling functions, and metabolisms of nitrated cyclic nucleotide. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **34**, 10-18.
- Sawa T., Zaki M. H., Okamoto T., Akuta T., Tokutomi Y., Kim-Mitsuyama S., Ihara H., Kobayashi A., Yamamoto M., Fujii S., Arimoto H., Akaike T. (2007): Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nature Chemical Biology* **3**, 727-735.
- Sharp R. E., LeNoble M.E. (2002): ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany* **53**, 33-37.
- Sprenger J. U., Nikolaev V. O. (2013): Biophysical Techniques for Detection of cAMP and cGMP in Living Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 8025-8046.
- Teng Y., Xu W., Ma M. (2010): cGMP is required for seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **167**, 885-889.
- Terzic V., Padovani D., Balland V., Artaud I., Galardon E. (2014): Electrophilic sulphydration of 8-nitro-cGMP involves sulfane sulfur. *Organic & Biomolecular Chemistry* **12**, 5360-5364.
- Tokutomi Y., Kataoka K., Yamamoto E., Nakamura T., Fukuda M., Nako H., Toyama K., Dong Y. F., Ahmed K. A., Sawa T., Akaike T., Kim-Mitsuyama S. (2011): Vascular responses to 8-nitro-cyclic GMP in non-diabetic and diabetic mice. *British Journal of Pharmacology* **162**, 1884-1893.
- Tossi V., Lamattia L., Jenkins G. I., Cassia R. O. (2014): Ultraviolet-B-induced stomatal closure in *Arabidopsis* is regulated by the UV RESISTANCE LOCUS8 photoreceptor in a nitric oxide-dependent mechanism. *Plant Physiology* **164**, 2220-2230.
- Zaki M. H., Fujii S., Okamoto T., Islam S., Khan S., Ahmed K.A., Sawa T., Akaike T. (2009): Cytoprotective Function of Heme Oxygenase 1 Induced by a Nitrated Cyclic Nucleotide Formed during Murine Salmonellosis. *Journal of Immunology* **182**, 3746-3756.

7 Seznam použitých zkratek

8-nitro-cGMP	cyklický 8-nitro-guanosinmonofosfát
ABA	kyselina abscisová
ANP	atriální natriuretický peptid
BNP	mozkový natriuretický peptid
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNP	natriuretický peptid typu C
cPTIO	karboxy-PTIO;2-(4-karboxyfenyl)- 4,4,5,5,tetramethylimindezolin-1-oxy-3-oxid
Duox	duální oxidasa
eNOS	endothelová synthasa oxidu dusnatého
GA	gibereliny
GC	guanylátcyklasa
GPx	glutathionperoxidasa
GSH	glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GST	glutathion S-transferasa
GTP	guanosintrifosfátu
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HClO	kyselina chlorná
HO-1	hemoxygenasa-1
CHS	chalkonsynthasa
iNOS	inducibilní synthasa oxidu dusnatého
JA	kyselina jasmonová
Keap 1	Kelch-like ECH-associated protein
LPS	lipopolysacharid
MPO	myeloperoxidasa
nNOS	neuronální synthasa oxidu dusnatého
NOS	synthasa oxidu dusnatého
Nox	NADPH oxidasa
NP	natriuretický peptid
Nrf2	NF-E2-related factor 2
O ₂ ⁻	superoxidový anion
ONOO ⁻	peroxynitrit

PDE	fosfodiesterasa
pGC	membránově vázaná guanylatcyklasa
PKG	cGMP-dependentní proteinkinasa G
RNOS	reaktivní formy dusíku a kyslíku
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SA	kyselina salicylová
sGC	rozpustná guanylátcyklasa
SOD	superoxiddismutasa
UV	ultrafialové záření
Tiron	kyselina 1,2-dihydroxy-3,5-benzendisulfonová