

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium produkce oxidu dusnatého a S-nitrosylace
proteinů u rajčete při působení abiotického stresu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Lucie Berčíková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tereza Tichá
Rok:	2016

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

V Olomouci dne 6.května 2016

Děkuji své školitelce Mgr. Tereze Tiché, za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, za poskytnutí potřebné literatury a čas věnovaný při zpracování experimentální i teoretické části bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat kolektivu Katedry biochemie za vstřícnost a příjemnou atmosféru při vypracovávání experimentální části práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lucie Berčíková
Název práce	Studium produkce oxidu dusnatého a S-nitrosylace proteinů u rajčete při působení abiotického stresu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Tereza Tichá
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

S-nitrosylace patří mezi jeden z nejdůležitějších molekulárních mechanismů v rámci buněčné signalizace oxidu dusnatého (NO). S-nitrosylace spočívá v reverzibilní navázání nitroso skupiny na thiolovou skupinu postranního řetězce cysteinu. V posledních letech byla provedena řada studií zabývajících se problematikou zapojení S-nitrosylovaných proteinů v obranné reakci rostlin při působení stresu. Studia naznačují, že za fyziologických či stresových podmínek dochází k vyšší produkci NO a následnému zvýšení produkce S-nitrosylovaných proteinů.

Tato práce se zabývá studiem produkce NO a S-nitrosylace v průběhu působení abiotického stresu ($50\text{-}200\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 a $50\text{-}150\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl) u modelového systému tří genotypů rajčete (*S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites*, *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom). Cílem studie bylo zjistit, jak aplikace salinitního stresu či stresu těžkými kovy ovlivňuje produkci NO. Dále zaznamenat případné změny hladiny S-nitrosothiolů a také S-nitrosylace proteinů. Byl sledován vliv na vývoj klíčnicích rostlin *Solanum* spp., tj. na fyziologické parametry – délku primárního kořene a délku nadzemní části. Pomocí dvou fluorescenčních sond (DAF-FM-DA a CuFL) byl sledován nárůst hladiny NO u všech studovaných genotypů v závislosti na koncentraci testované látky. Prvotní výsledky také naznačují zvýšenou produkci S-nitrosothiolů a S-nitrosylovaných proteinů detekovaných metodou biotin-switch. Oba typy abiotického stresu způsobily morfologické změny v primárních a postranních kořenech.

Klíčová slova	Oxid dusnatý; S-nitrosylace; S-nitrosothioly; S-nitrosoglutathionreduktasa; těžké kovy, salinita
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Lucie Berčíková
Title	Study of nitric oxide production and protein S-nitrosylation in tomato under the effect of abiotic stress
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Tereza Tichá
The year of presentation	2016

Abstract

Protein S-nitrosylation, the covalent binding of nitric oxide (NO) to protein cysteine residues, is one of the main mechanisms of NO signaling in cells. In recent years, a wide number of studies dealt with the involvement of S-nitrosylated proteins in the plant defense responses after exposure to stress conditions. It was suggested that stress conditions leads to the increased levels of NO and subsequent increase in the production of S-nitrosylated proteins.

This work is focused on the study of NO production and S-nitrosylation during different abiotic stress conditions (50-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 and 50-150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl) using as the model plants three tomato genotypes (*S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites*, *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom). The main objectives included to study if salinity or cadmium treatment promotes NO production, to detect any changes in S-nitrosylation pattern and overall impact on growth rate. Using two different fluorescent probes (CuFL and DAF-FM-DA) was observed gradual increase in NO production depending on the concentration of sodium chloride or cadmium chloride. Preliminary data also suggests increased production of S-nitrosothiols in concentration-dependent manner and S-nitrosylated proteins were detected using biotin-switch technique. Both types of abiotic stress factors caused morphological changes in primary and lateral roots.

Keywords	Nitric oxide; S-nitrosylation; S-nitrosothiols; S-nitrosoglutathione reductase; heavy metals, salinity
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Role oxidu dusnatého u rostlin	2
2.1.1	Biosyntéza NO	3
2.1.2	Signální dráhy NO	6
2.1.3	Funkce NO při působení abiotického stresu.....	7
2.2	S-nitrosylace	9
2.2.1	Stabilita S-nitrosothiolů.....	10
2.2.2	Regulace významných rostlinných proteinů při působení abiotického stresu. 12	
2.3	Experimentální metody studia produkce NO a S-nitrosylace.....	14
2.3.1	Fluorescenční sondy DAF-FM a DAF-FM diacetát	14
2.3.2	Fluorescenční sonda CuFL	16
2.3.3	Biotin-switch.....	17
3	Experimentální část.....	19
3.1	Materiál a přístroje	19
3.1.1	Chemikálie.....	19
3.1.2	Přístroje a vybavení.....	20
3.1.3	Rostlinný materiál	20
3.1.3.1	Sterilizace, klíčení a výsev semen na MS médium.....	21
3.1.3.1.1	Příprava MS média	22
3.1.3.2	Výsev semen do perlitu	23
3.1.3.2.1	Příprava Hoaglandova roztoku	23
3.1.3.3	Vyhodnocení délky kořenů.....	24
3.2	Experimentální metody	24
3.2.1	Histochemie	24
3.2.2	Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch	24
3.2.2.1	Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové	26
3.2.3	Stanovení koncentrace S-nitrosothiolů Savillovou metodou.....	26
3.2.4	Western blot.....	27
4	Výsledky a diskuze	30
4.1	Vliv abiotického stresu na vývoj délky kořenů a nadzemní části.....	30
4.2	Vliv abiotického stresu na produkci oxidu dusnatého v kořenech	33
4.3	Vliv abiotického stresu na produkci S-nitrosothiolů a S-nitrosylovaných proteinů.....	40
5	Závěr.....	46
6	Literatura	47
7	Seznam použitých zkratk	54

CÍLE PRÁCE

V teoretické části bylo cílem vypracování literární rešerše zaměřené na roli oxidu dusnatého u rostlin, charakterizaci S-nitrosylace (mechanismus, biologická aktivita S-nitrosothiolů či modifikace významných rostlinných proteinů). Dále také shrnout aktuální poznatky o používaných experimentálních metodách pro studium produkce oxidu dusnatého v mikroskopii a S-nitrosylace proteinů.

Cílem experimentální části bylo aplikovat abiotické stresové podmínky (salinita, těžké kovy) na rostliny tří genotypů rajčete pěstované za sterilních podmínek a sledovat jejich vliv na fyziologické parametry. V kořenech stresovaných rostlin byla stanovena histochemií produkce NO s využitím dvou fluorescenčních sond. Dále byl stanoven obsah celkových S-nitrosothiolů Savillovou metodou. S-nitrosylované proteiny byly izolovány, značeny pomocí metody biotin-switch a detekovány imunochemicky na membráně.

1 ÚVOD

Oxid dusnatý (NO) se řadí mezi nejjednodušší biologicky aktivní molekuly. Od konce 90. let minulého století se tato molekula stala předmětem intenzivních studií jak v živočišných, tak i v rostlinných systémech. NO má *in vivo* funkci tzv. univerzálního posla hrajícího důležitou roli u řady fyziologických a patofyziologických procesů. U živočichů má významnou funkci v kardiovaskulárním systému, kde reguluje tonus cév a krevní tlak. Působí rovněž jako účinné plicní vazodilatans, čehož se využívá k léčbě akutních i subakutních plicních hypertenzních stavů. V rostlinách se NO podílí na regulaci klíčení, růstu kořenů, zavírání průduchů, kvetení, programované buněčné smrti či je produkován v obranných reakcích při působení stresových faktorů.

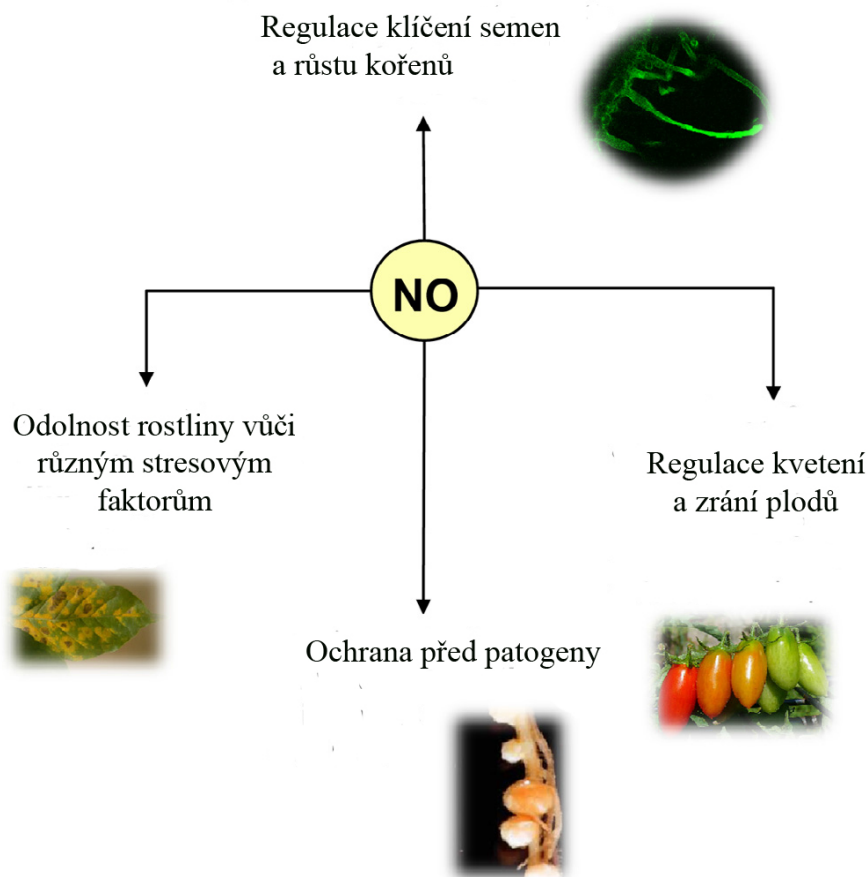
S-nitrosylace patří mezi jeden z nejdůležitějších molekulárních mechanismů, kterým NO reguluje funkce proteinů. Vznik S-nitrosylovaných proteinů spočívá v kovalentním navázání nitroso skupiny (-NO) na thiolovou skupinu postranního řetězce cysteinu za vzniku S-nitrosothiolu (RSNO). S-nitrosoglutathion (GSNO), stabilní zásobárna NO *in vivo*, je nejvýznamnějším představitelem nízkomolekulárních RSNO. V signálních drahách se významně se podílí na procesu trans-nitrosylace, kdy dochází k přenosu -NO skupiny mezi thioly. Na odbourávání GSNO v buňkách se podílí enzym S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR). Katalýzou NADH-dependentní redukce GSNO vzniká oxidovaný glutathion (GSSG) a amoniak (NH₃). Tato reakce má klíčové postavení v udržování homeostázy NO v buňkách.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Role oxidu dusnatého u rostlin

Oxid dusnatý (NO) začal být předmětem intenzivního studia na počátku 90. let uplynulého století zejména v oblastech medicíny, biochemie, fyziologie a genetiky. Nejprve byl NO studován u živočichů, kdy v roce 1986 byl popsán jako účinný endogenní vasodilatátor v endoteliálních buňkách (Ignarro *et al.*, 1987). V roce 1992 byl NO přidělen titul "molekula roku" a o šest let později v roce 1998 byla udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu za objev NO v kardiovaskulárním systému skupině vědců Robertu Furchgottovi, Louisi Ignarrovi a Feridu Muradovi. Přestože je výzkum NO v živočišných systémech mnohem pokročilejší, v posledních desetiletí byla věnována pozornost mechanismu syntézy NO i u rostlin. Ve srovnání s živočichy byla emise NO u rostlin pozorována mnohem dříve, a to již v roce 1975 L. A. Klepperem v rostlinách sóji ošetřených herbicidy.

NO je malý, volný reaktivní radikál s 15 elektrony, z toho jeden je nepárový (Krasylenko *et al.*, 2010). Díky jeho lipofilní povaze může volně difundovat přes buněčné membrány a dostávat se snadno do buňky. Má rovněž krátký poločas rozpadu, který lze určit v biologických systémech v řádu sekund (Thomas *et al.*, 2001). Jedná se o tzv. univerzálního posla, který hraje důležitou roli v řadě fyziologických a patofyziologických procesech. Obecně se NO podílí na regulaci klíčení, růstu kořenů, zavírání průduchů, kvetení, programované buněčné smrti (Martínez-Ruiz a Lamas, 2007). NO se také vytváří ve velkém množství při obraně hostitele a imunologických reakcích, kde pomáhá blokovat replikaci virů, zabíjet bakterie a jiné napadající mikroorganismy (Tuteja *et al.*, 2004). Mimo jiné se při stresových podmínkách podílí na odpovědi a v mechanismech odolnosti na různé formy biotických i abiotických faktorů u rostlin (Wendehenne *et al.*, 2005).



Obr. 1 Souhrn hlavních funkcí NO při fyziologických a patologických procesech u rostlin (upraveno podle Corpas a Barroso, 2014).

2.1.1 Biosyntéza NO

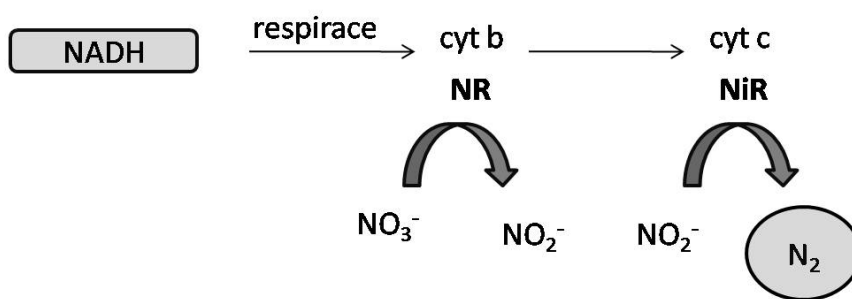
Biosyntéza NO u rostlin může probíhat různými enzymatickými i neenzymatickými cestami. V posledním desetiletí bylo vynaloženo značné úsilí najít enzym, který produkuje NO reakčním mechanismem obdobným jako NO-synthasa (NOS) v živočišných buňkách. Řada publikací naznačuje přítomnost NOS aktivity u rostlin, ale existence tohoto enzymu nebyla doposud jednoznačně experimentálně prokázána. Studie Foresi *et al.*, 2010 prokázala existenci tohoto enzymu u nižší rostliny *Ostreococcus tauri*, avšak u vyšších rostlin nebyly dosud popsány homologní geny (Fröhlich a Durner, 2011).

Prvním jednoznačně identifikovaným enzymovým zdrojem NO u rostlin je nitrátoreduktasa (NR, EC 1.7.1.1). Jeho hlavní úloha spočívá v redukcí dusičnanů na dusitany. Má dvojí roli: asimilační a disimilační. Disimilace slouží k reoxidaci NADH v respiračním řetězci. Dusičnan je zde terminálním akceptorem namísto kyslíku a je pevně

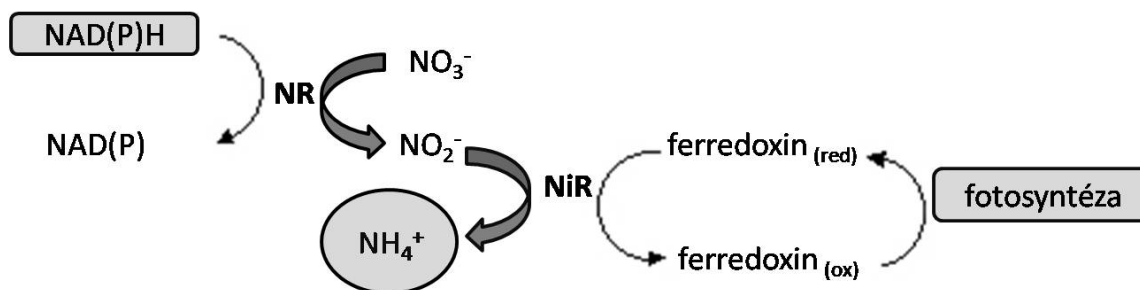
vázán na membránu k cytochromu b. Asimilační nitrátreduktasa se vyskytuje především v chloroplastech. Redukuje dusičnan přes dusitan až na amoniak. Redukčním činidlem je NADH či NADPH pocházející z cytosolu. Zdroj redukčních ekvivalentů představuje ferredoxin, a proto redukce dusičnanů v rostlinách probíhá pouze na světle.

Příkladem dalšího možného enzymového zdroje NO je nitrit:NO reduktasa (EC 1.7.2.1). Katalyzuje redukcí dusitanu na NO, jehož lokalizace byla popsána v plazmatické membráně kořenových buněk tabáku společně s kořenově-specifickou formou nitrátreduktasy (Neill *et al.*, 2008).

Disimilace nitrátu

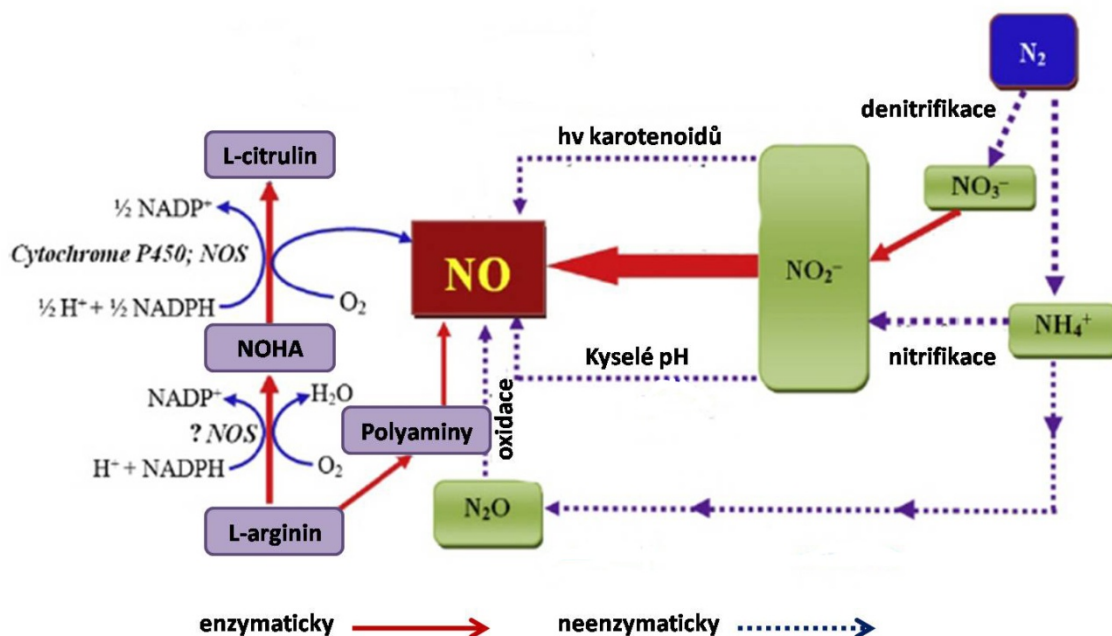


Asimilace nitrátu



Obr. 2 Disimilační a asimilační funkce nitrátreduktasy. V respiračním řetězci dochází k reoxidaci NADH. Dusičnan, pevně vázaný na membránu přes cytochrom b, je konečným akceptorem elektronu. K asimilaci nitrátu dochází v chloroplastech. Dusičnan je redukován přes dusitan na amoniak. Redukčním činidlem je cytosolární NADH nebo NADPH. Ferredoxin je zdrojem redukčních ekvivalentů, a proto tento proces probíhá pouze na světle (upraveno podle Fancy *et al.*, 2016).

