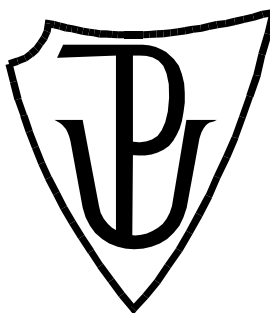


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Regulace metabolismu reaktivních forem dusíku a kyslíku S-nitrosylací u hrachu setého

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Markéta Vavrečková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tereza Tichá, Ph.D
Rok:	2018

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

V Olomouci dne.....

Poděkování

Veliké poděkování patří mé školitelce paní Mgr. Tereze Tiché, Ph.D za cenné rady, připomínky, vstřícnost, trpělivost a podporu při odborném vedení a konzultacích, a také za poskytnutí literatury a potřebných materiálů pro vypracování teoretické a experimentální části této práce.

Rovněž bych ráda poděkovala katedře biochemie za možnost vypracování experimentální části v laboratořích, poskytnutí všech potřebných pomůcek a za vřelý a přátelský přístup během mé práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Markéta Vavrečková
Název práce	Regulace metabolismu reaktivních forem dusíku a kyslíku S-nitrosylací u hrachu setého
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Tereza Tichá, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

V rámci reakce rostlin na biotický a abiotický stres se tvoří reaktivní formy dusíku (RNS) a kyslíku (ROS), které aktivují řadu signálních kaskád podílejících se na specifických obranných odpovědích. Řadí se zde také posttranslační modifikace proteinů, z nichž má v signálních drahách RNS největší význam S-nitrosylace, která spočívá v připojení nitroso-skupiny na cysteinová residua cílových proteinů a mění jejich aktivitu, stabilitu a příslušnou odpověď. S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) a thioredoxinreduktasa (TrxR) představují u rostlin klíčové enzymy denitrosylace regulující hladiny S-nitrosylovaných proteinů.

Cílem této práce bylo studium úlohy S-nitrosylace a denitrosylace ve vývoji kořene a nadzemní části dvou kultivarů hrachu setého *Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset s využitím modulátorů hladiny oxidu dusnatého – donoru GSNO a lapače PTIO. Byly zaznamenány rozdílné změny obsahu S-nitrosothiolů (RSNO) a s nimi související modulace aktivity GSNOR i TrxR v nadzemních částech i kořenech obou kultivarů. Intenzita S-nitrosylace proteinů se významně snížila po aplikaci GSNO i PTIO v kořenech *P. sativum* cv. Twinset. Vlivem modulátorů došlo ke změnám hladiny celkových RSNO v membránové frakci a produkci ROS prostřednictvím aktivity NADPH-oxidasy, jejíž aktivita je regulována S-nitrosylací.

Klíčová slova	Reaktivní formy dusíku, reaktivní formy kyslíku, oxid dusnatý, NADPH-oxidasa, S-nitrosylace, S-nitrosothioly, S-nitrosoglutathionreduktasa, thioredoxinreduktasa
Počet stran	64
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's name	Markéta Vavrečková
Title	Regulation of the reactive nitrogen and oxygen species metabolism by S-nitrosylation in pea
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Tereza Tichá, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

In plants exposed to stress conditions, reactive nitrogen (RNS) and oxygen species (ROS) can activate signaling cascades involved in defense responses. S-nitrosylation, a reversible attachment of a NO moiety to thiol group of cysteine residues, is considered as the most important posttranslational modification in the context of RNS signaling. S-nitrosylation can impact protein functionality, stability and cellular localization. S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) and thioredoxine reductase (TrxR) are the key enzymes of denitrosylation controlling the levels of S-nitrosylated proteins. The aim of this work was to study the role of S-nitrosylation and denitrosylation in the development of two pea cultivars *Pisum sativum* cv. Kudrnáč and *Pisum sativum* cv. Twinset using nitric oxide modulators - donor GSNO and scavenger PTIO. Different changes in S-nitrosothiols (RSNOs) levels, modulation of GSNOR and TrxR activities were detected in both cultivars. Intensity of protein S-nitrosylation was significantly decreased after GSNO and PTIO application in roots of *P. sativum* cv. Twinset. The level of total RSNOs in the membrane fraction and ROS production through NADPH-oxidase activity, regulated by S-nitrosylation, has changed as a result of GSNO and PTIO application.