K biosyntéze NO v rostlinných buňkách mohou za určitých podmínek významně přispívat také neenzymové procesy. Například nízké pH v apoplastu podporuje neenzymovou redukci dusitanu, kdy dochází k jeho přeměně na NO a dusičnan. Při fyziologických hodnotách pH dochází k chemické redukci dusitanu kyselinou askorbovou na NO a kyselinu dehydroaskorbovou (Stohr a Ullrich, 2002). Další neenzymová biosyntéza NO katalyzovaná karotenoidy probíhající v membránách chloroplastů je světlem zprostředkovaná přeměna NO₂ na NO (Qiao a Fan, 2008).

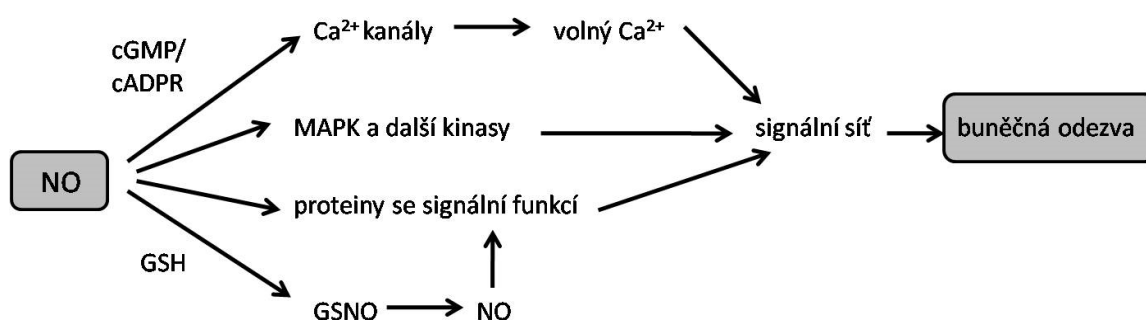


Obr. 3 Schématické znázornění vzniku NO enzymatickou i neenzymatickou cestou. NO je produkován aktivitou enzymu NO synthasy (NOS). NOS katalyzuje oxidaci N ω -atomu guanidinové skupiny L-argininu za vzniku NO a L-citrulinu. Meziproduktem je N ω -hydroxy-l-arginin (NOHA). Produkce NO byla popsána i v souvislosti s polyaminy, jejichž jedním z prekurzorů je L-arginin. NO může vznikat také neenzymovou reakcí NO₂⁻, kterou představuje například redukce za kyselého pH a světlem poháněná redukce v přítomnosti karotenoidů. NO vzniká jako vedlejší produkt při denitrifikaci, nitrátové asimilaci nebo respiraci (upraveno podle Gill *et al.*, 2013).

2.1.2 Signální dráhy NO

Zapojení a funkce NO v rostlinných signálních mechanismech jsou podobně jako u živočichů významně podmíněny jeho vysokou reaktivitou, která je závislá i na lokalizaci potenciálního reakčního partnera. Mezi nejčastější reakční partnery patří např. reaktivní formy kyslíku (ROS), přechodné kovy v hemových strukturách, thioly a lipidové radikály (Tuteja *et al.*, 2004). Signální dráhy NO v rostlinách, stejně jako u živočichů, se rozdělují na dráhy cGMP-dependentní a cGMP-independentní. Poznatky o signálních funkcích NO v rostlinách jsou oproti živočichům stále relativně omezené, i přesto, že byly popsány některé významné části signálních drah NO zahrnující sekundární posly, jako jsou cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), cyklická adenosindifosfátribosa (cADPR) a změny hladin cytosolického vápníku. Mezi signální dráhy NO dále patří fosforylace MAP kinas, nitrosylace cysteinů a nitrace tyrosinů (Romero-Puertas *et al.*, 2004, Courtois *et al.*, 2008).

cGMP-dependentní dráha spočívá ve vazbě NO na hemovou prosthetickou skupinu guanylát cyklasy, což vede ke zvýšení produkce cGMP. cGMP-independentní dráha aktivuje proteinkinasy aktivované mitogenem (MAPK) (Klessig *et al.*, 2000). Aktivace MAPK indukuje signální dráhy kyseliny salicylové (SA), kyseliny jasmonové (JA) a ethylenu. Kromě toho, všechny tyto signály zvyšují antioxidantní aktivitu a následně zvyšují odolnost vůči oxidativnímu stresu (Grant *et al.*, 2003). Aktivace MAPK má za následek reverzibilní fosforylaci enzymů regulující jejich aktivitu.

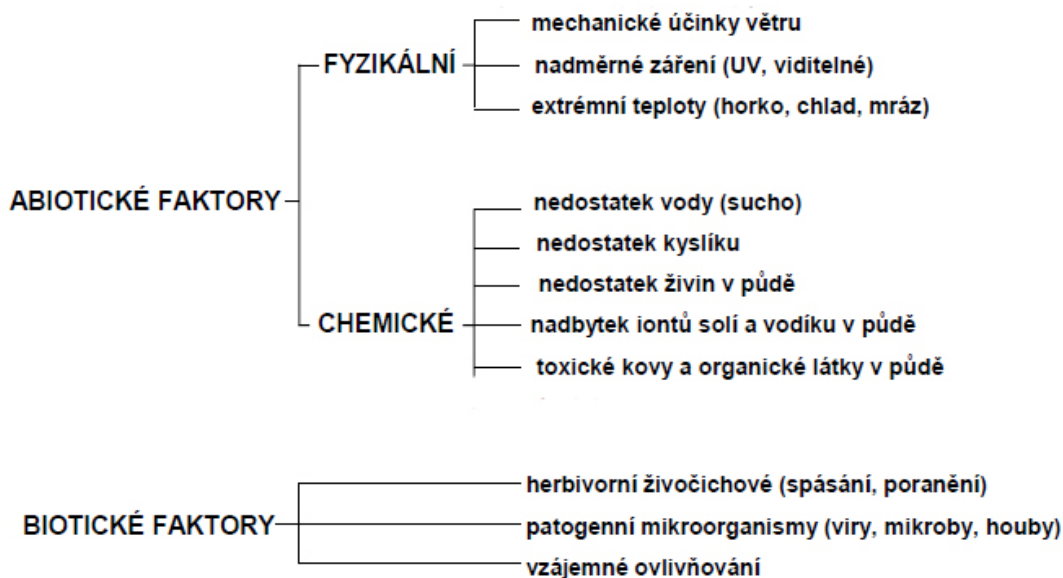


Obr. 4 Schématické znázornění signálních drah NO v rostlinných buňkách. Primární cíle NO zahrnují mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK) a Ca^{2+} kanály regulované prostřednictvím změn hladin cGMP a cADPR. NO moduluje aktivitu proteinů nitrosylací thiolových skupin. Stabilní metabolit *S*-nitrosoglutathion (GSNO) může sloužit jako přenašeč signálu NO pro jeho uvolnění a interakce ve vzdálených cílech (upraveno podle Piterková *et al.*, 2008).

2.1.3 Funkce NO při působení abiotického stresu

Rostliny v průběhu svého života musí často reagovat na řadu různých abiotických a biotických stresových podmínek, jako jsou například extrémní teploty, sucho, těžké kovy, salinita či napadení patogenem (Corpas *et al.*, 2011). Přehled jednotlivých abiotických a biotických stresových faktorů je znázorněn na Obr. 5.

NO má u rostlin dvojí působení: za fyziologických podmínek reguluje řadu komplexních biologických procesů, např. podporuje normální růst a vývoj rostlin (Beligni a Lamattina, 2001; Stöhr a Stremlau, 2005; Tun *et al.*, 2006), dormanci a klíčení semen (Neill *et al.*, 2002), pohyb svěracích buněk průduchů (Desikan *et al.*, 2002) či lignifikaci buněčné stěny (Pacoda *et al.*, 2004). Naopak za patologických podmínek může působit cytotoxicky (Leshem a Haramaty, 1996). Bylo prokázáno, že vyšší hladiny NO mohou vést od poškození fotosyntetického elektronového transportu, přes inhibici růstu kořenů, až k buněčné smrti (Leshem *et al.* 1998, Pedroso *et al.*, 2000).



Obr. 5: Celkový přehled jednotlivých abiotických a biotických stresových faktorů (upraveno podle Procházka *et al.*, 1998).

Při abiotickém stresu jsou generovány volné radikály a dochází zejména ke zvyšování hladin ROS zejména v chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech (Mano, 2002), což vede k oxidačnímu stresu v buňkách (Mittler, 2002) a zároveň dochází k vyvolání produkce NO. V posledních letech byla věnována velká pozornost zapojení NO při působení salinitního stresu. Primární účinky salinity se skládají z hyperosmotického stresu a iontové nerovnováhy (Hasegawa *et al.*, 2000). Zvýšená produkce endogenního NO vyvolaná salinitním stresem byla pozorována například v buněčné suspenzi tabáku (Gould *et al.*, 2003) či u mutantu *Arabidopsis Atnoal* s poruchou NOS aktivity, kdy byla zjištěna větší citlivost vůči chloridu sodnému než u divokého typu (Zhao *et al.*, 2007). Nedávná studie Manai *et al.*, 2014, zabývající se studiem role NO v kořenech rostlin rajčete po aplikaci salinitního stresu, objasňuje propojení mezi redoxní homeostázou a metabolismem ROS a RNS. Salinita vedla ke snížení produkce redoxních molekul (NADPH, GSH), což bylo vyvoláno v důsledku změn aktivity jejich metabolických enzymů, kterými jsou NADP-dehydrogenasa (EC 1.6.99.1), S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR, EC 1.1.1.284), glutathionreduktasa (EC 1.8.1.7) a guajakolperoxidasa (EC 1.11.1.7). Hladiny S-nitrosoglutathionu (GSNO), vzniklého reakcí volného radikálu NO s redukováným glutathionem (GSH), jsou v kořeni rajčete za fyziologických podmínek stejné jako hladiny oxidovaného glutathionu (GSSG). Při působení salinitního stresu dochází ke snížení obsahu GSNO a současně se zvyšuje hladina NO, což bylo prokázáno již dřívějšími studii v kořenech *Arabidopsis* (Corpas *et al.*, 2009a; Leterrier *et al.*, 2012a,b), slunečnice (David *et al.*, 2010) a listech olivovníku (Valderrama *et al.*, 2007), citrusovníku (Tanou *et al.*, 2009, 2012) či kukuřice (Bai *et al.*, 2011).

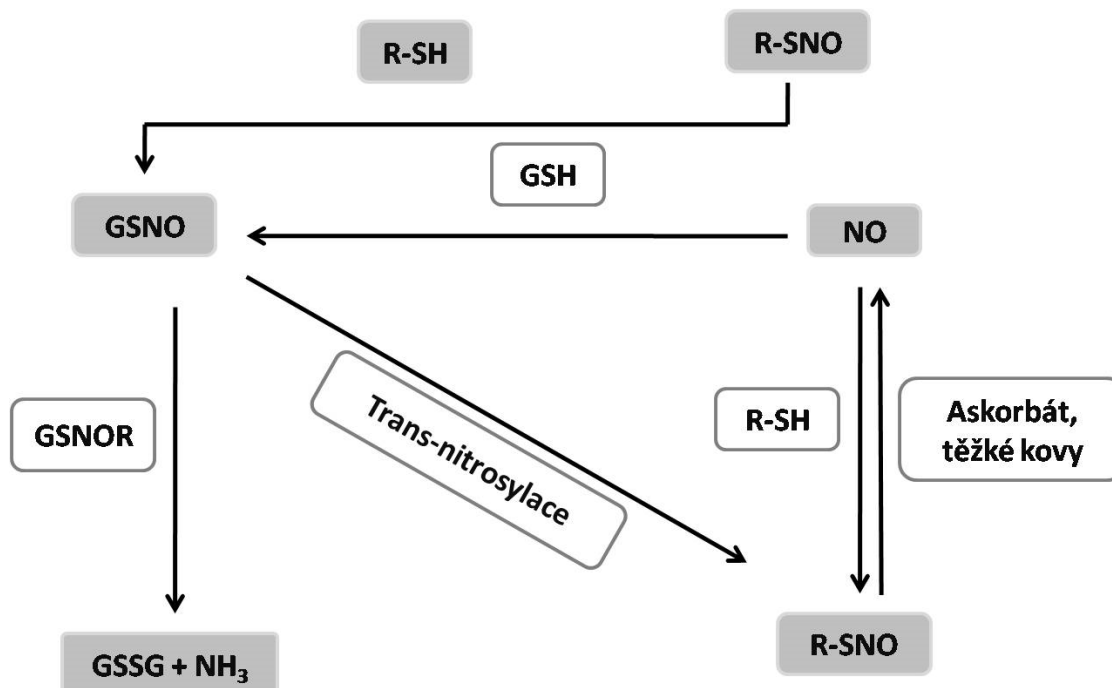
Kadmium (Cd) je silně fytotoxický těžký kov, který se do půdy většinou dostává ze zemědělství nebo průmyslu. Mezi hlavní příznaky vyvolané toxicitou Cd řadíme zakrnělý růst, chlorózu, inhibici fotosyntézy, inaktivaci enzymů fixujících CO₂, potlačení klíčení pylu a narušení metabolismu síry (Gill a Tuteja, 2011). Už i při koncentraci 5-10 μg·g⁻¹ (stanoveno v sušině) se stává toxický pro většinu rostlin a při vyšších koncentracích způsobuje smrt (White a Brown, 2010). Cd rovněž silně indukuje tvorbu ROS (Lim *et al.*, 2006) a NO (Kopyra *et al.* 2006; Arasimowicz-Jelonek *et al.* 2012). Řada studií podporuje hypotézu, že těžké kovy vedou k indukci tvorby NO z dosud neidentifikovaného zdroje, což umožňuje antioxidační působení NO: a to buď jeho přímou

reakcí s ROS či přes aktivaci antioxidantních enzymů. Například po exogenní aplikaci nitroprussidu sodného (SNP), donoru NO, došlo u rýže ke snížení fytotoxicity měďnatých iontů (Yu *et al.* 2005). Rovněž u pšenice bylo po aplikaci NO a měďnatých iontů pozorováno zvýšení klíčení, nárůst aktivity významných antioxidantních enzymů - superoxidodismutasy (EC 1.15.1.1) a katalasy (EC 1.11.1.6) (Hu *et al.* 2007; Cui *et al.* 2009). V buněčné kultuře sóji po aplikaci Cu^{2+} i Cd^{2+} byly rovněž pozorovány schopnosti NO fungovat jako lapač ROS i aktivovat antioxidantní enzymy (Singh *et al.* 2008). Z dalších studií lze zmínit, že aplikace exogenního NO zmírnila toxicitu arsenu u rýže a fazole mungo, a to díky snížení hladiny malondialdehydu a akumulovaných ROS díky indukci antioxidantních enzymů (Singh *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2010; Ismail 2012).

2.2 S-nitrosylace

S-nitrosylace patří mezi jeden z nejdůležitějších molekulárních mechanismů, kterým NO reguluje funkce proteinů. S-nitrosylované proteiny vznikají po kovalentním navázání nitroso skupiny (-NO) na thiolovou skupinu (-SH) postranního řetězce cysteinu (Gaston *et al.*, 2003). Podobně jako fosforylace proteinů, S-nitrosylace je reverzibilní a místně specifická, avšak probíhá bez enzymové katalýzy.

S-nitrosoglutathion(GSNO) je nejrozšířenějším zástupcem nízkomolekulárních S-nitrosothiolů v rostlinných buňkách. Podílí se zejména na transportu NO a na trans-nitrosacích reakcích, kdy je -NO skupina přenesena na -SH skupinu jiné molekuly (Martínez-Ruiz a Lamas, 2004). Regulační role GSNO v procesu S-nitrosylace je shrnuta na Obr. 6.



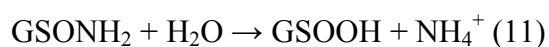
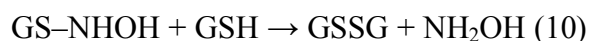
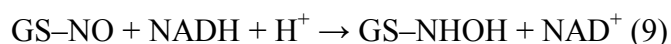
Obr. 6 Regulace S-nitrosylace. S-nitrosylace spočívá v kovalentním navázání nitroso (-NO) skupiny na thiolovou (-SH) skupinu cysteinu za tvorby S-nitrosothiolu (SNO). SNO vazba je reverzibilní a značně labilní, a to zejména vlivem askorbátu, těžkých kovů či glutathionu (resp. redukčních činidel). S-nitrosoglutathion (GSNO) je stabilní zásobárna NO *in vivo*. Významně se podílí na procesu trans-nitrosylace (přenosu NO skupiny mezi thioly). Klíčovým enzymem přeměny GSNO je S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR). Katalýzou NADH-dependentní redukce GSNO vzniká oxidovaný glutathion (GSSG) a amoniak (NH₃) (upraveno podle Fancy *et al.*, 2016).

2.2.1 Stabilita S-nitrosothiolů

Díky tomu, že je vazba S-NO silně polarizovaná, a tudíž nestabilní, dochází ke snadnému uvolňování NO (Shahani *et al.*, 2011). Předpokládá se, že S-nitrosothioly (RSNO) jsou nestabilní ve vysoce redukčním prostředí cytosolu obsahující velké množství redukčních molekul (Sen, 1998). Mimo jiné, hladina RSNO *in vivo* přímo závisí na koncentraci glutathionu (GSH). Na základě těchto poznatků malé molekuly RSNO mají poločas rozpadu v biologických roztocích v řádu sekund až minut (Mayer *et al.*, 1995, Singh *et al.*, 1996). Avšak byla identifikována malá skupina nezvykle stabilních RSNO, tzv. S-nitrosoproteinů. Příklady těchto proteinů jsou: kreatinkinasa, α -tubulin, β -tubulin, CRMP-2 nebo GAPDH. Pravděpodobně dochází ke změně konformace proteinu, která umožní ochranu NO skupiny před přístupem redukčních činidel (Paige *et al.*, 2008).

Stabilitu RSNO ovlivňuje řada faktorů, jako je teplota, světlo, kationty přechodných kovů, pH a přítomnost kyslíku (Stamler a Toone, 2002). Monomolekulární štěpení vazby S-NO může probíhat homolyticky nebo heterolyticky. Za fyziologicky významnější je považováno štěpení homolytické, jehož produkty jsou disulfid a NO. Homolytickým rozkladem RSNO na ultrafialovém světle dochází ke vzniku NO a RS radikálů (Singh *et al.*, 1996). Také řada různých kationtů přechodných kovů se podílí na rozpadu vazby. Přidáním chelatačních činidel, kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) nebo neocuproinu lze rozkladu RSNO zabránit (Singh *et al.*, 1996). K degradaci nízkomolekulárních a proteinových S-nitrosothiolů účinně a rychle napomáhají redukční látky přítomné v cytosolu. K ochraně RSNO v cytosolu přispívají váčky, buněčné membrány nebo hydrofóbní části molekul (Rafikova *et al.*, 2002).

U rostlin byly popsány dva klíčové enzymy katalyzující odbourání S-nitrosothiolů: S-nitrosogluthathionreduktasa (GSNOR, EC 1.1.1.284) a thioredoxinreduktasa (TR, EC 1.8.1.9). GSNOR patří do rodiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III. Dříve byla označována jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH, EC 1.2.1.46) díky schopnosti katalyzovat NAD⁺-dependentní oxidaci formaldehydu (Koivusalo *et al.*, 1989). GSNOR hraje důležitou roli při regulaci intracelulární hladiny GSNO a S-nitrosothiolů, tudíž má důležité zastoupení v celkovém metabolismu NO a RNS. Jedná se o klíčový enzym katabolismu GSNO, který však zároveň nepřímo ovlivňuje hladinu ostatních RSNO. V prvním kroku reakce (9) je GSNO převeden na nestabilní intermediát N-hydroxysulfidamid (GS-NHOH). GS-NHOH dále může reagovat (10) s glutathionem (GSH) za vzniku glutathiondisulfidu (GSSG) a hydroxylaminu (NH₂OH). Mimo jiné může docházet ke spontánnímu přeskupení GS-NHOH na glutathionsulfonamid (GSONH₂), který je v kyselém prostředí hydrolyzován na glutathionsulfonovou kyselinu (GSOOH) a amoniak (11) (Liu *et al.*, 2001).