Keywords	Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, NADPH-oxidase, nitric oxide, S-Nitrosylation, S-Nitrosothiols, S-Nitrosogluthathione reductase, thioredoxin reductase
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 Úvod	8
2 Charakterizace S-nitrosylace a S-nitrosothiolů	9
2.1 Oxid dusnatý	9
2.2 Mechanismy S-nitrosylace a vzniku S-nitrosothiolů	11
2.3 S-nitrosothioly	14
2.3.1 Stabilita S-nitrosothiolů	14
2.3.2 Neenzymová degradace S-nitrosothiolů	15
2.3.3 Enzymová degradace S-nitrosothiolů	16
2.3.3.1 S-nitrosoglutathionreduktasa	16
2.3.3.1.1 Funkční a strukturní vlastnosti rostlinné GSNOR	16
2.3.3.1.2 Úloha GSNOR ve vývoji rostlin	19
2.3.3.1.3 Úloha GSNOR v obranných reakcích rostlin	22
2.3.3.2 Thioredoxinreduktasa	22
2.3.4 Role S-nitrosylace v regulaci obranných reakcí rostlin	25
2.3.5 Metody stanovení S-nitrosothiolů	28
3 Experimentální část	31
3.1 Materiál a metody	31
3.1.1 Chemikálie	31
3.1.2 Přístroje a vybavení	31
3.1.3 Rostlinný materiál	32
3.1.4 Příprava pevného MS média k výsevu semen	33
3.1.5 Příprava rostlinného materiálu	34
3.1.6 Spektrofotometrické stanovení aktivity S- nitrosoglutathionreduktasy	34
3.1.7 Spektrofotometrické stanovení aktivity thioredoxinreduktasy	35
3.1.8 Spektrofotometrické stanovení aktivity NADPH oxidasy	35
3.1.9 Spektrofotometrické stanovení proteinových S-nitrosothiolů	37
3.1.10 Spektrofotometrické stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou	37
3.1.11 Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch	37
3.1.12 Metoda SDS-PAGE a Western blot	39
4 Výsledky	41
4.1 Stanovení hladiny S-nitrosothiolů	41
4.2 Stanovení aktivity enzymů zapojených do katabolismu S-nitrosothiolů	44
4.2.1 Aktivita S-nitrosoglutathionreduktasy	45
4.2.2 Aktivita thioredoxinreduktasy	46
4.3. Stanovení aktivity NADPH-oxidasy	47
4.4 Detekce S-nitrosylovaných proteinů	48
5 Diskuze	51
6 Závěr	54
7 Literatura	55
8 Seznam použitých zkratk a symbolů	63

Cíle práce

Teoretická část

Cílem teoretické části předložené bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše shrnující poznatky o funkci RNS u rostlin se zaměřením na S-nitrosylaci a její roli v obranných mechanismech rostlin. Dále byly charakterizovány enzymy S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) a thioredoxinreduktasa (TrxR), podílející se na denitrosylaci u rostlin.

Experimentální část

V rámci experimentální části byla studována úloha S-nitrosylace a denitrosylace v procesu vývoje kořene a nadzemní části vybraných kultivarů *Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset s využitím modulátorů hladiny oxidu dusnatého (NO) za fyziologických podmínek.

1. Příprava sterilního rostlinného materiálu – kultivace na MS médiu obsahujícím: 0,1 mM GSNO (donor NO); 0,1 mM PTIO (lapač NO).
2. Spektrofotometrické stanovení hladiny S-nitrosothiolů, aktivity enzymů GSNOR a TrxR.
3. Izolace S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch a jejich imunochemická detekce.
4. Izolace membránové frakce a stanovení aktivity enzymu NADPH oxidasy.

1 Úvod

Reaktivní formy dusíku (RNS) představují molekuly volných radikálů i molekuly neradikálové povahy, které vznikají jako vedlejší produkty metabolismu rostlin. Místo jejich vzniku je spojeno s různými buněčnými organelami, jako jsou mitochondrie, chloroplasty, endoplasmatické retikulum, peroxisomy a plazmatická membrána. Díky své schopnosti rychle reagovat s řadou biomolekul, nachází využití v mnoha signalizačních a komunikačních procesech v buňkách. Dále se RNS uplatňují při kontrole důležitých fyziologických procesů, od růstu a vývoje rostlin, přes odolnost vůči biotickému i abiotickému stresu, až po regulaci programované buněčné smrti. Pokud se RNS tvoří v nadměrné koncentraci, mohou být pro buňky toxické (Tripathy a Oelmüller, 2012).