V několika publikacích byla potvrzena významná úloha GSNOR v obranné odpovědi při působení těžkých kovů. Jako příklad můžeme uvést studii Barroso *et al.*, 2006, ve kterém popisují 30% snížení aktivity a exprese GSNOR u listů *Pisum sativum* poté, co byly ošetřeny 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chloridem kadmnatým. Podobný trend byl pozorován u semenáčků *A. thaliana* rostoucích MS médiu v přítomnosti 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ arseničnanu (Leterrier *et al.*, 2012).

2.2.2 Regulace významných rostlinných proteinů při působení abiotického stresu

V posledních letech byla provedena řada studií zabývajících se problematikou zapojení S-nitrosylovaných proteinů v obranné reakci rostlin při působení stresu. Detailněji bylo analyzováno několik specifických S-nitrosylovaných proteinů jako jsou například metakaspasy, peroxiredoxiny, methioninadenosyltransferasy (MAT) a glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa.

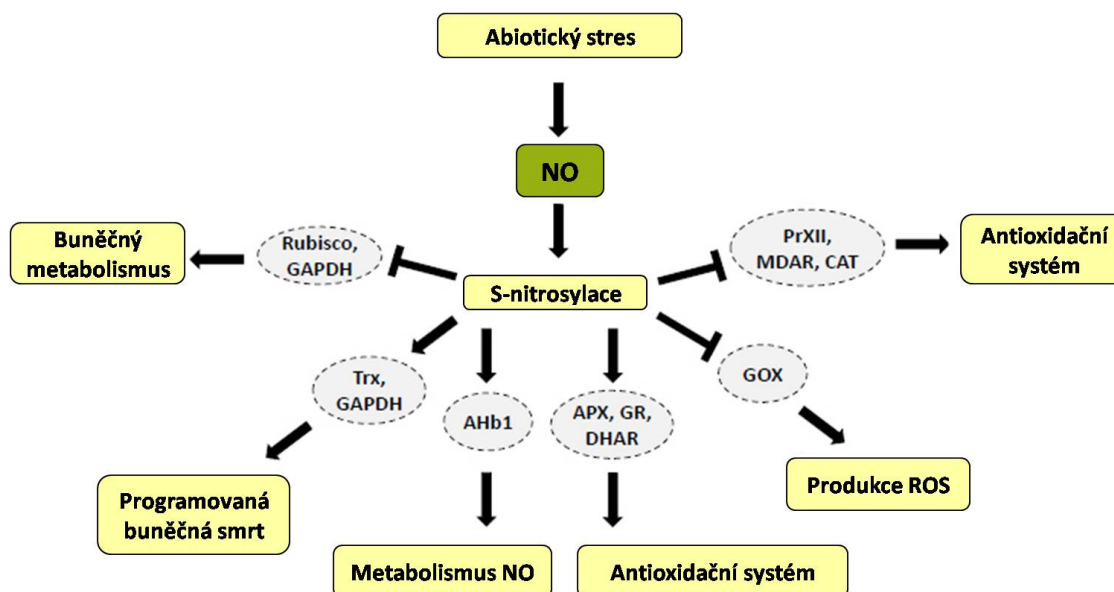
Peroxiredoxiny (EC 1.11.1.15) zastupují skupinu antioxidantních enzymů schopné redukovat širokou škálu substrátů odvozených od reaktivních forem kyslíku (peroxid vodíku, alkylhydroperoxid a peroxydusitan). U rostlin a sinic byly popsány 4 třídy peroxiredoxinů, a to 2-CysPrx, 1-CysPrx, PrxQ a typy PrxII (Dietz, 2011). Aktivita peroxiredoxinu II E (PrxII E), který se vyskytuje ve stromatu chloroplastů, je inhibována S-nitrosylací Cys121 v aktivním místě, která vede ke snížené schopnosti rostlinných buněk odbourávat peroxydusitan (Romero-Puertas *et al.*, 2007). Rovněž u dalších forem cytosolární PrxII B a mitochondriální PrxII F byla popsána S-nitrosylace (Lindermayr *et al.*, 2005).

Metakaspasy hrají klíčovou roli v apoptotické signální kaskádě vedoucí k zahájení apoptosy - programované buněčné smrti. Jedná se o proteasy s cysteinem v aktivním místě, které štěpí peptidovou vazbu specificky za aspartátem (Martínez-Ruiz a Lamas, 2007). Kaspasy jsou exprimovány v neaktivní formě jako tzv. prokaspasy a pro vznik aktivních tetrametrických enzymů musí být proteolyticky štěpeny. Inhibice autoproteolytické aktivity prometakaspasy 9 byla popsána díky S-nitrosylaci Cys147 v buněčné kultuře *Arabidopsis* (Belenghi *et al.*, 2007). Intracelulární hladina NO ovlivňuje signální dráhy

vedoucí k zahájení programované buněčné smrti, a to buď anti-apoptoticky nebo pro-apoptoticky v závislosti na typu buňky, koncentraci NO a dalších faktorech. NO může působit jako endogenní inhibitor apoptosy dvěma různými mechanismy, které vedou ke konečnému potlačení aktivity kaspasy-3 a dochází k zastavení apoptosy (Kim *et al.*, 1997). Naopak, za určitých podmínek mohou NO, peroxydusitan a S-nitrosothioly vykazovat pro-apoptotický účinek. Například výrazně zvýšená hladina NO vedek otevření pórů vnitřní membrány mitochondrií, dochází k uvolnění cytochromu *c* do cytosolu a k aktivaci apoptotické signální dráhy (Brookes *et al.*, 2002; Schonhoff *et al.*, 2003).

Glyceraldehydfosfát-3-dehydrogenasa (GAPDH, EC 1.2.1.12) je enzym patřící do skupiny oxidoreduktas. Jedná se o jeden z klíčových enzymů glykolýzy, kde katalyzuje v přítomnosti NAD^+ a anorganického fosfátu přeměnu glyceraldehyd-3-fosfátu na 1,3-bisfosfoglycerát. Po mnoho desetiletí byl GAPDH považován pouze jako glykolytický enzym, který působí hlavně v cytoplasmě. Avšak celá řada studií naznačuje, že GAPDH je multifunkčním proteinem, který hraje důležitou roli při genové transkripci, replikaci a opravách DNA i exportu jaderné RNA (Zheng *et al.*, 2003; Singh a Green, 1993). Další významnou funkcí GAPDH je úloha v průběhu buněčné smrti (Martínez-Ruiz a Lamas, 2007). Isoformy tohoto enzymu jsou v rostlinách lokalizovány v jádře, cytosolu a plastidech. Bylo zjištěno, že aktivita cytosolární GAPDH je inhibována S-nitrosylací Cys149 v katalytickém místě (Lindermayr *et al.*, 2005; Holtgreffe *et al.*, 2008).

Souhrnný přehled regulační role procesu S-nitrosylace při působení abiotického stresu je znázorněn na Obr. 7.



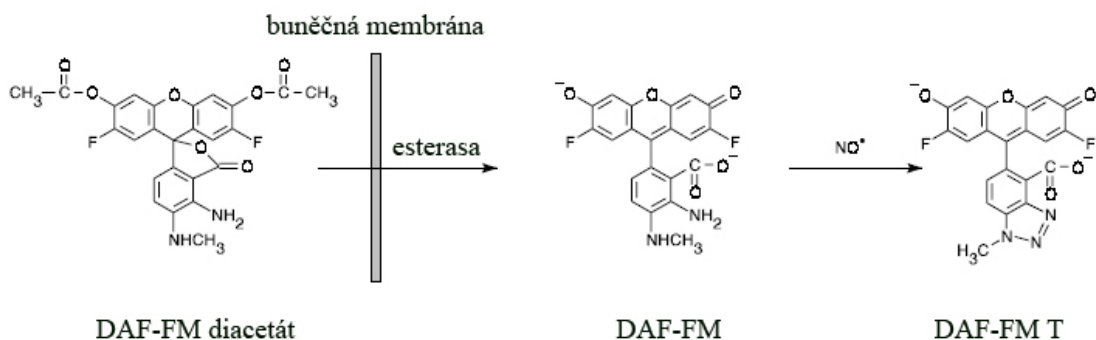
Obr. 7 S-nitrosylace reguluje rozdílně pochody v signálních dráhách při působení abiotického stresu. Během abiotického stresu dochází k modifikaci řady proteinů, například antioxidačních enzymů (PrxII, peroxiredoxin II; MDAR, monodehydroaskorbátreduktasa; CAT, katalasa; APX, askorbátperoxidasa; GR, glutathionreduktasa; DHAR, dehydroaskorbátreduktasa), proteinů buněčného metabolismu (Rubisco, ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa; GAPDH, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa), metabolismu ROS (GOX, glykolát oxidasa) či RNS (AHb1, hemoglobin 1) a také programované buněčné smrti (Trx, thioredoxin; GAPDH, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa) (upraveno podle Fancy *et al.*, 2016).

2.3 Experimentální metody studia produkce NO a S-nitrosylace

2.3.1 Fluorescenční sondy DAF-FM a DAF-FM diacetát

Vzhledem k tomu, že produkce NO v rostlinách nepřesahuje mikromolární koncentrace, je nezbytné používat takovou fluorescenční sondu, která je dostatečně citlivá, specifická a selektivní pro detekci NO. Mezi první sondy používané k detekci NO patřily naftalen-2,3-diamin (DAN) (Wada *et al.*, 2002) nebo 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) (Jourdain, 2002) reagující s NO za přítomnosti kyslíku a za vzniku triazolů. Bohužel tyto sondy nejsou dostatečně selektivní pro detekci NO, protože reagují i s dusitany. Sondy 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein (DAF-FM) a 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetát (DAF-FM DA) tyto požadavky splňují a jsou velmi často používány pro stanovení nízkých koncentrací NO.

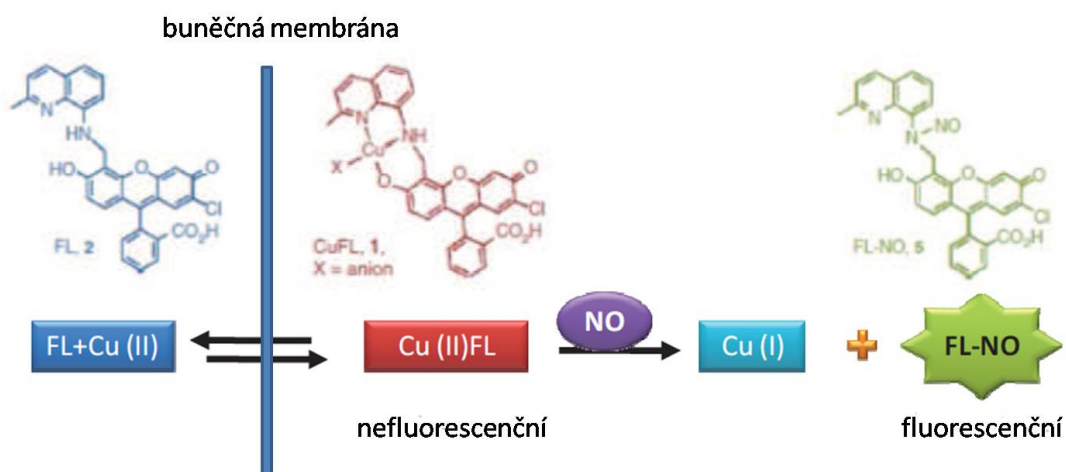
DAF-FMDA je schopný prostupovat do buňky pasivní difuzí přes buněčné membrány. Uvnitř buněk reaguje s intracelulárními esterasami za vzniku DAF-FM, který má velmi malou schopnost fluorescence. Fluorescenční schopnosti se výrazně zlepši po reakci s oxidačními produkty NO. Výsledkem je vznik fluorescenčního triazofluoresceinu (DAF-FM T) (Kojima *et al.*, 1998). Celé schéma reakcí je znázorněno na Obr. 8.



Obr. 8 Princip detekce NO pomocí fluorescenční sondy 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetát (DAF-FM DA). DAF-FM DA je schopný prostupovat buněčnou membránou, kde poté reaguje s intracelulárními esterasami. Vzniklý produkt nefluoreskuje, ale jeho reakcí s oxidačními produkty NO dochází k přeměně na fluorescenční benzotriazolový derivát (upraveno podle Kojima *et al.*, 1998).

2.3.2 Fluorescenční sonda CuFL

Fluorescenční sonda CuFL (2-{2-chloro-6-hydroxy-5-[2-methylchinolin-8-ylamino)-methyl]-3-oxo-3H-xanthen-9-yl}-benzoová kyselina v komplexu s měďnatými ionty) může být dalším příkladem velmi citlivé sondy využívané pro specifickou detekci NO u rostlin (Rasul *et al.*, 2012). CuFL se skládá z fluorescenčního ligandu (FL) a komplexu Cu (II). Přítomnost molekuly NO vyvolává redukci komplexu Cu (II) na Cu (I) a vznik fluorescenční sloučeniny FL-NO. CuFL umožňuje přímou detekci NO až v nanomolárních koncentracích (Lim *et al.*, 2006). Nevýhodou použití této sondy zůstává její nízká stabilita a možnost použití pouze po dobu 1 hodiny. Celé schéma reakcí je znázorněno na Obr. 9.

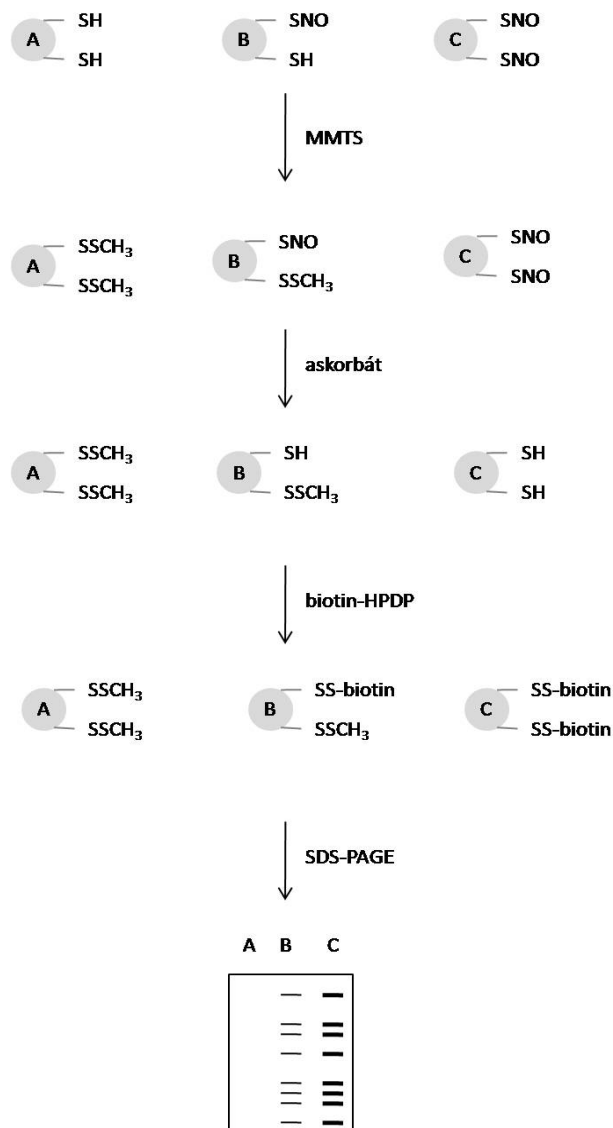


Obr. 9 Princip detekce NO pomocí fluorescenční sondy CuFL. FL reaguje s Cu za vzniku nefluorescenční sloučeniny CuFL, která je schopná prostupovat buněčnou membránou. V buňce je CuFL schopné reagovat s NO za vzniku Cu (I) a fluorescenčního produktu FL-NO (upraveno podle Lim *et al.*, 2006).

2.3.3 Biotin-switch

Metoda biotin-switch (BST) byla poprvé popsána v publikaci v roce 2001 a její princip je založen na reverzibilním značení nitrosylovaných cysteinů značkou nesoucí navázanou molekulu biotinu (Jaffrey a Snyder, 2001). Jak je znázorněno na Obr. 10, BST se skládá ze tří kroků. První krok reakce nazývaný „blokovací“ je iniciován přidavkem dodecylsulfátu sodného (SDS) pro uvolnění skrytých –SH skupin cysteinových residuí a inkubací s methylačním činidlem S-methylmethanthiosulfonátem (MMTS) specifickým pro blokaci volných thiolových skupin proteinu. Následně je vzorek zahřát na teplotu 50°C pro podpoření denaturace proteinů. V druhém kroku se využívá askorbát pro redukci –NO skupiny na volné thioly. Poslední krok BST zahrnuje okamžité značení vzniklých thiolů biotinem-HPDP. Proteiny mohou být separovány pomocí SDS-PAGE za nepřítomnosti redukujících činidel a poté detekovány imunoblotingem za použití protilátek specifických proti daným proteinům. Další možností je biotinylované proteiny purifikovat afinitní chromatografií za použití avidin-agarosové matrice (Forrester *et al.*, 2009).

Díky modifikacím BST metody došlo k vyvinutí několika dalších metod. Jako příklad může být uvedena His-tag switch metoda, kde dochází k náhradě a k ireverzibilnímu navázání His-tag značky namísto biotinu-HPDP. Značené proteiny je možné afinitně purifikovat na matici s imobilizovanými nikelnatými nebo kobaltnatými ionty a po štěpení trypsinem analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie (Camerini *et al.*, 2007). Další modifikací BST je využití selektivního fluorescenčního značení proteinů pomocí cyaninových fluorescenčních barviv Cy3 a Cy5 namísto biotinu-HPDP. Díky tomu je umožněná přímá detekce značených S-nitrosylovaných proteinů, a proto není nutné provádět techniku Western blotu (Kettenhofen *et al.*, 2008).



Obr. 10 Schéma biotin-switch metody (BST). Jsou znázorněny tři proteiny (A, B, C) s různým stupněm S-nitrosylace. V prvním kroku jsou volné thiohy blokovány pomocí MMTS. Pomocí askorbátu jsou redukovány S-NO skupiny za vzniku volných -SH skupin. V posledním kroku jsou volné -SH skupiny značeny biotinem-HPDP. Následuje SDS-PAGE a imunochemická detekce proteinů na membráně s využitím anti-biotin protilátky (upraveno podle Forrester *et al.*, 2009).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

AcrosOrganics (USA): glutathion; Triton X-100.

AppliChem (Německo): dodecylsírán sodný; hovězí sérový albumin frakce V.

Bio-Rad (USA): blotovací pufr Trans-Blot Turbo, marker molekulové hmotnosti Precision Plus DualXtraStandards.

Bochemie (Česká republika): SAVO.

Lachema (Česká republika): aceton; dihydrogenfosforečnan amonný; dithiotreitol; kyselina chlorovodíková; síran měďnatý pentahydrát.

Lach-Ner (Česká republika): ethanol; chlorid sodný; methanol.

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

Neolab (Německo): kyselina boritá; síran zinečnatý heptahydrát; síran zinečnatý heptahydrát.