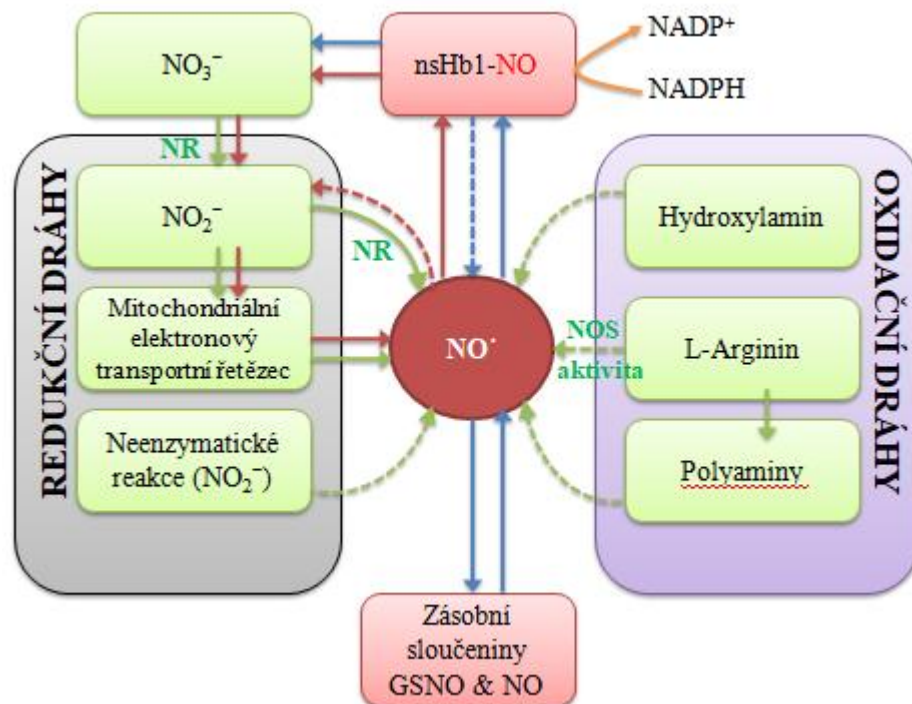
Za zástupce RNS se řadí molekuly odvozené od oxidu dusnatého (NO), a to radikál oxidu dusnatého (NO[•]), peroxydusitan (ONOO⁻), dále oxid dusitý (N₂O₃), oxid dusičitý (NO₂) a nízkomolekulární S-nitrosothioly (RSNO) (Tripathy a Oelmüller, 2012). Klíčovou složkou signálních drah NO u rostlin jsou posttranslační modifikace proteinů, a to nitrace tyrosinu či S-nitrosylace proteinů. Mechanismy a regulační schopnosti nitrace a S-nitrosylace představují v současné době intenzivně studovanou problematiku. U rostlin byly popsány dva možné mechanismy tzv. denitrosylace spočívající v odstranění nitroso (-NO) skupiny z cysteinových residuí v proteinech. První mechanismus představuje nepřímá kontrola hladiny RSNO prostřednictvím aktivity enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy, který katalyzuje NADH-dependentní redukci intracelulárního S-nitrosoglutathionu, nejvýznamnějšího nízkomolekulárního RSNO *in vivo*. Druhý mechanismus denitrosylace probíhá prostřednictvím systému thioredoxinu/thioredoxinreduktasy (Trx/TrxR). Trx s volnou thiolovou skupinou je oxidován v denitrosylační reakci s S-nitrosylovaným proteinem. Oxidovaný Trx je posléze redukován NADPH-dependentní reakcí katalyzovanou TrxR a dochází k regeneraci aktivního Trx.

2 Charakterizace S-nitrosylace a S-nitrosothiolů

2.1 Oxid dusnatý

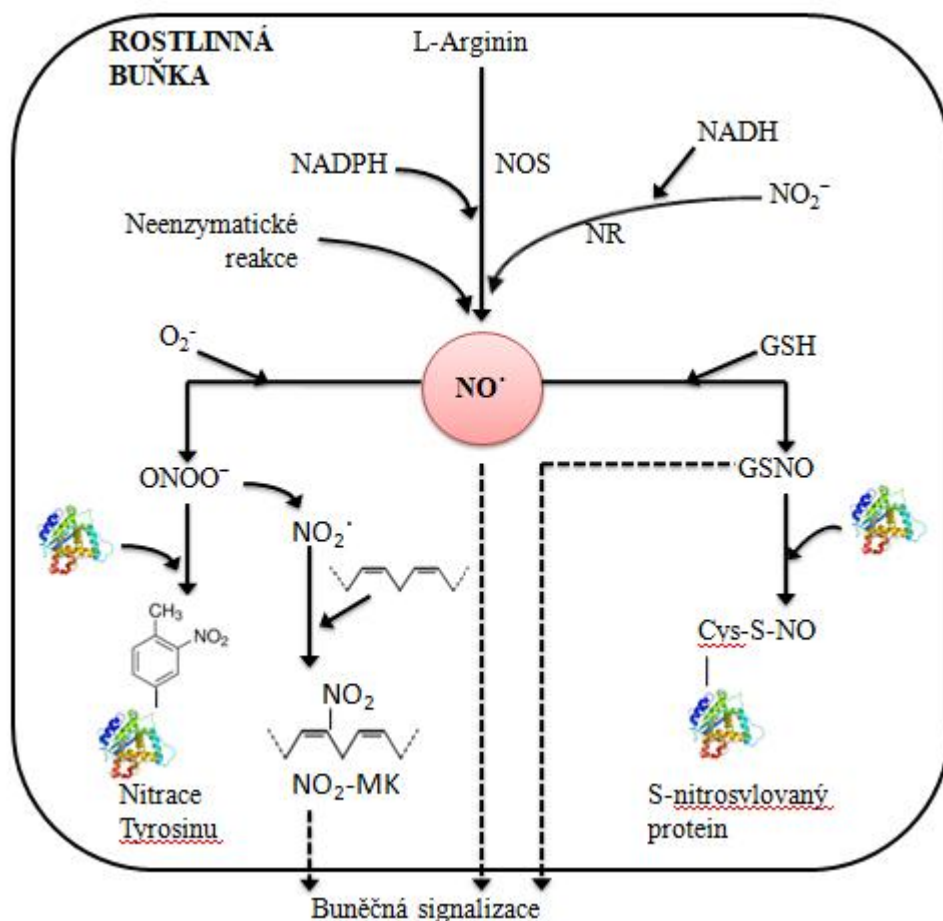
NO se vyskytuje v rostlinných i živočišných buňkách ve formě plynného radikálu (NO[•]). Ačkoli byla tvorba NO poprvé popsána u rostlin (Klepper, 1979), pro vědce se molekula NO stala zajímavou až poté, co byla identifikována jako relaxační faktor v kardiovaskulárním systému u savců (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Od té doby je považována za významnou signální molekulu účastnící se řady biologických a fyziologických procesů. U živočichů je zodpovědná například za vasorelaxaci, neurotransmisi, regulaci imunitního systému, a za pozornost stojí fakt, že poškození regulace hladiny NO vede k mnoha patologickým stavům (Luiking *et al.*, 2010). U rostlin se NO podílí na dormanci a klíčení semen, vegetativním růstu stonků a listů, vývoji kořenového systému a mnoha dalších fyziologických procesech (Piterková *et al.*, 2011; Šírová *et al.*, 2011). NO působí také v regulaci rostlinné imunity a je součástí signálních kaskád obranných reakcí rostlin na stresové podmínky (Noritake *et al.*, 1996; Beligni *et al.*, 1997; Laxalt *et al.*, 1997; Piterková *et al.*, 2008; Šírová *et al.*, 2011).