Penta (Česká Republika): dusičnan draselný; chlorid draselný.

Roche (Švýcarsko): inhibitor proteas Complete ULTRA tablety.

Sigma-Aldrich (Německo): akrylamid; agar; askorbát; bisakrylamid; bromfenolová modř; 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetát; diethylenetriaminepentaoctová kyselina; dimethylsulfoxid; dodecylsulfát sodný; ethylendiamidtetraoctová kyselina; glycerin; glycerol; glycin; hydrát síranu manganatého; chlorid kademnatý; Hydrát kyseliny 2-(N-Morfolino) ethansulfonové; Murashige a Skoog médium s vitamíny; 2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonová kyselina; *N,N*-dimethylformamidfenylmethansulfonyl fluorid; *N,N'*-tetramethyldiamin; nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem; octová kyselina; persírán amonný; Ponceau S; primární monoklonální myší anti-biotin protilátka konjugovaná s alkalickou fosfátasou; sacharosa; S-methylmethanthiosulfát; sušené odtučněné mléko; Tween 20.

Strem Chemicals (USA): 2-{2-chloro-6-hydroxy-5-[2-methylchinolin-8-ylamino)-methyl]-3-oxo-3H-xanthen-9-yl}-benzoová kyselina v komplexu s měďnatými ionty (CuFL).

Thermo Scientific (USA): N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamid (biotin-HPDP).

3.1.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); centrifuga CL31R (Thermo Jouan, Francie); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); dokumentační zařízení Gel-Doc (Bio-Rad, USA); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA); nitroceluloseová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA); světelný a fluorescenční mikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko); třepačka 3D (BioSan, Litva); vortex (Stuart, UK); zařízení pro rychlý transfer proteinů na membránu Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA); zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (Bio-Rad, USA).

3.1.3 Rostlinný materiál

Pro studium vlivu abiotických stresových faktorů na produkci NO a S-nitrosylovaných proteinů byly zvoleny 3 genotypy rajčete *Solanum* spp.: *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites* a *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Genotypy *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. habrochaites* mají odlišnou rezistenci vůči významnému patogenu padlí rajčatového (*Oidium neolycopersici*) - *S. lycopersicum* cv. Amateur je citlivý vůči infekci a naopak, *S. habrochaites* je rezistentní genotyp (Mlíčková *et al.*, 2004; Piterková *et al.*, 2011). Jako třetí genotyp byl vybrán *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom vzniklý křížením kultivarů rajčat Florida Basket a Ohio 4013-3. Tento genotyp a jeho mutantní formy slouží jako modelové systémy pro studie zabývající se regulací vývoje červených bobulovitých plodů (Meissner *et al.*, 1997; Eyal a Levy, 2002). Zároveň je dobrou hostitelskou rostlinou pro řadu

významných houbových, bakteriálních i virových patogenů rajčat (například *Athelia rolfsii*, *Botryotinia fuckeliana*, *Oidium* sp., *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, virus mozaiky rajčete a virová aspermie rajčete) (Takahashi *et al.*, 2005).

3.1.3.1 Sterilizace, klíčení a výsev semen na MS médium

Semena byla nejprve sterilizována za stálého třepání po dobu 30 s v 70% roztoku ethanolu a dále 25 minut v 3% roztoku SAVA. Následně byla 3x promyta sterilní vodou. Takto sterilizovaná semena byla přenesena na 3 vrstvy filtračního papíru ovlhčeného sterilní vodou v Petriho misce a poté ponechány ve tmě po dobu 3 dnů při teplotě 24°C. 20 naklíčených semen bylo vyseto v jedné řadě do čtvercových Petriho misek na pevné MS médium (40 ml/miska) obsahující testované sloučeniny o finální koncentraci uvedené v Tab. 1. Petriho misky byly umístěny na 9 dní ve fytotronu při 25 °C. Experiment byl prováděn vždy ve trojím opakování pro jednotlivé genotypy *Solanum* spp.

Tab. 1 Finální koncentrace testovaných sloučenin v MS médiu.

Typy sloučeniny	Finální koncentrace v MS médiu
NaCl	0 mmol·l ⁻¹
	50 mmol·l ⁻¹
	100 mmol·l ⁻¹
	150 mmol·l ⁻¹
CdCl ₂	0 μmol·l ⁻¹
	50 μmol·l ⁻¹
	100 μmol·l ⁻¹
	150 μmol·l ⁻¹
	200 μmol·l ⁻¹

Vliv testovaných látek a jejich rozdílných koncentrací na růst semenáčků byl 9 dnů po výsevu semen na MS médium dokumentován digitálním fotoaparátem Sony A330. Kořenové špičky semenáčků byly použity pro histochemickou detekci produkce NO.

3.1.3.1.1 Příprava MS média

K naváženým látkám podle Tab. 2 bylo přidáno 1600 ml destilované vody a upraveno pH na hodnotu 6,1. Poté byl objem doplněn na 2 l. Hodnota pH média byla po autoklávování 5,8.

Tab. 2 Příprava pevného média pro výsev semen.

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

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

MES hydrát: Hydrát kyseliny 2-(N-Morfolino) ethansulfonové.

3.1.3.2 Výsev semen do perlitu

Semena byla vyseta do perlitu zalitého Hoaglandovým roztokem. Po 3 dnech bylo prováděno pravidelné zalévání semen Hoaglandovým roztokem obsahující finální koncentrace NaCl a CdCl₂ uvedené v Tab. 1 po dobu 9 dní. Následně byl rostlinný materiál vyňat z perlitu, zvážen a zamražen pro realizaci dalších experimentů.

3.1.3.2.1 Příprava Hoaglandova roztoku

Bylo použito 11 láhví pro přípravu zásobních roztoků podle Tab. 3. Příprava FeEDTA byla provedena následujícím způsobem. V 800 ml H₂O bylo rozpuštěno 7,44 g Na₂EDTA a 5,56 g FeSO₄·7 H₂O. Roztok byl zahřát na teplotu 60°C po dobu 1 h, po ochlazení na laboratorní teplotu byl doplněn na objem 1 l.

Tab. 3 Složení Hoaglandova roztoku

Složení	Molekulová hmotnost	Koncentrace zásobních roztoků [mmol.l ⁻¹]	Objem [ml/l]	Výsledná koncentrace [μmol.l ⁻¹]
KNO ₃	101,1	1000	1,5	1500
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236,16	1000	1	1000
NH ₄ H ₂ PO ₄	115,08	1000	0,5	500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,49	1000	0,25	250
KCl	74,55	50	1	50
MnSO ₄ ·H ₂ O	169,01	2	1	2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287,55	2	1	2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249,75	0,5	1	0,5
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	161,97	0,5	1	0,5
H ₃ BO ₃	61,84	25	0,5	12,5
FeEDTA	381,08	25	1	20

3.1.3.3 Vyhodnocení délky kořenů

Vyhodnocení délky kořenů bylo provedeno pomocí ImageJ 1.33 software (National Institute of Health, USA). U fotografií 9 denních semenáčků pořízené digitálním fotoaparátem Sony A330 byla označena délka misky pomocí nástroje Straight. V liště nástrojů byla vybrána funkce Analyze - Set Scale, kde byla zadána známá velikost misky. Následně nástrojem Freehand Line byly měřeny jednotlivé délky kořenů či nadzemní části a vyhodnocovány pomocí funkce Analyze – Measure.

3.2 Experimentální metody

3.2.1 Histochemie

Detekce NO byla prováděna pomocí dvou fluorescenčních sond DAF-FM DA a CuFL a vyhodnocována za využití světelného a fluorescenčního mikroskopu Olympus BX50. 5 mm dlouhé segmenty kořenových špiček byly inkubovány ve tmě po dobu 20 minut ve 100 μ l 10 μ mol \cdot l⁻¹ DAF-FM DA nebo 1 minutu ve 250 μ l 10 μ mol \cdot l⁻¹ CuFL. Poté byly segmenty přeneseny do kapky 5% glycerolu v 10 mmol \cdot l⁻¹ Tris-HCl pufru, pH 7,4 na podložním sklíčku a překryty krycím sklíčkem.

3.2.2 Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch

Pro detekci S-nitrosylovaných proteinů byla použita metoda biotin-switch podle publikace Jaffrey a Snyder, 2001. Principem metody je reverzibilní značení S-nitrosylovaných cysteinů značkou nesoucí navázanou molekulu biotinu.

1 g biologického materiálu homogenizovaného v tekutém dusíku byl smíchán s 2 ml extrakčním puftrem HENT (extrakce 1:2). Poté byly vzorky promíchány a inkubovány 20 minut na ledu ve tmě. Následně byla provedena centrifugace extraktu po dobu 30 minut při 16000x g a teplotě 4°C. Supernatant byl přenesen do nových mikrozkušavek a uchován na ledu pro určení koncentrace proteinů ve vzorku pomocí metody Bradfordové (3.2.2.1). Objem vzorku obsahující 1 mg proteinu byl odebrán

do nové mikrozkušavky a poté byly přidány jednotlivé objemy činidel pro metodu BST podle následujícího postupu.

K blokování volných –SH skupin ve vzorcích bylo použito methylační činidlo S-methylmethanthiosulfonát (MMTS) o výsledné koncentraci $0,02 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako negativní kontrola pro blokaci –SH skupin proteinů sloužil vzorek bez přídavku MMTS, avšak s přídavkem rozpouštědla DMF o odpovídajícím objemu jako MMTS. Poté byl přidán 2% dodecylsírán sodný (SDS) a vzorky byly inkubovány ve tmě po dobu 20 minut a teplotě 50°C . Po 20 min inkubaci byl nadbytek MMTS odstraněn precipitací proteinů ve dvojnásobném objemu 80% ledově vychlazeného acetonu, a to po dobu 30 minut při teplotě -20°C . Následně probíhala 30 minut centrifugace při $16000\times g$ a 4°C . Poté došlo k promytí sedimentu 1 ml acetonu a vzorky byly opět centrifugovány 30 minut za stejných podmínek. Po centrifugaci byl sediment rozpuštěn ve 100 μl HENS pufru. Poté byl přidán askorbát o finální koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a biotin-HPDP o finální koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vzorky byly inkubovány po dobu 1 h při laboratorní teplotě ve tmě. Po inkubaci byl přidán 1 ml acetonu a vzorky byly ponechány precipitovat přes noc při -28°C .

Druhý den byly vzorky dvakrát centrifugovány po dobu 30 minut při $16000\times g$ a 4°C . Mezi centrifugacemi byl sediment promyt v 1 ml acetonu. Poté byl sediment rozpuštěn v příslušném objemu HEN pufru tak, aby výsledná koncentrace proteinů byla $2,5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Takto upravené vzorky byly analyzovány metodami SDS-PAGE a Western blot.

Použité roztoky:

- HENT pufr: $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HEPES, pH 7,7; $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA; $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ neocuproin; 1% Triton X-100.
- HENS pufr: $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HEPES, pH 7,7; $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA; $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ neocuproin; 1% SDS.
- HEN pufr: $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HEPES, pH 7,7; $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA; $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ neocuproin.

3.2.2.1 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorku byla použita metoda Bradfordové. Princip spočívá ve vzniku stabilního komplexu proteinu s barvivem Coomasie Brilliant Blue G-250 v kyselém prostředí, který lze spektrofotometricky stanovit při 595 nm (Bradford, 1976).

Stanovení obsahu bylo měřeno v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Do jednotlivých jamek bylo aplikováno 45 μl deionizované vody, 5 μl vzorku nebo standardu hovězího sérového albuminu (BSA) o dané koncentraci. Následně bylo přidáno 200 μl činidla Bradfordové (0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Coomasie Brilliant Blue G250; 0,25 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ methanol; 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 85% kyselina fosforečná). Po 5 minutové inkubaci byla měřena absorbance při 595 nm. Kalibračních standardy BSA měly hodnoty koncentrací 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 a 1,4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.2.3 Stanovení koncentrace S-nitrosothiolů Savillovou metodou

Pro stanovení celkových S-nitrosothiolů lze využít Savillovu metodu, která je založena na kvantifikaci uvolněného NO^+ vzniklého rozkladem S-nitrosothiolů v přítomnosti Hg^{2+} soli. Vzniklý produkt po reakci se sulfanilamidem a následné reakci s NED činidlem vytváří azobarvivo, které je možné spektrofotometricky detekovat při 540 nm (Saville, 1958).

Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo naneseno 195 μl činidla Griess B, v případě blanku 195 μl činidla Griess A. Poté bylo přidáno 5 μl rostlinného extraktu a následovala inkubace po dobu 5 minut. Po přidavku 100 μl činidla NED a 5 minutové inkubaci byla měřena absorbance při 540 nm.

Použité roztoky:

- Činidlo Griess A: 3,5% sulfanilamid v 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl.
- Činidlo Griess B: 3,5% sulfanilamid v 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl a 1% HgCl_2 .
- Činidlo NED: 0,1% N-(1-naftyletylen)diamin v deionizované vodě.

3.2.4 Western blot

Metoda Western blot se používá k imunodetekci specifického proteinu. Skládá se ze tří kroků: separace proteinů pomocí SDS-PAGE, transfer proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu (nitrocelulosa, PVDF) a imunochemická detekce cílového proteinu pomocí specifické protilátky.

Elektroforetická separace proteinů značených podle postupu 3.2.2 byla provedena pomocí metody SDS-PAGE v 12% dělicím polyakrylamidovém gelu, pH 8,8 a v 4% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu, pH 6,8 (Laemmli, 1970). Dělení proteinů probíhalo v zaostřovacím gelu při konstantním napětí 120 V, v dělicím gelu bylo napětí navýšeno na 200 V.

Příprava vzorků pro SDS-PAGE:

Vzorky proteinů byly smíchány v poměru 3:1 s 4x koncentrovaným Laemmliho vzorkovacím pufrům za neredukujících podmínek bez obsahu dithiotreitolu (DTT) nebo β -merkaptoethanolu. Rovněž nebyla provedena inkubace vzorků v termobloku z důvodu lability vazby proteinu s biotinem-HPDP. Takto připravené vzorky byly přeneseny do jamek v gelech (30 μ l do každé jamky). Jako standard molekulové hmotnosti byl použit Precision Plus Protein Dual Xtra Standards, který byl aplikován do jamky každého gelu v objemu 3 μ l.

Použité roztoky:

- 4x koncentrovaný Laemmliho vzorkovací pufr ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 6,8; 16% SDS; 80% glycerol; 0,8% bromfenolová modř).
- Elektrodotový pufr: $0,025 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl; $0,192 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ glycin; 0,1% SDS, pH 8,3.
- V Tab. 4 je uveden rozpis roztoků na přípravu 2 gelů pro skla s mezeričky 1,5 mm.

Tab. 4 Složení zaostřovacího a dělicího polyakrylamidového gelu

Gel (%)	Deionizovaná voda (ml)	Akrylamid/ Bis (T 30%, C 2,67%) (ml)	Puf ^r * (ml)	10% (w/v) SDS (ml)	TEMED (ml)	10% (w/v) APS [†] (ml)
4% (zaostřovací)	3,05	0,65	1,25	0,05	0,01	0,1
12% (dělicí)	3,4	4	2,5	0,1	0,01	0,1

* 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.

[†]Přídavkem 10% APS byla zahájena polymerace.

Transfer separovaných proteinů na nitrocelulosovou membránu byl realizován pomocí zařízení pro rychlý přenos proteinů Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) s nastavením: 25 V, 25 A, doba přenosu 10 minut. Veškerý materiál pro transfer (blotovací papíry, membránu, gel) byly nejprve inkubovány 10 minut v blotovacím pufru. Blotovací kazeta byla seskládána následujícím způsobem: spodní část kazety (anoda), 2x blotovací papír, membrána, gel, 2x blotovací papír a horní část kazety (katoda). Díky schopnosti proteinů vázat dodecylsulfát sodný (SDS) získají proteiny uniformní záporný náboj a migrují v elektrickém poli od katody k anodě, tj. dochází k přenosu a imobilizaci proteinů z gelu na povrch membrány. Úspěšnost přenosu proteinů z gelu na membránu byla prokázána vizuálním sledování přenosu barevného markeru molekulové hmotností a barvením pomocí Ponceau S. Jedná se o ve vodě smývatelné červené diazobarvivo, které se využívá pro reverzibilní barvení proteinů na membráně.

Imunochemická detekce S-nitrosylovaných proteinů probíhala následujícím způsobem. Membrána byla po přenosu proteinů inkubována v blokovacím roztoku po dobu 2 h. Poté byla membrána přenesena do roztoku primární monoklonální anti-biotin protilátky konjugované s alkalickou fosfátasou zředěnou v poměru 1:10000 s blokovacím roztokem. Inkubace probíhala za stálého třepání přes noc ve 4°C. Druhý den byla membrána 4x promyta po 15 minutách roztokem TTBS. Následně došlo k inkubaci ve 3 ml barvicího roztoku chromogenního substrátu NBT-BCIP dokud nedošlo k vyvinutí tmavě fialového zbarvení detekovaných bandů. Poté byla reakce zastavena destilovanou vodou, membrána byla usušena, vyfocena v dokumentačním systému Gel-Doc (Bio-Rad) a denzitometricky vyhodnocena programem softwaru VisionWorks.

Použité roztoky a protilátky:

- Blotovací pufr: 0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl; 0,192 M glycin; 20% methanol, pH 8,3
- Blokovací roztok: 1% roztok sušeného mléka obsahující 1% BSA v TBS pufru
- Barvicí roztok Ponceau S: 0,2% Ponceau S; 10% kyselina octová
- Primární protilátka: primární monoklonální myší anti-biotin protilátka konjugovaná s alkalickou fosfátasou zředěná blokovacím roztokem v poměru 1:10000

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vliv abiotického stresu na vývoj délky kořenů a nadzemní části

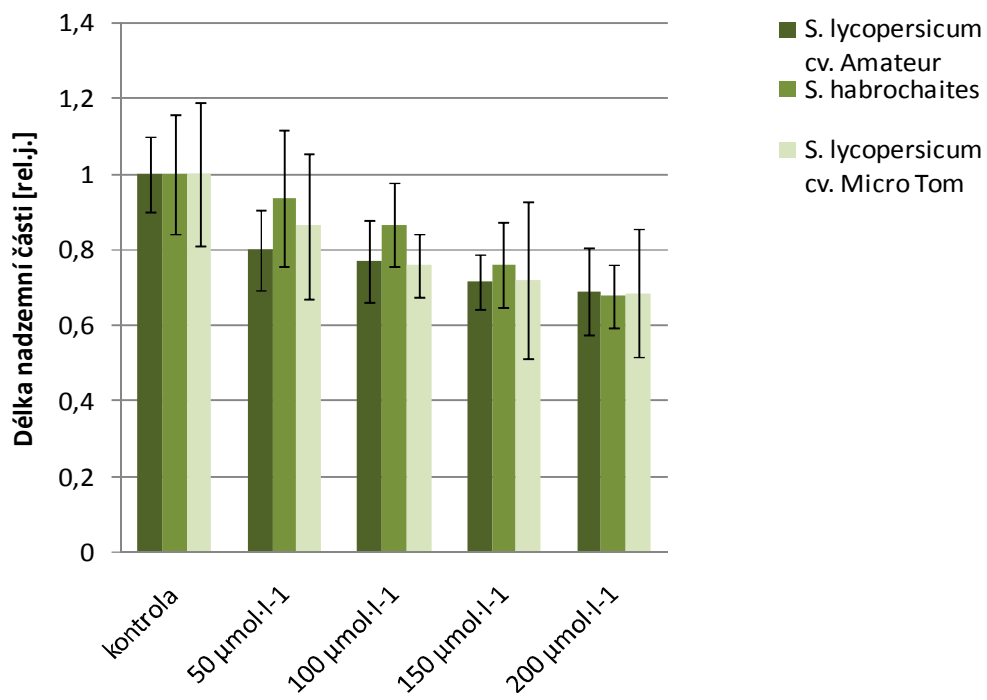
Pro vyhodnocení vlivu kadmia na délku kořenů klíčících rostlin byly použity tři genotypy rajčete *Solanum* spp.: *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites* a *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. V případě salinitního stresu byl v této bakalářské práci vyhodnocen pouze genotyp *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Genotypy *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites* jsou vyhodnoceny v diplomové práci Bc. Veroniky Kraiczové.

Aplikace kadmia způsobila inhibici růstu nadzemní části i kořenů u všech studovaných genotypů v závislosti na rostoucí koncentraci testované látky. Nejvíce se projevila u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. Pokles vývoje délky nadzemní části i kořene vlivem kadmia nastal už při aplikaci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CdCl}_2$, a to o více jak 20 % ve srovnání s kontrolou. Podobný trend byl zaznamenán i u ostatních genotypů, přičemž největší inhibice růstu kořene byla pozorována u *S. habrochaites* po aplikaci $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CdCl}_2$. U 28 denních rostlin hrachu vystavených $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CdCl}_2$ bylo pozorováno významné zamezení růstu kořenů, a to zejména počet a délka postranních kořenů (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006). Vliv kadmia na snížení růstu rostlin byl popsán i u dalších rostlinných druhů, například ozdobnice čínské (Scebba *et al.*, 2006), okurky (Abu-Muriefah 2008), závitky mnohokořenné (John *et al.*, 2008) či lékořice – viz. Obr. 11 (Zheng *et al.*, 2010).

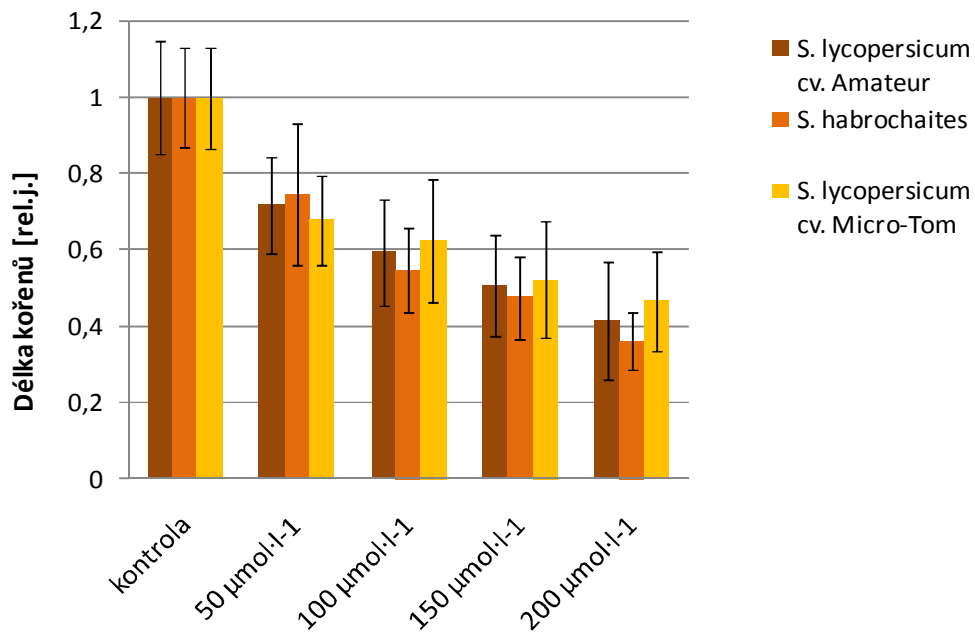


Obr. 11 Vliv kadmia na vývoj nadzemní části a kořenů lékořice uralské po aplikaci 0-50-100-200-400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CdCl}_2$ (převzato z Zheng *et al.*, 2010).

(a)

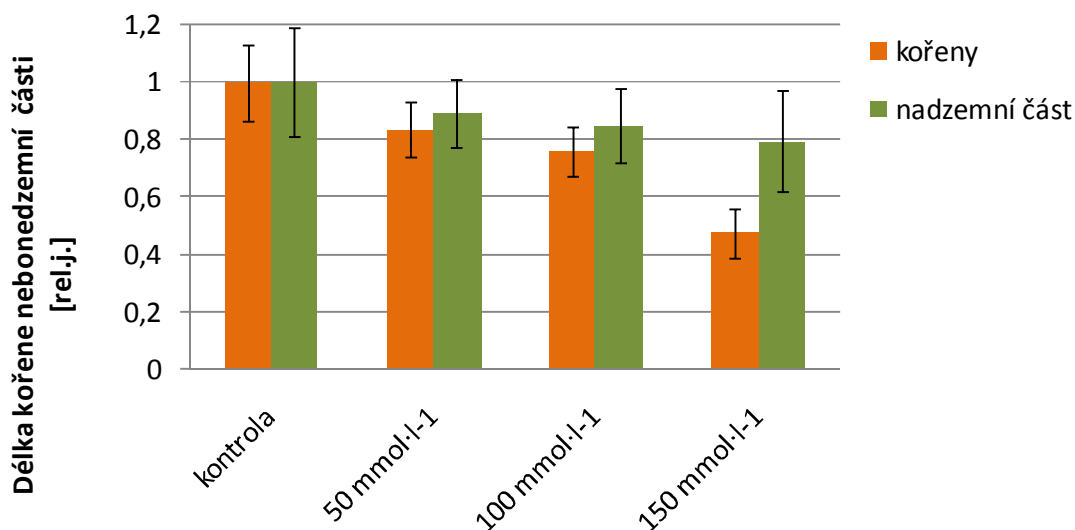


(b)



Obr. 12 Vliv CdCl_2 na vývoj délky nadzemní části (a) a kořenů (b) tří genotypů rajčete *Solanum* spp.: *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites* a *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom.

Salinitní stres v buňkách vede k hyperosmotickému stresu, který negativně ovlivňuje klíčení, růst rostliny a vede až k úhynu rostliny (Tavakkoli *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016). Rovněž může způsobit urychlení opadu listů či omezit růst listových výhonků (Qu *et al.*, 2012). U rajčete byl potvrzen negativní vliv NaCl na růst i hmotnost kořenů a listů (Manai *et al.*, 2014). Vliv salinity na vývoj nadzemní části a délku kořenů byl zkoumán u genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Vlivem salinity dochází k inhibici celkového růstu rostliny. Podobně jako při aplikaci CdCl₂, se vzrůstající koncentrací NaCl se zkracuje délka kořenů i nadzemní části. Porovnáním vlivu obou testovaných látek lze usoudit, že CdCl₂ významně inhiboval délku kořenů již při nejnižší koncentraci (50 μmol·l⁻¹) ve srovnání s NaCl.



Obr. 13 Vliv chloridu sodného na fyziologické parametry tj. vývoj délky kořene a nadzemní části u genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom.

4.2 Vliv abiotického stresu na produkci oxidu dusnatého v kořenech

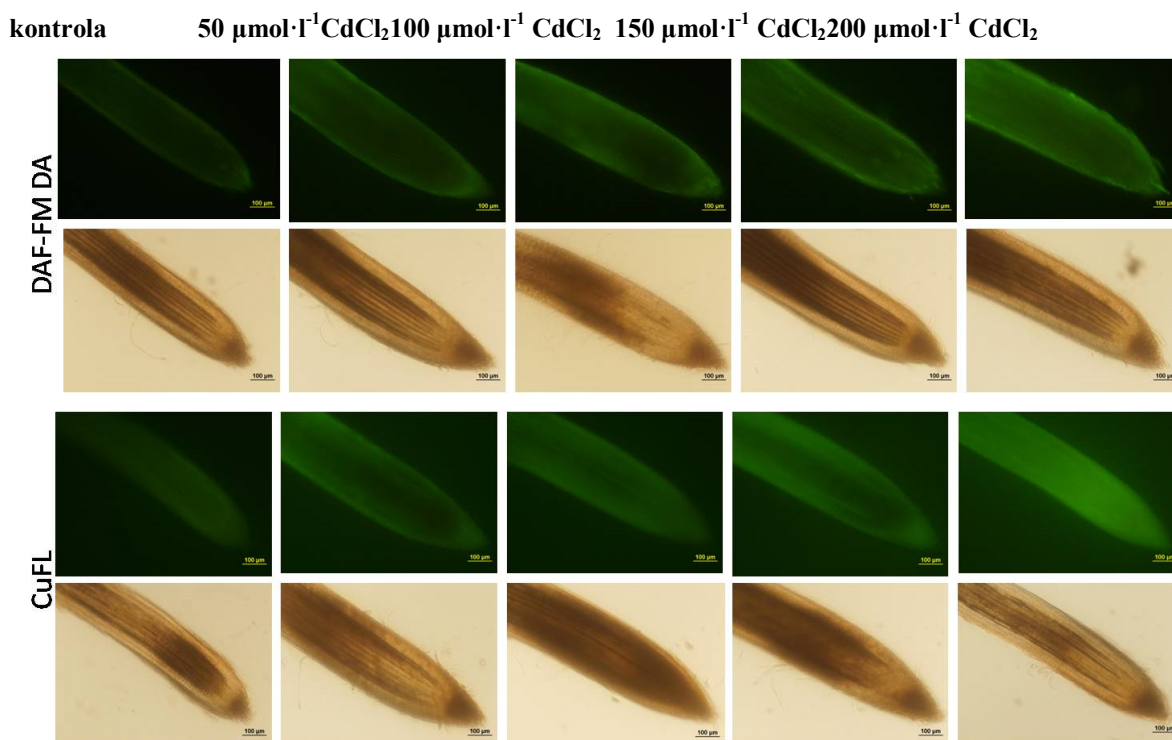
Pro stanovení produkce oxidu dusnatého byly vybrány 3 genotypy rajčete *Solanum* spp.: *S. habrochaites*, *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom pěstované na MS médiu s přidavkem chloridu sodného (NaCl, salinitní stres) či chloridu kadmnatého (CdCl_2 , působení těžkých kovů). V kořenových špičkách 9 denních rostlin byla histochemicky detekována intenzita fluorescenčního signálu DAF-FM DA a CuFL, využívaných pro specifickou detekci NO.

Z obrázkové dokumentace a z vyhodnocení intenzity signálu (Obr. 14, 15, 16) je patrné, že již při koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CdCl}_2$ v MS médiu dochází k nárůstu intenzity fluorescenčního signálu v kořenových špičkách všech genotypů v porovnání s kontrolou. Navíc, se zvyšující se koncentrací CdCl_2 v MS médiu dochází k nárůstu produkce NO, kdy nejvyšší intenzita signálu byla zaznamenána při koncentraci $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CdCl}_2$. Tento trend změn intenzit fluorescence byl pozorován i u druhé testované sondy CuFL. Besson-Bard *et al.*, 2009 popisuje významný nárůst produkce NO v kořenové špičce *Arabidopsis* po aplikaci $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CdCl}_2$ s využitím sondy 5-diaminofluorescein diacetátu. Podobně, v kořeni *Medicago truncatula* byla po aplikaci $50\text{-}300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CdSO}_4$ pozorována narůstající produkce NO (Xu *et al.*, 2010). Také v kořeni semenáčků *Lupinus luteus* došlo k prudkému nárůstu produkce NO po přidavku $89 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CdCl}_2$ (Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2012).

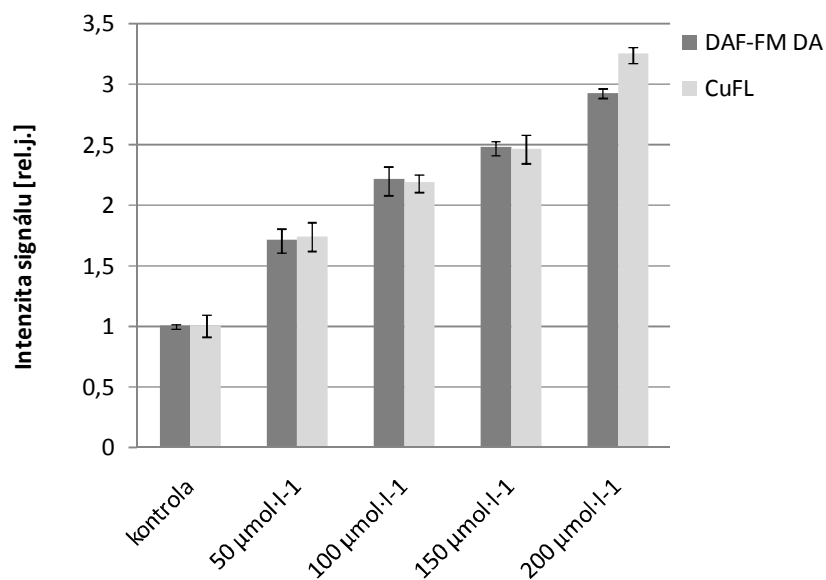
Další část toho experimentu byla zaměřena na studium vlivu salinity na produkci NO. Při aplikaci $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{NaCl}$ docházelo u obou sond ke zvýšenému fluorescenčnímu signálu v kořenových špičkách u všech tří genotypů rajčete a se vzrůstající koncentrací narůstala jeho intenzita. Tuto skutečnost potvrzuje obrázková dokumentace i vyhodnocení intenzity signálu (Obr. 17, 18, 19). V kořenové špičce *Arabidopsis* byl po aplikaci $100 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{NaCl}$ pozorován významný nárůst hladiny NO, peroxydusitanu i superoxidového radikálu (Letierrier *et al.*, 2012), což vede k indukci nitro-oxidativního stresu. Ve studii Corpas *et al.*, 2009 byla intenzivní produkce NO lokalizována v peroxisomech kořenových špiček *Arabidopsis* po aplikaci $100 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{NaCl}$.

(a)

S. lycopersicum cv. Amateur



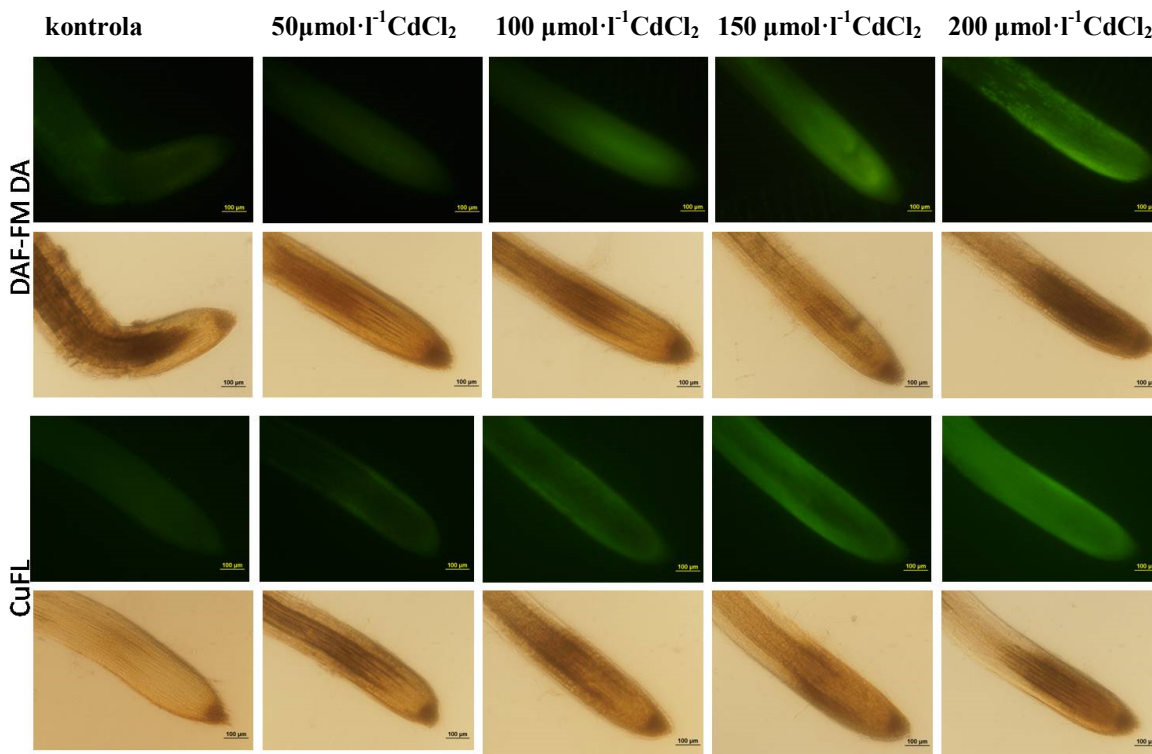
(b)



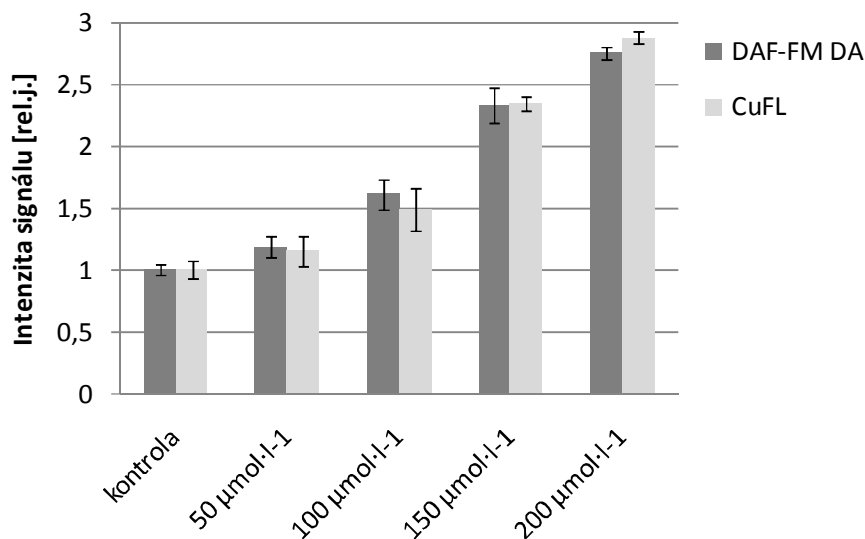
Obr. 14 Vliv aplikace chloridu kadmátého na intenzitu produkce oxidu dusnatého (NO) v kořenové špičce *S. lycopersicum* cv. Amateur. (a) Histochemická detekce NO s využitím fluorescenčních sond DAF-FM DA a CuFL. Kořeny 9 denních rostlin *S. lycopersicum* cv. Amateur byly vystaveny působení 50-100-150-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl₂. Úsečka 200 μm . (b) Porovnání intenzit fluorescenčního signálu u testovaných sond DAF-FM DA a CuFL.