NO je velmi malá reaktivní molekula, která dokáže vzhledem ke své lipofilní struktuře procházet membránami a pronikat do okolních buněk. Nicméně má velmi krátkou životnost, a to 3–5 sekund, díky které rychle reaguje s jinými molekulami a radikály. Biosyntéza NO probíhá v závislosti na lokalizaci a stimulantech, které se podílejí na jeho tvorbě. U živočichů se na biosyntéze NO významně podílí zejména konstitutivní a indukibilní isoformy synthasy oxidu dusnatého (NOS, EC 1.14.13.39). U rostlin může biosyntéza NO probíhat enzymaticky i neenzymaticky (Obr. 1). V případě neenzymové reakce jsou důležitými zdroji NO dusitany, S–nitrosothioly (RSNO), hydroxylamin, L-arginin, polyaminy a nesymbiotický hemoglobin (Kelm, 1999). U vyšších rostlin je enzymovým zdrojem NO především nitrátreduktasa (NR, EC 1.7.1.2) (Gupta *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012).



Obr. 1 Možné způsoby syntézy oxidu dusnatého (NO). Asimilací dusičnanů (NO_3^-) vznikají dusitany (NO_2^-) za katalýzy nitrátreduktasy (NR, EC 1.7.1.1). Následná redukce NO_2^- na NO probíhá buď enzymaticky přes aktivitu NR nebo přes mitochondriální elektronový transportní řetězec nebo neenzymatickými reakcemi (redukčními dráhami). Alternativně může syntéza NO proběhnout také oxidačními cestami z hydroxylaminu, polyaminů nebo prostřednictvím aktivity enzymu podobného synthase oxidu dusnatého (NOS, EC 1.14.13.39) z L-Argininu, který avšak nebyl dosud identifikován. Vzniklý NO může být metabolizován dioxygenasovou aktivitou nesymbiotického hemoglobinu (ns-1Hb-NO), která převádí NO opět na NO_3^- , nebo NO reaguje s redukovaným glutathionem či thiolovými skupinami, čímž vznikají S-nitrosothioly. Červené šipky zde znázorňují cyklus dusičnan- NO , zelené šipky naznačují biosyntetické reakce a modré indikují reakce spojené s homeostázou NO . Upraveno podle Moreau *et al.* (2010).

Interakce NO s reaktivními partnery, zahrnující ROS, thioly, lipidové radikály a přechodné kovy v hemových strukturách, je zodpovědná za jeho signální mechanismy, které mohou vést ke změně biologické aktivity cílových biomolekul (Tuteja *et al.*, 2004). Významnou roli v signálních dráhách NO hrají posttranslační modifikace proteinů, a to nitrace proteinových tyrosinů, tryptofanů nebo histidinů a nitrosylace cysteinových thiolů (Obr. 2) (Hnízdová *et al.*, 2009; Jahnová *et al.*, 2013).



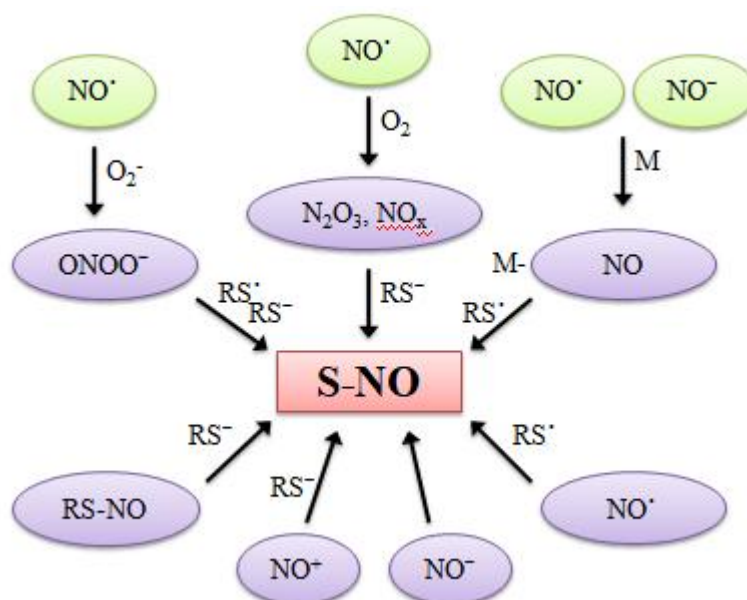
Obr. 2 Model posttranslačních modifikací zprostředkovaných volným radikálem oxidu dusnatého (NO^\bullet) v rostlinných buňkách. Schéma představuje rostlinnou buňku, kde NO^\bullet vzniká buď z L-Argininu prostřednictvím synthasy oxidu dusnatého (NOS, EC 1.14.13.39), z dusitanů (NO_2^-) prostřednictvím aktivity nitrátreduktasy (NR, EC 1.7.1.1) nebo neenzymatickými reakcemi. NO^\bullet může dále reagovat s redukováným glutathionem (GSH) nitrosylační reakcí za vzniku S-nitrosoglutathionu (GSNO). NO^\bullet reaguje se superoxidovými radikály ($\text{O}_2^{\bullet-}$) za vzniku peroxydusitanu (ONOO^-), který je silným oxidantem a způsobuje nitraci tyrosinových residuů v proteinech či nitraci mastných kyselin (MK). NO^\bullet , GSNO a $\text{NO}_2\text{-MK}$ se mohou podílet na procesech buněčné signalizace a tvorbě S-nitrosylovaných proteinů. Upraveno podle Corpas *et al.* (2015).

2.2 Mechanismy S-nitrosylace a vzniku S-nitrosothiolů

V posledních letech se S-nitrosylace ukazuje jako klíčová posttranslační modifikace cysteinových residuů, která reguluje funkce proteinů a buněčnou signalizaci. Patří mezi tzv. redoxní signální dráhy založené na redoxních změnách efektorových molekul. Kovalentním připojením -NO skupiny na atom síry postranního řetězce cysteinu v proteinech vznikají S-nitrosothioly (RSNO) (Jahnová *et al.*, 2013). Bylo nalezeno několik strukturních požadavků na okolí cysteinu, který může podléhat S-nitrosaci. Strukturní studie odhalily, že v okrajových oblastech modifikovaných Cys jsou významně zastoupeny pouze tři nepolární residua (Ala, Gly, Ile) (Kovacs

a Lindermayr, 2013). Motiv kyselina-báze je umístěn vzdáleněji vzhledem k Cys (8 Å) a jeho nabitě skupiny jsou dostupné rozpouštědлу (Marino a Gladyshev, 2010). Místa S-nitrosace jsou rovnoměrně distribuována v hydrofobních a hydrofilní oblasti proteinů s pKa okolo 10,01. 70 % S-nitrosylovaných Cys bylo obklopeno negativně nebo pozitivně nabitými aminokyselinami ve vzdálenosti 6 Å (Greco *et al.*, 2006; Doulias *et al.*, 2010).

S-nitrosylační reakce probíhají reversibilně, místně specificky a bez enzymové katalýzy. Existují čtyři hlavní cesty vedoucí k tvorbě RSNO, které se mohou vyskytovat v biologických systémech (Obr. 3): 1. oxidační dráha, 2. radikálová dráha, 3. tvorba RSNO katalyzovaná přechodnými kovy, 4. transnitrosace (Kovacs a Lindermayr, 2013).



Obr. 3 Volný radikál oxidu dusnatého (NO•) reaguje se superoxidem (O₂⁻), kyslíkem (O₂) nebo s kovy (M) a vznikají nitrosační činidla peroxydusitan (ONOO⁻), oxidy dusíku (N₂O₃, NO_x) nebo komplex kovu s NO (M-NO). NO• reaguje s thiolovým radikálem (RS•) za vzniku RSNO. Dále RSNO mohou vznikat reakcí thiolového aniontu (RS⁻) s nitroxylovým aniontem (NO⁻) či nitrosoniovým kationtem (NO⁺). Transnitrosylační reakce spočívají v přenosu -NO skupiny mezi různými thioly. Upraveno podle Kovacs a Lindermayr (2013).

Kharitonov *et al.* (1995) popsal jeden z možných mechanismů S-nitrosylace. Pokud reaguje molekula NO s kyslíkem, vznikají vyšší oxidy dusíku. V prvním a druhém kroku je pro S-nitrosylaci důležitá rychlost tvorby NO₂ a nitrosačního činidla N₂O₃. Následná hydrolýza N₂O₃ kompetuje s reakcí N₂O₃ s thioley (RSH).