(a)

S. habrochaites



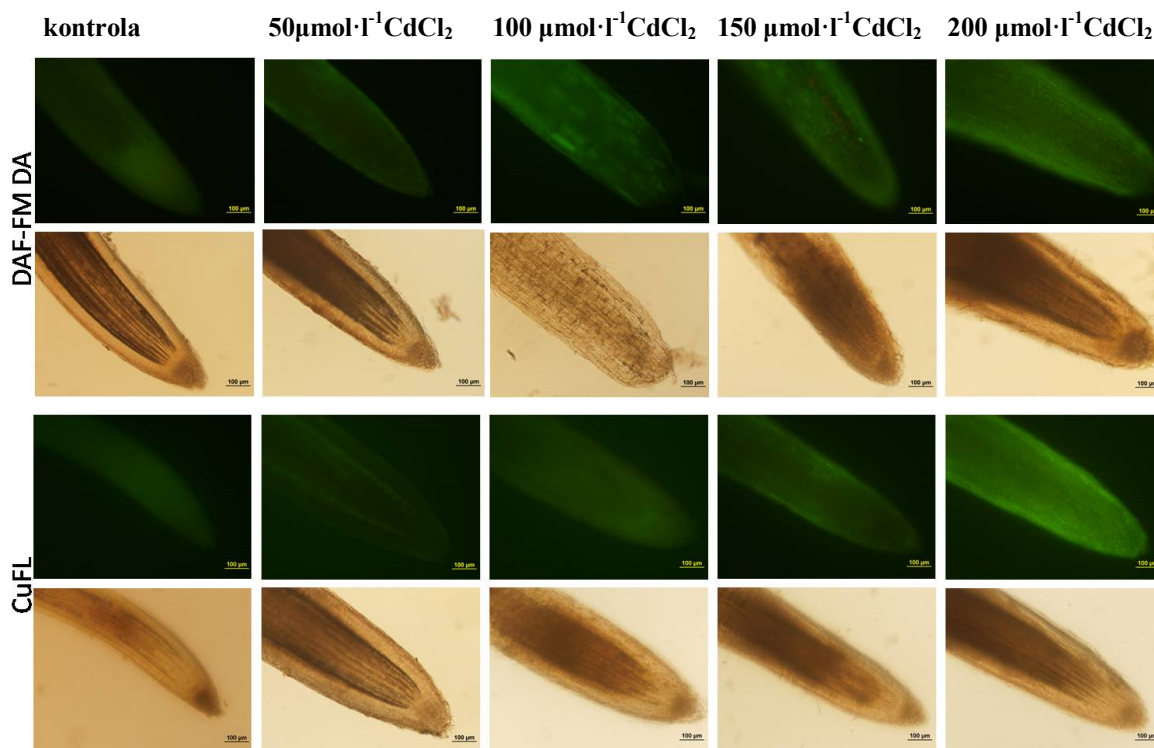
(b)



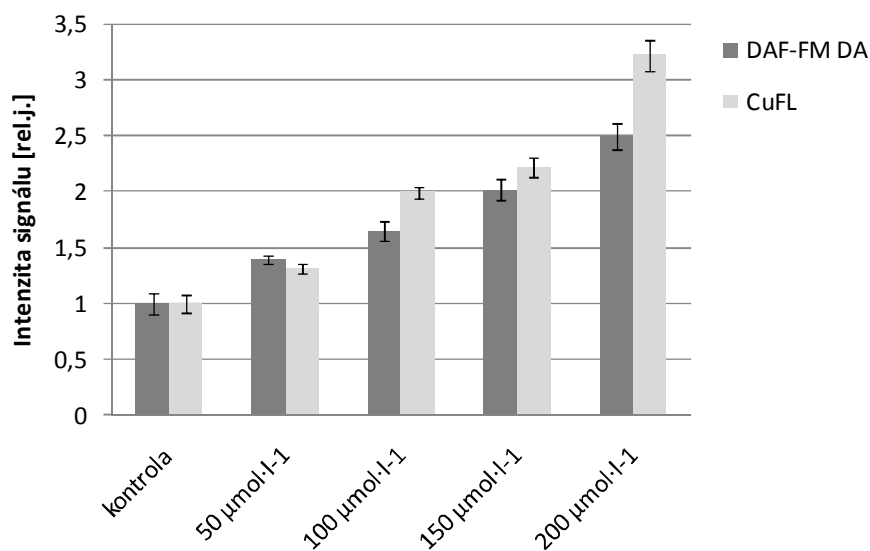
Obr. 15 Vliv aplikace chloridu kadmnatého na intenzitu produkce oxidu dusnatého (NO) v kořenové špičce *S. habrochaites*. (a) Histochemická detekce NO s využitím fluorescenčních sond DAF-FM DA a CuFL. Kořeny 9 denních rostlin *S. habrochaites* byly vystaveny působení 50-100-150-200 μmol·l⁻¹ CdCl₂. Úsečka 200 μm. (b) Porovnání intenzit fluorescenčního signálu u testovaných sond DAF-FM DA a CuFL.

(a)

S. lycopersicum cv. Micro-Tom



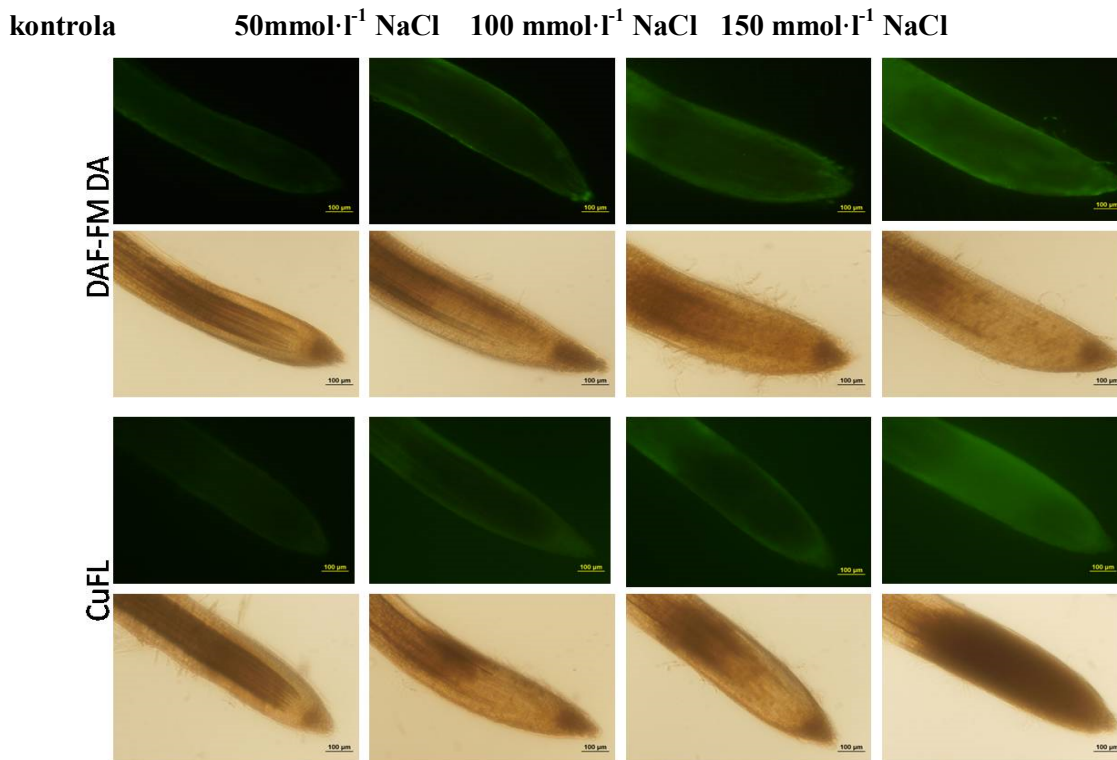
(b)



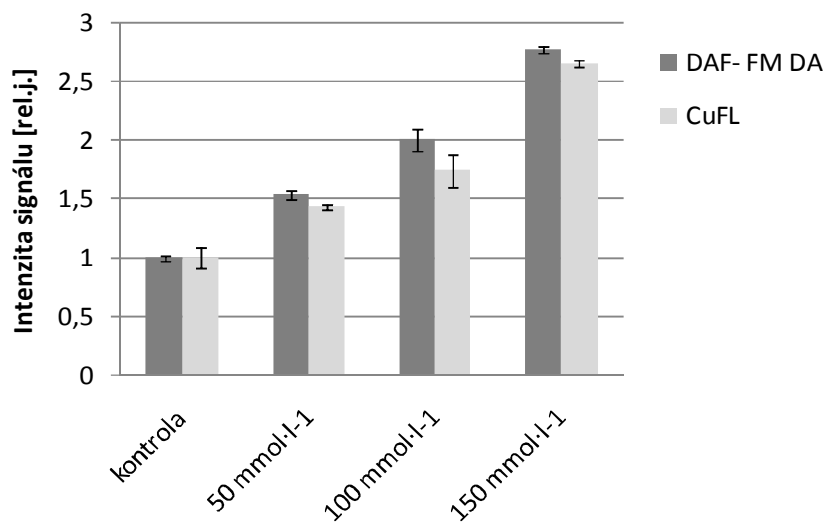
Obr. 16 Vliv aplikace chloridu kadmnatého na intenzitu produkce oxidu dusnatého (NO) v kořenové špičce *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. (a) Histochemická detekce NO s využitím fluorescenčních sond DAF-FM DA a CuFL. Kořeny 9 denních rostlin *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom byly vystaveny působení 50-100-150-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CdCl}_2$. Úsečka 200 μm . (b) Porovnání intenzit fluorescenčního signálu u testovaných sond DAF-FM DA a CuFL.

(a)

S. lycopersicum cv. Amateur



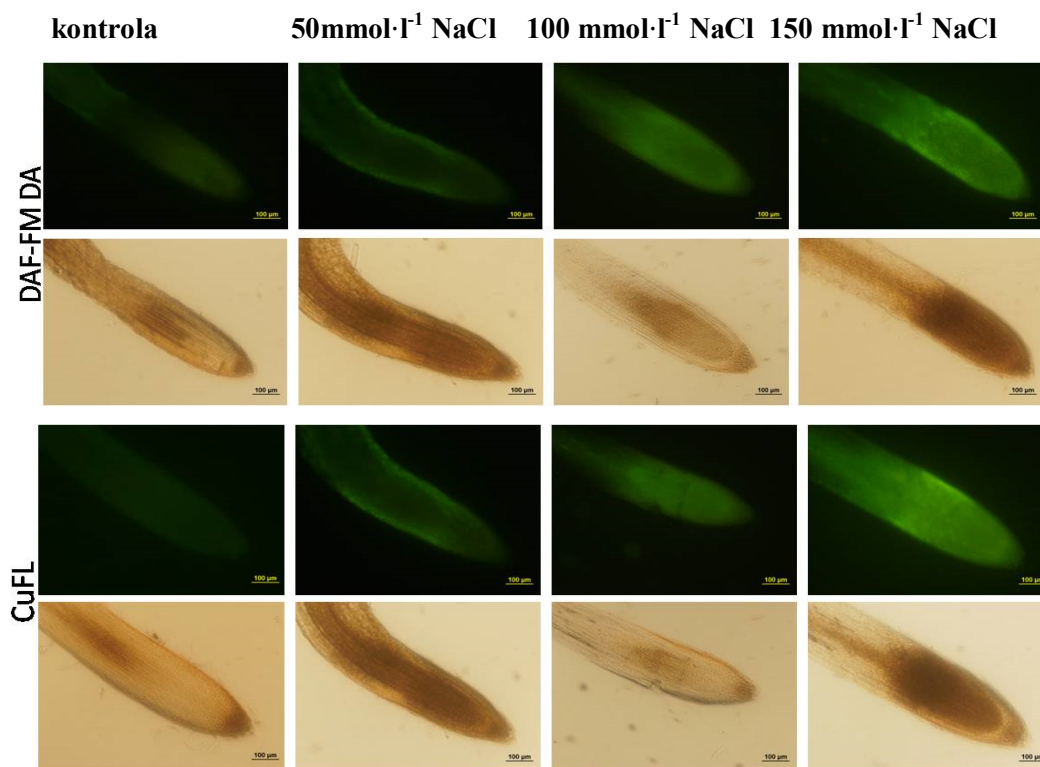
(b)



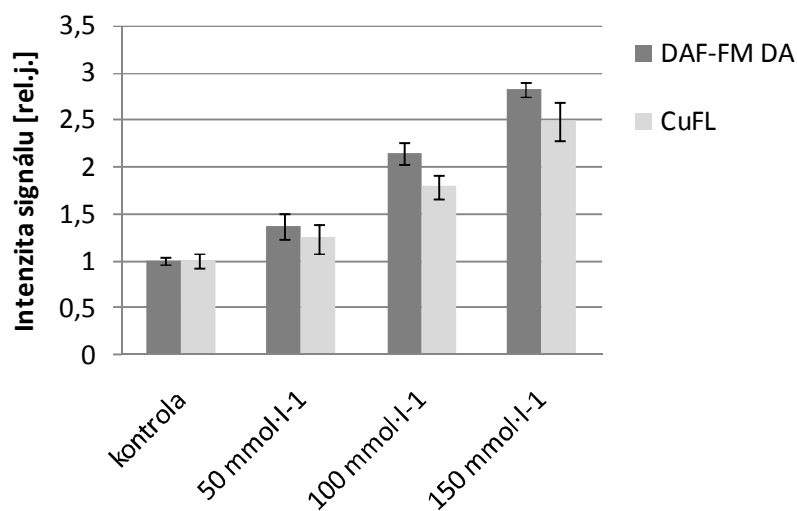
Obr. 17 Vliv aplikace chloridu sodného na intenzitu produkce oxidu dusnatého (NO) v kořenové špičce *S. lycopersicum* cv. Amateur. (a) Histochemická detekce NO s využitím fluorescenčních sond DAF-FM DA a CuFL. Kořeny 9 denních rostlin *S. lycopersicum* cv. Amateur byly vystaveny působení 50-100-150 mmol·l⁻¹ NaCl. Úsečka 200 µm. (b) Porovnání intenzit fluorescenčního signálu u testovaných sond DAF-FM DA a CuFL.

(a)

S. habrochaites



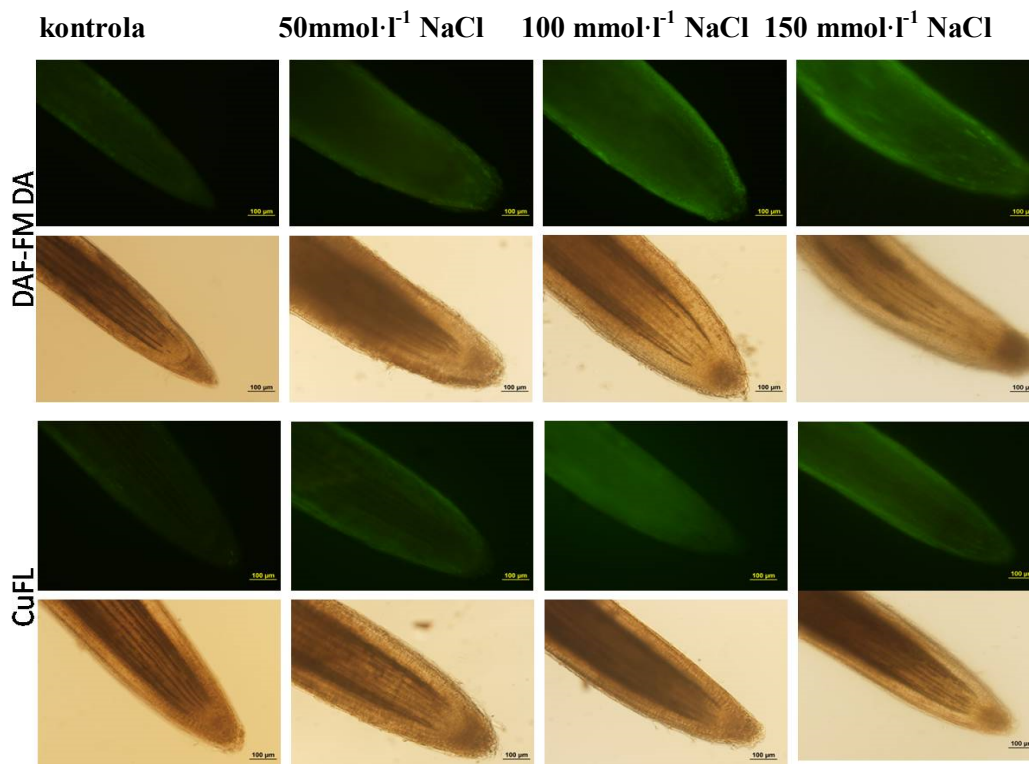
(b)



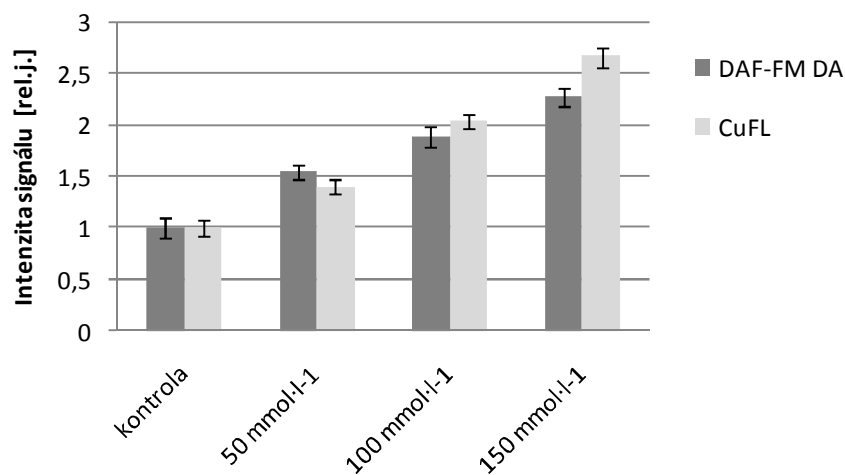
Obr. 18 Vliv aplikace chloridu sodného na intenzitu produkce oxidu dusnatého (NO) v kořenové špičce *S. habrochaites*. (a) Histochemická detekce NO s využitím fluorescenčních sond DAF-FM DA a CuFL. Kořeny 9 denních rostlin *S. habrochaites* byly vystaveny působení 50-100-150 mmol·l⁻¹ CdCl. Úsečka 200 μm. (b) Porovnání intenzit fluorescenčního signálu u testovaných sond DAF-FM DA a CuFL.

(a)

S. lycopersicum cv. Micro-Tom



(b)



Obr. 19 Vliv aplikace chloridu sodného na intenzitu produkce oxidu dusnatého (NO) v kořenové špičce *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. (a) Histochemická detekce NO s využitím fluorescenčních sond DAF-FM DA a CuFL. Kořeny 9 denních rostlin *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom byly vystaveny působení 50-100-150 mmol·l⁻¹ NaCl. Úsečka 200 µm. (b) Porovnání intenzit fluorescenčního signálu u testovaných sond DAF-FM DA a CuFL.

Z výsledků je zřejmé, že nejintenzivnější produkce NO byla detekována sondou CuFL u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur po aplikaci $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . Salinitní stres vyvolal nižší produkci NO oproti působení kadmia. Nejvyšší nárůst hladiny NO byl zaznamenán opět u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. Výsledky potvrzují zapojení rozdílných obranných mechanismů u citlivých a rezistentních genotypů při působení stresových faktorů, což podporují i dřívější studie zaměřené na problematiku ROS a RNS u modelového systému rajčete (Mlíčková *et al.*, 2004; Tománková *et al.*, 2006). U citlivého genotypu dochází k vyšší produkci NO, která může zvyšovat efektivitu obranné odpovědi potlačením oxidativního stresu díky zvýšení aktivity antioxidantních enzymů. Klíčovou roli zde pravděpodobně hraje proces S-nitrosylace, který reguluje aktivitu antioxidantních enzymů askorbát-glutathionového cyklu. S cílem objasnit tuto hypotézu jsme se v navazujících experimentech zabývali stanovením hladiny celkových S-nitrosothiolů a detekcí S-nitrosylovaných proteinů.