1. $2 \text{ NO} + \text{ O}_2 \rightarrow 2 \text{ NO}_2$
2. $\text{ NO}_2 + \text{ NO} \rightarrow \text{ N}_2\text{O}_3$
3. $\text{ N}_2\text{O}_3 + \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ HNO}_2$
4. $\text{ N}_2\text{O}_3 + \text{ RSH} \rightarrow \text{ RS-NO} + \text{ HNO}_2$

RSNO dále mohou vznikat reakcí thiolového aniontu (RS⁻) či thiolového radikálu (RS[•]) s ONOO⁻, který je produktem reakce mezi NO a O₂⁻ (Handy *et al.*, 2006; Lancaster *et al.*, 2008).

Dalším možným mechanismem je reakce NO[•] s thioley či thiolových aniontem (RS⁻) za vzniku radikálového meziprojektu (Gow *et al.*, 1997). V případě výskytu akceptoru elektronů (kyslíku) se meziprojekt mění na RSNO. Reakce jsou popsány následujícími rovnicemi:

5. $\text{ RSH} + \text{ NO}^\bullet \rightarrow \text{ RS-N-O-H}^\bullet$
6. $\text{ RS-N-O-H}^\bullet + \text{ O}_2 \rightarrow \text{ RS-NO} + \text{ O}_2^{\bullet-}$

Při reverzibilní transnitrosační reakci, kde je rovnovážná konstanta rovná jedné, se přenáší -NO skupiny na volnou thiolovou skupinu jiné molekuly. S-thiolace probíhá obdobně, ale za vzniku disulfidu a nitroxylu (Hogg, 1999).

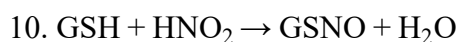
7. $\text{ RSNO} + \text{ R}'\text{SH} \leftrightarrow \text{ RSH} + \text{ R}'\text{SNO}$
8. $\text{ RSNO} + \text{ R}'\text{S} \leftrightarrow \text{ RSSR}' + \text{ NO}$

Jak je zmíněno na Obr. 3, NO[•] může reagovat také s přechodnými kovy (M) za vzniku komplexu kov-oxid dusnatý (M-NO). Tento komplex dále reaguje s thiolovým radikálem (RS[•]) za vzniku RSNO. Jako příklad je uvedena následující rovnice převzatá z Vanin (1998) a Manukhina *et al.* (2002).



2.3 S-nitrosothioly

RSNO jsou považovány za stabilní zásobní a transportní formy NO *in vivo* (Gaston *et al.*, 1999; Handy *et al.*, 2006). Ačkoli existuje celá řada zástupců RSNO, mezi nejznámější a nejrozšířenější patří S-nitrosoglutathion (GSNO) (Martínez-Ruiz *et al.*, 2004). Významná úloha GSNO *in vivo* spočívá ve schopnosti transportu NO či přenosu –NO skupiny prostřednictvím transnitrosace (Derakhshan *et al.*, 2007; Marino a Gladyshev 2010). GSNO vzniká reakcí tripeptidu glutathionu (GSH, γ -Glu-Cys-Gly) s RNS za aerobních podmínek (rovnice 11) (Hess *et al.*, 2012).



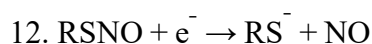
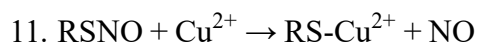
GSH je antioxidant, který hraje nezbytnou roli v buněčných procesech (Noctor *et al.*, 2012), a to zejména v obranné odpovědi rostlin na abiotické či biotické stresové faktory (Dubreuil-Maurizi a Poinsot, 2012; Gill *et al.*, 2012; Frendo *et al.*, 2013). Rychlost tvorby NO a koncentrace kyslíku zde mají velký vliv na konečný výtěžek reakce (Jourdeuil *et al.*, 2003). Bylo prokázáno, že pouze velmi malé procento NO se v biologických procesech přemění na RSNO (Broniowska *et al.*, 2013).

2.3.1 Stabilita S-nitrosothiolů

RSNO vykazují značnou nestabilitu, jelikož vazba S-NO je silně polarizovaná. RSNO dokážou snadno odštěpovat molekulu NO, účastní se S-thiolace, transnitrosylačních reakcí nebo působí i přímo (Ignarro *et al.*, 1999; Shahani a Sawa, 2011).

Stabilita RSNO rovněž závisí na mnoha faktorech, mezi které se řadí světlo, teplota, pH, přítomnost O₂ a kationtů přechodných kovů, askorbátu či GSH (Holmes a Williams, 2000; Hogg N., 2002). Řada studií popsala v rámci rozkladu RSNO *in vitro* nejen NO jako produkt reakce, ale také například dusík a síru ve všech jejich oxidačních stavech (Singh *et al.*, 1996; Ignarro *et al.*, 1999; Hogg, 1999; Stamler a Toone, 2002).

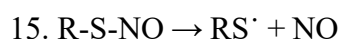
Možný rozklad RSNO je popsán následujícími rovnicemi dle Hogg (2002). Rovnice 11 znázorňuje rozklad pomocí přechodných kovů, rovnice 12 elektrochemickou redukcí, rovnice 13 popisuje rozklad pomocí thiolů a rovnice 14 vlivem světla.



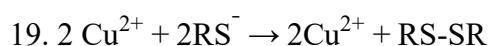
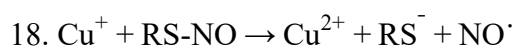
2.3.2 Neenzymová degradace S-nitrosothiolů

Vazba S-NO se může rozpadnout tzv. monomolekulární reakcí, a to buď homolyticky nebo heterolyticky. Homolytické štěpení je na rozdíl od heterolytického štěpení výhodné z toho důvodu, že se jedná o dráhu s nejmenší energií. Heterolytickým štěpením vzniká nitrosoniový (NO^+) nebo nitroxylový (NO^-) ion, což není z fyziologického hlediska významné. Oproti homolytickému štěpení vznikají vlivem UV světla důležité NO a RS^\cdot radikály (Singh *et al.*, 1996).

Mechanismy homolytického štěpení vazby S-NO jsou popsány v následujících rovnicích podle Stamler a Toone (2002). RSNO se v prvním kroku rozštěpí na radikál RS^\cdot a molekulu NO (rovnice 15). Poté může proběhnout bimolekulární reakce dvou radikálů RS^\cdot v nízké koncentraci (rovnice 16). Reakce však není příliš pravděpodobná. Více předpokládaná je homolytická substituce, v tomto případě reakce RS^\cdot radikálu s další molekulou RSNO (rovnice 17).



Reakce rozkladu vazby S-NO jsou katalyzovány různými ionty kovů jako Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} . Nejvýznamnější jsou měďnaté ionty Cu^{2+} vznikající při redukci thiolátů (RS^-), z Cu^{2+} navázaných na proteiny a peptidy nebo reverzibilní vazbou NO na thiolát měďnatý ($\text{Cu}^{2+}\text{-SR}$), čímž vznikne adukt mědi a S-nitrosothiolu [$\text{Cu}^{\text{I}}(\kappa^1\text{-N(O)SR}$] (Singh *et al.*, 1996; Ford *et al.*, 2005). Ačkoli úloha Cu^{2+} v rozkladu RSNO není zcela objasněna, v literatuře byly popsány následující dvě rovnice (Stamler a Toone, 2002):



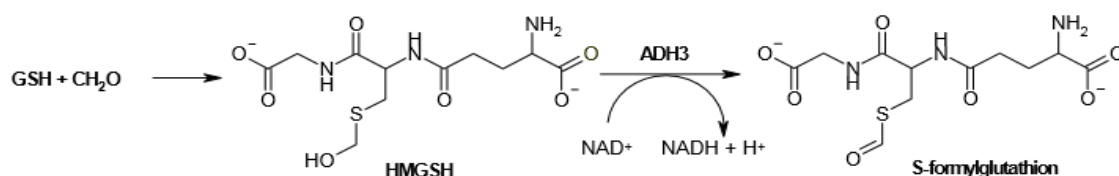
Využitím chelatačních činidel, kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) nebo neocuproinu jsou vytvořeny komplexní sloučeniny s ionty kovů a je zamezena degradace RSNO (Singh *et al.*, 1996). V cytosolu existují reduktanty, které jsou schopny rozkládat nízkomolekulární i proteinové RSNO. Ochranu RSNO před působením redukčního prostředí v cytosolu zajišťují například hydrofobní konce některých proteinů, buněčné membrány nebo různé váčky (Rafikova *et al.*, 2002). Mezi reduktanty narušující RSNO bychom mohli zařadit například GSH, superoxidový aniont radikál ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) nebo askorbát. (Clementi *et al.*, 1998). Na druhou stranu existuje také několik stabilních proteinových RSNO například kreatinkinasa, α -tubulin, β -tubulin nebo glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa. Předpokládá se, že u těchto proteinů dochází ke změně konformace, díky níž je nitroso-skupina chráněna před vlivem redukčních činidel, a díky tomu S-nitrosylované proteiny fungují odlišně v signálních drahách (Paige *et al.*, 2008).