4.3 Vliv abiotického stresu na produkci S-nitrosothiolů a S-nitrosylovaných proteinů

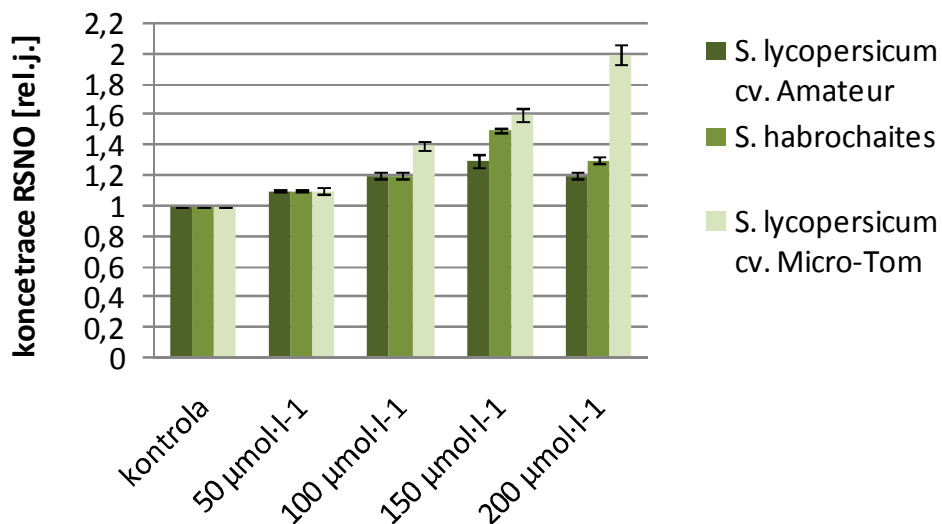
Pro sledování vlivu kadmia na změny hladin celkových S-nitrosothiolů pomocí Savillovy metody byly použity tři genotypy rajčete *Solanum* spp.: *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites* a *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. V případě salinitního stresu byl v této bakalářské práci sledován pouze genotyp *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Genotypy *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites* jsou vyhodnoceny v diplomové práci Bc. Veroniky Kraiczové.

Aplikace kadmia způsobila nárůst hladiny RSNO v kořenech *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. habrochaites* porovnáním s kontrolou. Genotyp *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom vykazoval významný nárůst hladiny RSNO v kořenech - o 60 % po přidavku $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 . V nadzemní části byl pozorován postupný nárůst RSNO v závislosti na koncentraci CdCl_2 u všech studovaných genotypů. Dvojnásobný nárůst hladiny RSNO byl zaznamenán při koncentraci $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ u genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom.

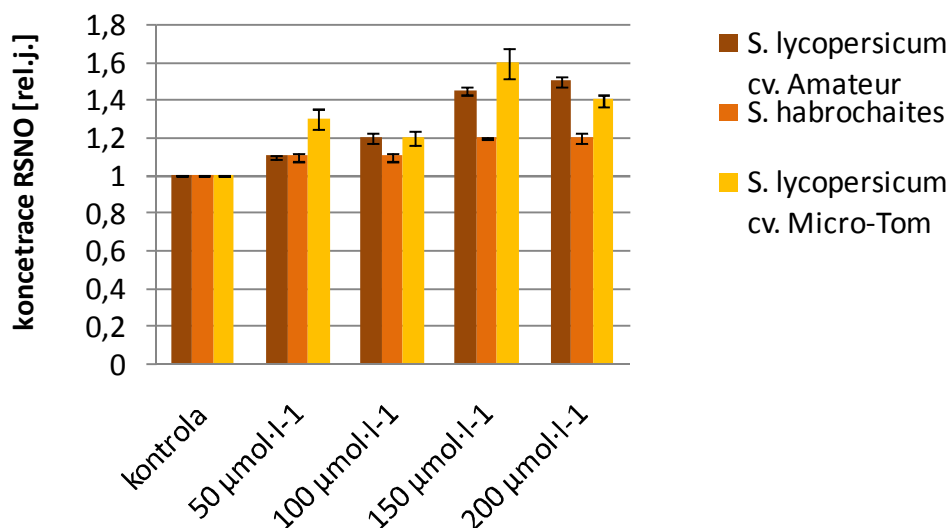
Salinitní stres indukoval mírný nárůst RSNO v kořenech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. V nadzemní části byla nejvyšší hladina RSNO zaznamenána po aplikaci

100 mmol·l⁻¹NaCl. V kontrastu, při nejvyšší koncentraci 150 mmol·l⁻¹NaCl byl pozorován pokles hladiny RSNO. Podobný trend byl popsán i v listech citrusovníku (Ziogas *et al.* 2013) a hrachu (Camejo *et al.*, 2013).

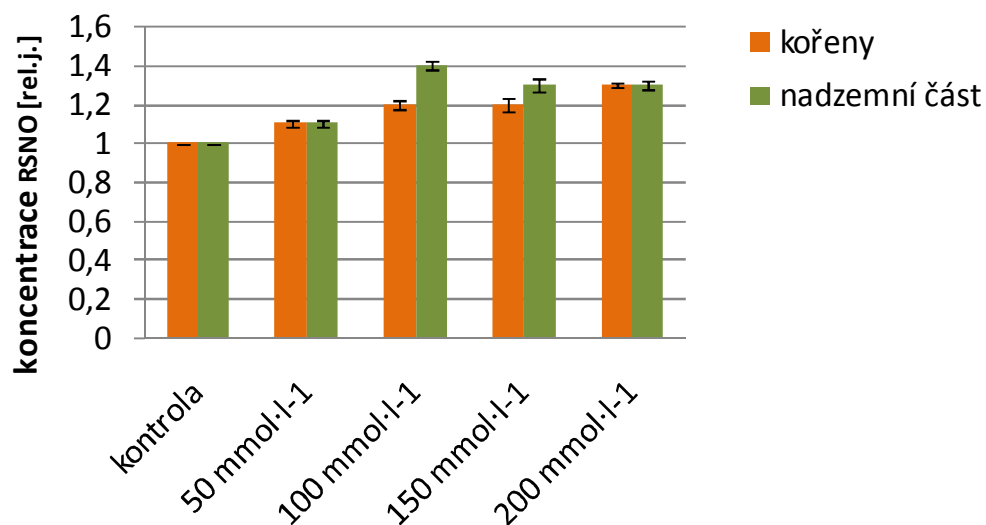
(a)



(b)



Obr. 20 Vliv CdCl₂ na koncentraci RSNO v nadzemní části (a) a kořenech (b) tří genotypů rajčete *Solanum* spp.: *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites* a *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom.



Obr. 21 Vliv NaCl na koncentraci RSNO v kořenu a nadzemní části u genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom.

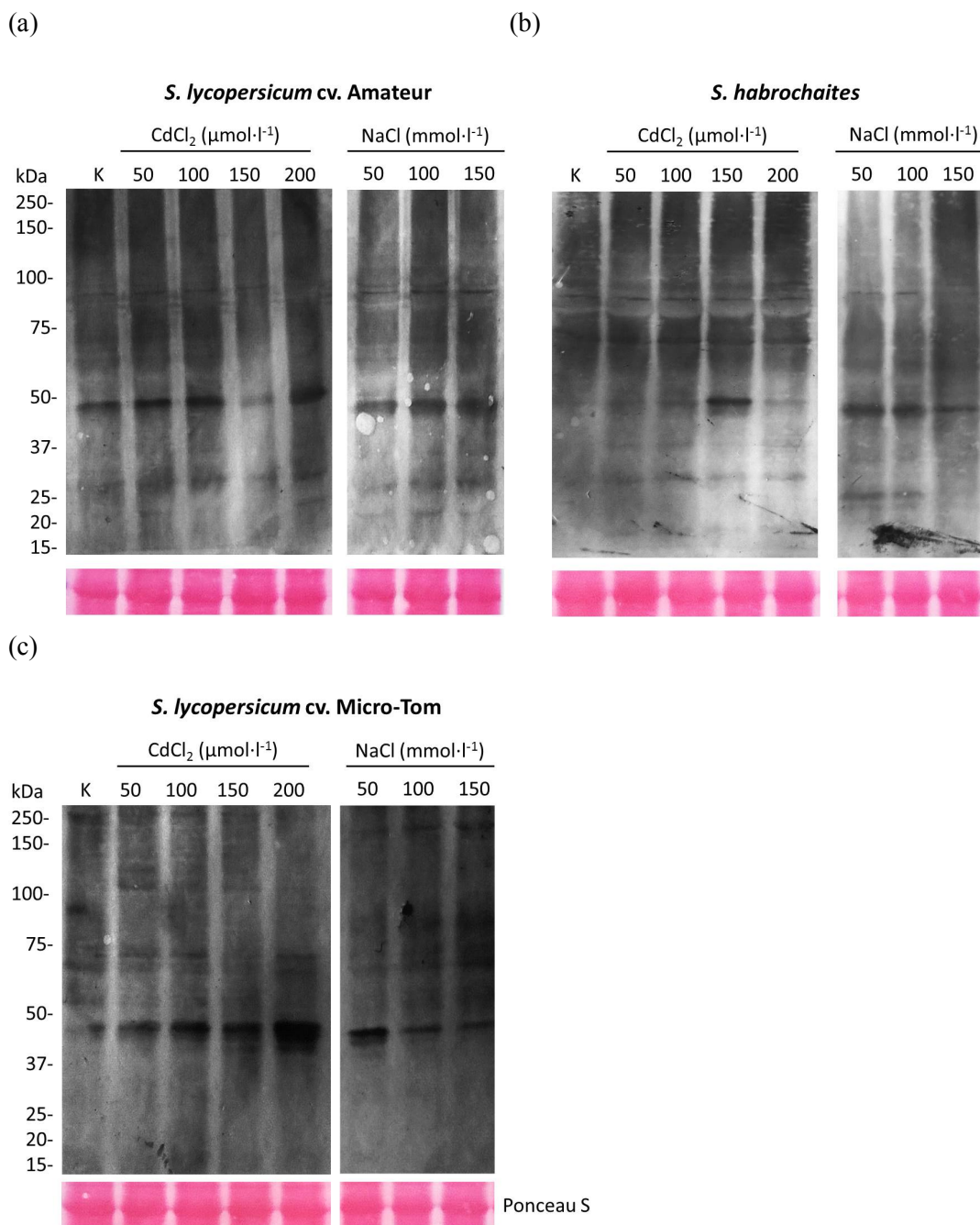
S-nitrosylované proteiny byly značeny metodou biotin-switch a detekovány u všech studovaných genotypů po aplikaci salinity i těžkých kovů. Na Obr. 22 a 23 jsou porovnány detekované bandy S-nitrosylovaných proteinů u jednotlivých genotypů za příslušných stresových podmínek. Nejintenzivnější změny S-nitrosylace proteinů při působení těžkých kovů i salinity jsou evidentní v nadzemních částech i kořenech genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom.

Vliv kadmia na S-nitrosylaci proteinů byl intenzivně studován u řady modelových rostlin, například listy hrachu byly ošetřeny $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CdCl}_2$ (Barroso *et al.*, 2006; Ortega-Galisteo *et al.*, 2012) či semena *A. thaliana* koncentrací $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CdCl}_2$ (Corpas a Barroso, 2014). S-nitrosylace má u řady enzymů regulační funkci. Ve studii Ortega-Galisteo *et al.*, 2012 se blíže zaměřili na S-nitrosylaci katalasy (CAT, EC 1.11.1.6). Dřívější studie (Clark *et al.*, 2000) prokázala, že vlivem S-nitrosylace dochází ke snížení CAT aktivity. Po aplikaci kadmia bylo zjištěno, že dochází ke snížené S-nitrosylaci tohoto enzymu a zvýšení jeho aktivity, což umožňuje rychlejší odbourávání vzniklých ROS. Rovněž u enzymu glykolát oxidasy (EC 1.1.3.15), který se nachází v peroxisomech a podílí se na produkci peroxidu vodíku, bylo zjištěno snížení aktivity vlivem S-nitrosylace v důsledku působení kadmia. S-nitrosylace je schopna regulovat funkci řady enzymů podílejících

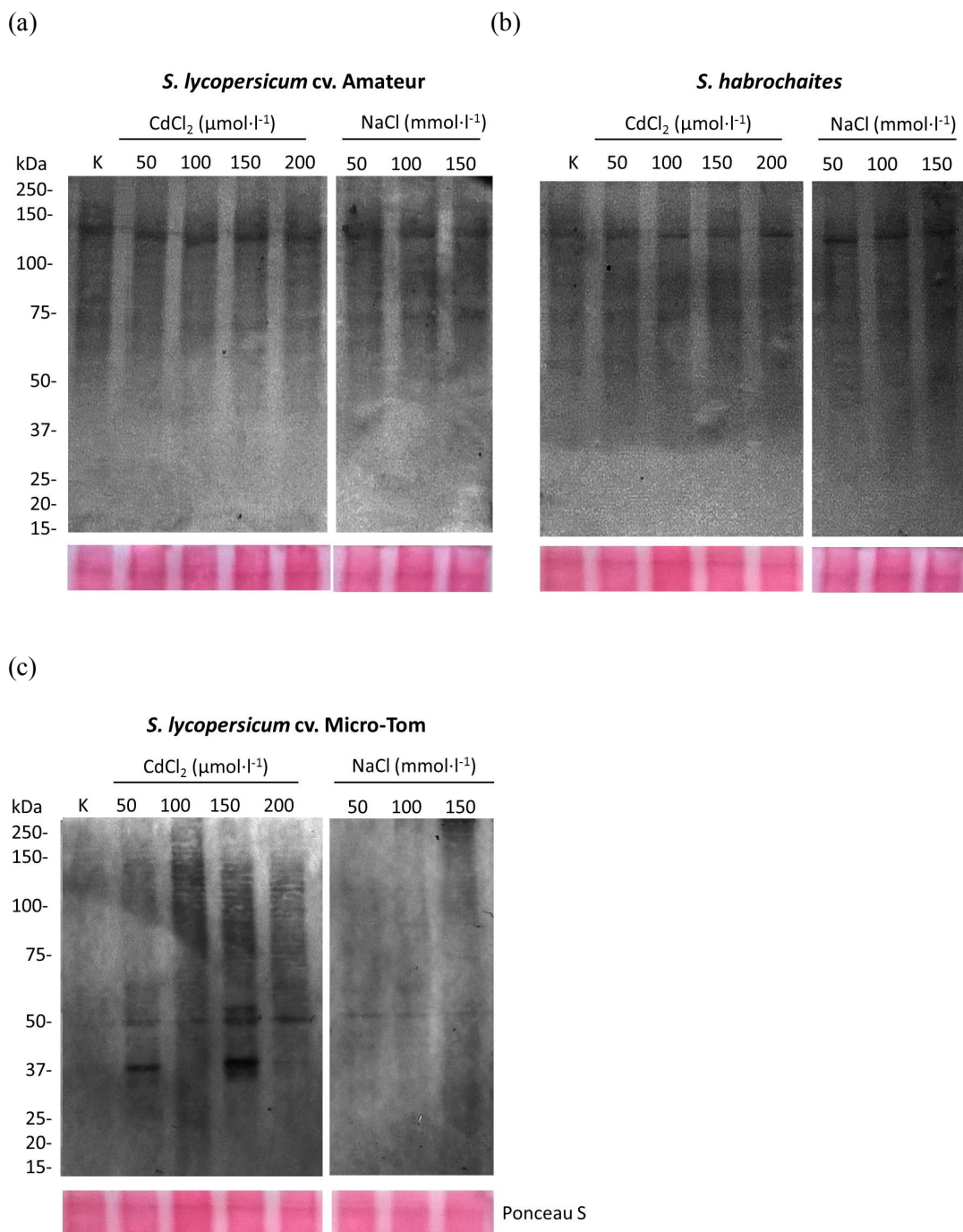
se na odbourávání či produkci ROS a přispívá tak ke snížení oxidativního stresu v buňkách.

Efekt salinity na S-nitrosylaci proteinů byl předmětem několika studií. Tanou *et al.*, 2009b uvádí, že po 16 denním působení $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl u listů citrusovníku (*Citrus aurantium*) dochází k S-nitrosylaci u 49 proteinových kandidátů. V kontrastu, studie Fares *et al.*, 2011 zabývající se studiem S-nitrosylace v buněčné kultuře *Arabidopsis* po aplikaci $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl po dobu 5 minut odhalila pouze 5 proteinových kandidátů podléhajících této modifikaci. Rovněž Camejo *et al.*, 2013 potvrzuje, že dlouhodobý salinitní stres má za následek snížení S-nitrosylace proteinů. U mitochondrií izolovaných z listů hrachu vystavených $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl po dobu 5 a 14 dní bylo identifikováno pouze 12 a 11 proteinových kandidátů (např. β -podjednotka ATP synthasy, peroxiredoxiny a heat shock protein 90) podléhajících S-nitrosylaci a celkový obsah RSNO byl snížen. Protichůdné výsledky přinesly publikace Abat a Deswal 2009; Begara-Morales *et al.* 2015, kde byl popsán nárůst hladiny RSNO vlivem salinity. Abat & Deswal 2009 použili jako modelový systém semenáčky brukve sítinovité (*Brassica juncea*) a aplikovali $500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl po dobu 1 h. Begara-Morales *et al.* 2015 detekovali nárůst RSNO v listech hrachu exponovaných $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl po dobu 4 dní.

Askorbát-glutathionový cyklus, klíčový pro detoxifikaci peroxidu vodíku u rostlin, hraje důležitou roli při působení salinitního stresu a je regulován S-nitrosylací. U enzymů askorbátperoxidasy (APX, EC 1.11.1.11) a monodehydroaskorbátreduktasy (MDHAR, EC 1.6.5.4), představující esenciální komponenty této dráhy, byly pozorovány změny jejich aktivity S-nitrosylací při působení $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl na transkripční i translační úrovni (Begara-Morales *et al.*, 2014; Begara-Morales *et al.*, 2015). U APX byla prokázána S-nitrosylace Cys32, která zvyšuje aktivitu. Substitucí tohoto residua za serin došlo k zamezení navázání nitroso skupiny, a tedy i ke snížení aktivity APX. Enzym MDHAR je regulován S-nitrosylací opačně, vazba nitroso skupiny významně snižuje jeho aktivitu.



Obr. 22 Detekce S-nitrosylovaných proteinů v nadzemních částech tří genotypů rajčete vystavených působení abiotického stresu – vlivu 50-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 a 50-150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl . (a) *S. lycopersicum* cv. Amateur, (b) *S. habrochaites*, (c) *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. SDS-PAGE za neredukujících podmínek. Na gel nanášeno 100 μg celkových proteinů. Přenos proteinů na nitroceluloseovou membránu. Kontrolní barvení membrány pomocí Ponceau S. Použita anti-biotin protilátka konjugovaná salkalickou fosfatase (1:10000), barvení NBT-BCIP.



Obr. 23 Detekce S-nitrosylovaných proteinů v kořenech tří genotypů rajčete vystavených působení abiotického stresu – vlivu 50-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CdCl_2 a 50-150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. (a) *S. lycopersicum* cv. Amateur, (b) *S. habrochaites*, (c) *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. SDS-PAGE za neredukujících podmínek. Na gel naneseno 100 μg celkových proteinů. Přenos proteinů na nitroceluloseovou membránu. Kontrolní barvení membrány pomocí Ponceau S. Použita anti-biotin protilátka konjugovaná s alkalickou fosfátasou (1:10000), barvení NBT-BCIP.

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na studium produkce oxidu dusnatého a S-nitrosylace u rajčete při působení abiotického stresu. Z dosažených výsledků vyplývají následující závěry:

- Po aplikaci těžkých kovů byl pozorován negativní vliv na růst kořene i nadzemní části tří testovaných genotypů rajčete: *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites* a *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom.
- Salinitní stres také způsobil inhibici růstu kořene i nadzemní části u genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom.
- Pro histochemickou detekci NO v kořenových špičkách byly použity dvě různé fluorescenční sondy – DAF-FM DA a CuFL. Obě sondy vykazovaly podobnou citlivost.
- Působením těžkých kovů a salinity byla vyvolána zvýšená produkce NO. Se zvyšující se koncentrací kadmia byl pozorován významný nárůst NO u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur.
- Abiotický stres inicioval nárůst hladiny S-nitrosothiolů. V kořeni i nadzemní části byly detekovány S-nitrosylované proteiny u všech genotypů. Nejintenzivnější změny byly evidentní u genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom.

6 LITERATURA

- Abat J. K., Deswal R. (2009): Differential modulation of S-nitrosoproteome of *Brassica juncea* by low temperature: Change in S-nitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity. *Proteomics* **9**, 4368–4380.
- Abu-Muriefah S. S. (2008): Growth parameters and elemental status of cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings in response to cadmium accumulation. *International Journal of Agriculture and Biology* **10** 261–266.
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Deckert J., Rucioska-Sobkowiak R., Gzyl J., Pawlak-Sprada S., Abramowski D., Jelonek T., Gwóźdź E. A. (2012): Nitric oxide implication in cadmium-induced programmed cell death in roots and signaling response of yellow lupine plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **58**, 124–134.
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Rodriguez-Serrano M., Esteban F. J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M. C., Valderrama R., Sandalio L. M., Del Río L. A. (2006): Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1785–1793.
- Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo, Beatriz, Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., López-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.
- Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Mata-Pérez C., Valderrama R., Padilla M. N., López-Jaramillo J., Luque F., Corpas F. J., Barroso J.B. (2015): Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **66**, 5983–5996.
- Belenghi B., Romero-Puertas M. C., Vercammen D., Brackener A., Inze' D., Delledonne M., Van Breusegem F. (2007): Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 1352–1358.
- Beligni M.V., Lamattina L. (2001): Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environment* **24**, 267–278.
- Besson-Bard A., Grivot A., Richaud P., Auroy P., Duc C., Gaymard F., Taconnat L., Renou J. P., Pugin A., Wendehenne D. (2009): Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology*, **149**(3), 1302–1315.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Brookes P. S., Shiva S., Patel R. P., Darley-Usmar V. M. (2002): Measurement of mitochondrial respiratory thresholds and the control of respiration by nitric oxide. *Methods in Enzymology* **359**, 305–319.
- Camejo D., Romero-Puertas M. D. C., Rodríguez-Serrano M., Sandalio L. M., Lázaro J. J., Jiménez A., Sevilla F. (2013): Salinity-induced changes in S-nitrosylation of pea mitochondrial proteins. *Journal of Proteomics* **79**, 87–99.
- Camerini S., Polci M. L., Restuccia U., Uselli V., Malgaroli A., Bachi A. (2007): A novel approach to identify proteins modified by nitric oxide: the HIS-TAG switch method. *Journal of Proteome Research* **6**, 3224–3231.
- Clark D., Durner J., Navarre D. A., Klessig D. F. (2000): Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 1380–1384.
- Corpas F. J., Hayashi M., Mano S., Nishimura M., Barroso J. B. (2009): Peroxisomes are required for in vivo nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* **151**, 2083–2094.

- Corpas F. J., 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. (2014): Functional implications of peroxisomal nitric oxide (NO) in plants. *Frontiers in Plant Science, Plant Cell Biology* **5**, 1-3.
- Courtois C, Besson A, Dahan J, Bourque S., Dobrowolska G., Pugin A., Wendehenne D. (2008): Nitric oxide signalling in plants: Interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *Journal of Experimental Botany* **59**, 155-163.
- Cui X., Zhang Y., Chen X., Jin H., Wu X. (2009): Effects of exogenous nitric oxide protects tomato plants under copper stress. In: *3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (ICBBE 2009)*. 1–7.
- Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S. (2002): A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16314–16318.
- David A., Yadav S., Bhatla S. C. (2010): Sodium chloride stress induces nitric oxide accumulation in root tips and oil body surface accompanying slower oleosin degradation in sunflower seedlings. *Physiologia Plantarum* **140**, 342–354.
- Dietz K. J. (2011): Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & Redox Signaling* **15**, 1129–1159.
- Eyal E., Levy A. A. (2002): Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 112–117.
- Fancy N. N., Bahlmann A. K., Loake G. J. (2016): Nitric oxide fiction in plant abiotic stress. *Plant, Cell and Environment* Jan 11. doi: 10.1111/pce.12707
- Fares A., Rossignol M., Peltier J. B. (2011): Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **416**, 331–336.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina L. (2010): Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cellular* **22**, 3816 – 3830.
- Forrester M. T., Foster M. W., Benhar M., Stamler J. S. (2009): Detection of protein S-nitrosylation with biotin-switch technique. *Free Radical Biology & Medicine*, **46**, 119-126.
- Fröhlich A., Durner J. (2011): The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): Is one really needed? *Plant Science* **181**, 401–404.
- Gamborf O. L., Eveleigh D. E. (1968): Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Canadian Journal of Biochemistry* **46**, 417.
- Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A. (2003): S-nitrosylation signaling in cell biology. *Molecular Intervention* **3**, 253–263.
- Gill S. S., Tuteja N. (2011): Cadmium stress tolerance in crop plants: probing the role of sulfur. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 215-222.
- Gill S. S., Hasanuzzaman M., Nahar K., Macovei A., Tuteja N. (2013): Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **63**, 254-26.
- Gould K.S., Klinguer A., Pugin A., Wendehenne D. (2003): Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell and Environment* **26**, 1851–1862.
- Grant M., Brown I., Adams S., Knight M., Ainslie A., Mansfield J. (2003): The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death, *Plant Journal* **23**, 441-450.
- Hasegawa P. M., Bressan R. A., Zhu J. K., Bohnert H. J. (2000): Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 463–499.

- Holtgreffe S., Gohlke J., Starmann J., Druce S., Klocke S., Altmann B., Wojtera J., Lindermayr C., Scheibe R. (2008): Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiologia Plantarum* **133**, 211–228.
- Hu K. D., Hu L. Y., Li Y. H., Zhang F. Q., Zhang H. (2007): Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. *Plant Growth Regulation* **53**, 173–183.
- Ignarro L. J., Buga G. M., Wood K. S., Byrns R. E., Chaudhuri G. (1987): Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 9265-9269.
- Ismail G. S. M. (2012): Protective role of nitric oxide against arsenic-induced damages in germinating mung bean seeds. *Acta Physiologiae Plantarum* **34**, 1303–1311.
- Jaffrey S. R., Snyder S. H. (2001): The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* **12**, PL1.
- Jin J., Xu Y., Huang Y. (2010): Protective effect of nitric oxide against arsenic-induced oxidative damage in tall fescue leaves. *African Journal of Biotechnology* **9**, 1619–1627.
- John R., Ahmad P., Gadgil K., Sharma S. (2008): Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. *Plant, Soil and Environment*, **54** 262–270.
- Jourd'heuil D. (2002): Increased nitric oxide-dependent nitrosylation of 4,5-diaminofluorescein by oxidants: implications for the measurement of intracellular nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine* **33**, 676–684.
- Kettenhofen N. J., Wang X., Gladwin M. T., Hogg N. (2008): In-gel detection of S-nitrosated proteins using fluorescence methods. *Methods in Enzymology* **441**, 53-71.
- Kim Y. M., Talanian R. V., Billiar T. R. (1997): Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 31138-31148.
- Klepper L. A. (1975): Evolution of nitrogen oxide gases from herbicide treated plant tissues. *WSSA Abstracts* **184**, 70.
- Klessig D. F., Durner J., Noad R., Navarre D. A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J. M., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E., Silva H. (2000): Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8849-8855.
- 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.
- Kojima H., Nakatsubo, Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Nagano T. (1998): Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry* **70**, 2446–2453.
- Kopyra M., Stachoń-wilk M., Gwódy E. (2006): Effects of exogenous nitric oxide on the anti-oxidant capacity of cadmium-treated soybean cell suspension. **28**, 525–536.
- Krasylenko Yu. A., Yemets A. I., Blume Ya. B. (2010): Functional role of nitric oxide in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **57**, 451-461.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lee U., Wie C., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E. (2008): Modulation of nitrosative stress by S-nitrosogluthathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 786 – 802.
- Li X., Pan Y., Chang B., Wang Y., Tang Z. (2016): NO Promotes Seed Germination and Seedling Growth Under High Salt May Depend on EIN3 Protein in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1203.

- Lim M. H., Xu D., Lippard S. J. (2006): Visualization of nitric oxide in living cells by a copper based fluorescent probe. *Nature Chemical Biology* **2**, 375-380.
- Lin A. J., Zhang X. H., Chen M. M., Cao Q. (2006): Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium accumulation, *Journal of Experimental Sciences* **19**, 596-602.
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J. (2005): Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**, 921-930.
- Leshem Y. Y., Haramaty E. (1996): The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *Journal of Plant Physiology* **148**, 258-263.
- Leshem Y. Y., Wills R., Veng-Va Ku V. (1998): Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO \cdot) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 825-286.
- Leterrier M., Airaki M., Palma J. M., Chaki M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2012a): Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environmental Pollution* **166**, 136–143.
- Leterrier M., Barroso J. B., Valderrama R., Palma J. M., Corpas F. J. (2012b): NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from *Arabidopsis* roots contributes in the mechanism of defence against the nitro-oxidative stress induced by salinity. *ScientificWorld-Journal*, 694-740.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J. S. (2001): A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490–494.
- Manai J., Gouiab H., Corpas F. J. (2014): Redox and nitric oxide homeostasis are affected in tomato (*Solanum lycopersicum*) roots under salinity-induced oxidative stress. *Journal of Plant Physiology* **171**, 1028–1035.
- Mano J. (2002): Early events in environmental stresses in plants. Induction mechanisms of oxidative stress. In: Inze D, Van Montagu M, eds. *Oxidative Stress in Plants*. Taylor and Francis, London. pp. 217–246.
- Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2004): S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovascular Research* **62**, 43-52.
- Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2007): Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovascular Research* **75**, 220-228.
- Mayer B., Klatt P., Werner E. R., Schmidt K. (1995): Kinetics and mechanism of tetrahydrobiopterin-induced oxidation of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 655-659.
- Meissner R., Jacobson Y., Melamed S., Levyatuv S., Shalev G., Ashri A., Elkind Y., Levy A. A. (1997): A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal* **12**, 1465–1472.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405–410.
- Mlíčková K., Luhová L., Lebeda A., Mieslerova B., Peč P. (2004): Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 753–761.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A recieved medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hancock J. T. (2002): Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology*. **128**, 13–16.
- Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. (2008): Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **59**, 165–176.
- Ortega-Galisteo A. P., Rodríguez-Serrano M., Pazmiño D. M., Gupta D. K., Sandalio L. M., Romero-Puertas M. C. (2012): S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: Changes under abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2089–2103.

- Pacoda D., Montefusco A., Piro G., Dalessandro G. (2004) Reactive oxygen species and nitric oxide affect cell wall metabolism in tobacco BY-2 cells. *Journal of Plant Physiology* **161**, 1143–1156.
- Paige J. S., Xu G., Stancevic B., Jaffrey S. R. (2008): Nitrosothiol reactivity profiling identifies S-nitrosylated proteins with unexpected stability. *Chemistry & Biology* **15**, 1307-1316.
- Pedroso M. C., Magalhaes J. R., Durzan D. (2000): A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1027–1036.
- Piterková J., Hofman J., Mieslerová B., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A., Petřivalský M. (2011): Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp.–*Oidium neolycopersici* interaction. *Environmental of Experimental Botany* **74**, 37–44.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998): Klíčení semen. Fyziologie stresu. Fyziologie rostlin. *Academia Praha*, pp. 348–351, 4120–414.
- Qiao W., Fan L. (2008): Nitric Oxide Signaling in Plant Responses to Abiotic Stresses. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1238-1246.
- Qu C., Liu C., Gong X., Li C., Hong M., Wang L., Hong F. (2012): Impairment of maize seedling photosynthesis caused by a combination of potassium deficiency and salt stress. *Environmental and Experimental Botany* **75**, 134–141.
- Rafikova O., Rafikov R., Nudler E. (2002): Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **99**, 5913.
- Rodríguez-Serrano, M.; Romero-Puertas, M. C.; Zabalza, A.; Corpas, F. J.; Gómez, M.; del Río, L. A.; Sandalio, L. M. (2006): Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant Cell Environment* **29**, 1532–1544.
- Romero-Puertas M. C., Perazzolli M., Zago E. D., Dellendonno M. (2004): Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**, 795-803.
- Romero-Puertas M. C., Laxa M., Matte A., Zaninotto F., Finkemeier I., Jones A. M., Perazzolli M., Vandelle E., Dietz K. J., Delledonne M. (2007): S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**, 4120–4130.
- Rasul S., Dubreuil-Maurizi C., Lamotte O., Koen E., Poinssot B., Alcaraz G., Wendehenne D., Jeandroz S. (2012): Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* **35**, 1483–1499.
- Saville B. (1958): A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* **83**, 670-672.
- Scebba F., Arduini I., Ercoli L., Sebastiani L. (2006): Cadmium effects on growth and antioxidant enzymes activities in *Miscanthus sinensis*. *Biologia Plantarum* **50**, 688–692.
- Sen C. K. (1998): Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol* **55**, 1747–1758.
- Shahani N., Sawa A. (2011): Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for S-nitrosylation. *Antioxidants & Redox Signaling* **14**, 1493-1504.
- Schonhoff C. M., Gaston B., Mannick J. B. (2003): Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 18265-18270.
- Singh R., Green M. R. (1993): Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase. *Science* **259**, 365-368.
- 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.
- Singh H. P., Batish D. R., Kaur G., Arora K., Kohli R. K. (2008): Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environmental and Experimental Botany* **63**, 158–167.

- Singh H. P., Kaur S., Batish D.R., Sharma V.P., Sharma N., Kohli R.K. (2009): Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide: Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society* **20**, 289–297.
- Stamler J. S., Toone E. J. (2002): The decomposition of thionitrites. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**, 779–785.
- Stöhr C., Ullrich W. R. (2002): Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2293–2303.
- Stöhr C., Stremmler S. (2005): Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* **57**, 463–470.
- Takahashi, Hideki, et al. (2005): Catalog of Micro-Tom tomato responses to common fungal, bacterial, and viral pathogens. *Journal of General Plant Pathology* **71**, 8–22.
- Tanou G., Molassiotis A., Diamantidis G. (2009a): Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environmental and Experimental Botany* **65**, 270–281.
- Tanou G., Rajjou L., Arc E., Belghazi M., Diamantidis Molassiotis A. (2009b): Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *Plant Journal* **60**, 795–804.
- Tanou G., Filippou P., Belghazi M., Job D., Diamantidis G., Fotopoulos V. (2012): Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *Plant Journal* **72**, 585–599.
- Tavakkoli E., Fatehi F., Coventry S., Rengasamy P., McDonald G. K. (2011): Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2189–2203.
- Thomas D. D., Liu X., Kantrow S. P., Lancaster J. R. (2001): The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **98**, 355–360.
- Tománková K., Luhová L., Petřiválský M., Peč P., Lebeda A. (2006): Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolyopersici*. *Physiology of Molecular Plant Pathology* **68**, 22–32.
- Tun N. N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E. I., Scherer G. F. (2006): Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiology* **47**, 346–354.
- Tuteja N., Chandra M., Tuteja R., Misra M. K. (2004): Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **4**, 227–237.
- Valderrama R., Corpas F. J., Carreras A., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Luque F., Gómez-Rodríguez M. V., Colmenero-Varea P., del Río L. A., Barroso J. B. (2007): Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* **581**, 453–461.
- Wada M., Morinaka Ch., Ikenaga T., Kuroda N., Nakashima K. (2002): A simple HPLC-fluorescence detection of nitric oxide in cultivated plant cells by *in situ* derivatization with 2,3-diaminonaphthalene. *Analytical Sciences* **18**, 631–634.
- Wawer I., Bucholc M., Astier J., Anielska-Mazur A., Dahan J., Kulik A., Wysłouch-Cieszynska A., Zaręba-Kozioł M., Krzywinska E., Dadlez M., Dobrowolska G., Wendehenne D. (2010): Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *The Biochemical Journal* **429**, 73–83.
- Wendehenne D., Gould K., Lamotte O., Durner J., Vandelle E., Lecourieux D., Courtois C., Barnavon L., Bentéjac M., Pugin A., (2005): NO signaling functions in the biotic and abiotic stress responses. *BMC Plant Biology*, **5** (Suppl 1), S35.
- White P. J., Brown P. H. (2010): Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany* **105**, 1073–1080.

- Xu J., Wang W., Yin H., Liu X., Sun H., Mi Q. (2010): Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. *Plant and Soil* **326**, 321-330.
- Yu C. C., Hung K. T., Kao C. H. (2005): Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH_4^+ accumulation in rice leaves. *Journal of Plant Physiology* **162**, 1319–1330.
- Zhao M. G., Zhao X., Wu Y. X., Zhang L. X.: (2007). Enhanced sensitivity to oxidative stress in *Arabidopsis* nitric oxide synthesis mutant. *Journal of Plant Physiology* **164**, 737–745.
- Zheng L., Roeder R. G., Luo Y. (2003): S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* **114**, 255–266.
- Zheng, G., Lv, H. P., Gao, S., Wang, S. R. (2010): Effects of cadmium on growth and antioxidant responses in *Glycyrrhiza uralensis* seedlings. *Plant Soil Environment* **56**, 508-515.
- Ziogas V., Tanou G., Filippou P., Diamantidis G., Vasilakakis M., Fotopoulos V., Molassiotis A. (2013): Nitrosative responses in citrus plants exposed to six abiotic stress conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* **68**, 118–126.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA/BIS	akrylamid- <i>N,N</i> -bisakrylamid
APS	persíran amonný
Biotin-HPDP	(<i>N</i> -(6-(biotinamido)hexyl)-3'-(2'- -pyridyldithio)propionamid)
BSA	Hovězí sérový albumin
BST	Biotin-switch
cADPR	Cyklická ADP-ribosa
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
CRMP-2	Collapsin response mediator protein 2
CuFL	(2-{2-chloro-6-hydroxy-5-[2-methylchinolin- 8-ylamino)-methyl]-3-oxo-3H-xanthen-9-yl}- -benzoová kyselina v komplexu s měďnatými ionty
Cy-3	zelené barvivo indokarbocyanin
Cy-5	červené barvivo indodikarbocyanin
DAF-2	4,5-diaminofluorescein
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetát
DAF-FM T	Triazofluorescein
DAN	Naftalen-2,3-diamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
GSH	Glutathion redukovaný
GSSG	Oxidovaný glutathion
GSNHOH	S-hydroxylaminoglutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny)- -ethansulfonová kyselina
JA	Jasmonová kyselina
MAT	Methioninadenosyltransferasa

MMTS	S-methylmethanthiosulfonát
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkinasa
NBT-BCIP	Nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem
NED	N-(1-naftyl)ethylendiamin
NO ⁻	Nitroxylový anion
NO	Oxid dusnatý
NO ⁺	Nitrosoniový kation
NO ₂ ⁻	Dusitanový anion, nitrit
NO ₃ ⁻	Dusičnanový anion, nitrát
NOS	NO-synthasa
NiR	Nitrit:NO reduktasa
NR	Nitrátreduktasa
Prx	Peroxiredoxin
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RSH	Thiol
RSNO	S-nitrosothiol(y)
SA	Salicylová kyselina
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
TBS	Fyziologický roztok pufrovaný Tris
TEMED	<i>N,N</i> -tetramethylendiamin
TR	Thioredoxin reduktasa
Trx	Thioredoxin