2.3.3 Enzymová degradace S-nitrosothiolů

2.3.3.1 S-nitrosoglutathionreduktasa

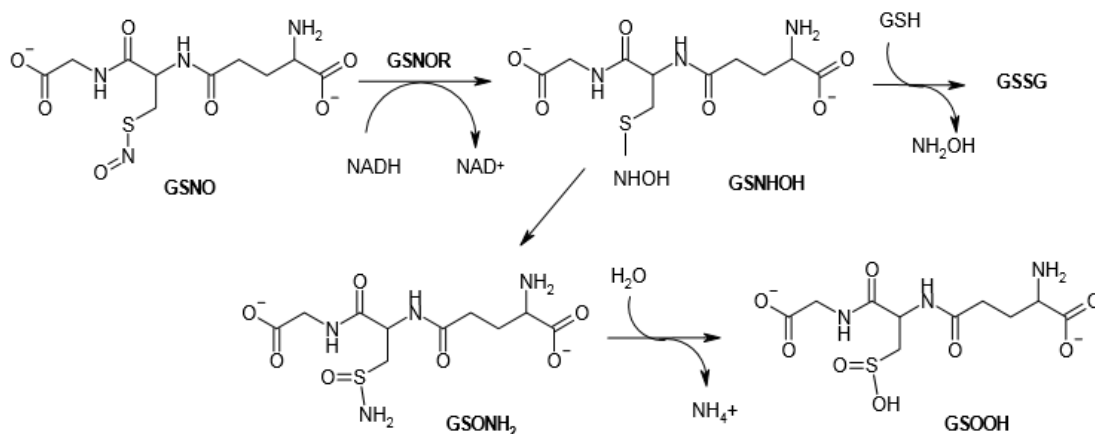
2.3.3.1.1 Funkční a strukturní vlastnosti rostlinné GSNOR

U rostlin má významnou úlohu v katabolismu GSNO enzym S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR, EC 1.1.1.284) (Benhar *et al.*, 2009), patřící do rodiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3; EC 1.1.1.1) (Staab *et al.*, 2008). Tento enzym, dříve označovaný jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (GSH-FALDH EC 1.2.1.1.), byl v pozdějších letech přejmenován jako S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284) z důvodu nalezení jiného reakčního mechanismu. Primárním substrátem enzymu totiž není GSH, ale spontánně vznikající produkt syntézy GSH a formaldehydu, S-(hydroxymethyl)glutathion (HMGS) (Obr. 4).



Obr. 4 Katalýza oxidace S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGSH), aduktu redukovaného glutathionu (GSH) a formaldehydu (CH₂O) na S-formylglutathion prostřednictvím aktivity alkoholdehydrogenasy 3 (ADH3). Převzato z Jensen *et al.* (1998).

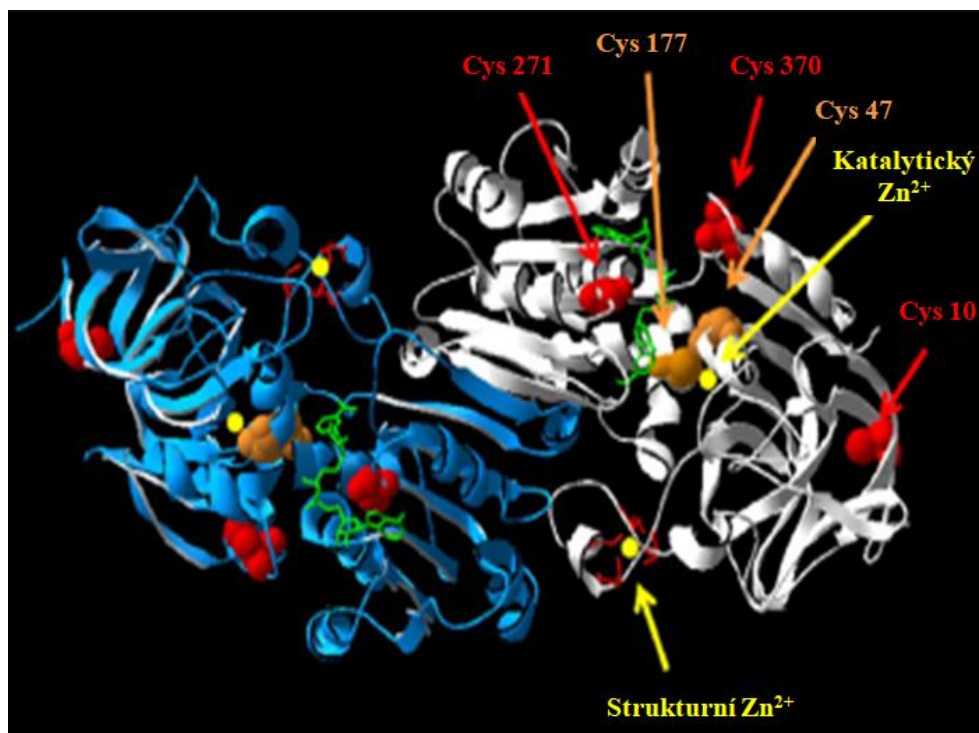
Nyní se v literatuře používá označení enzymu S-nitrosoglutathionreduktasa (zkratka GSNOR), protože se za fyziologicky nejvýznamnější považuje katalýza NADH-dependentní redukce GSNO za vzniku oxidovaného glutathionu (GSSG) a amoniaku (Obr. 5). Redukcí GSNO se tvoří nestabilní meziprodukt N-hydroxysulfinamid (GSNHOH). Pro vznik výsledného produktu je klíčová koncentrace GSH. V případě nadbytku GSH vznikají hydroxylamin (NH₂OH) a GSSG. Pokud je ovšem koncentrace GSH nízká, vzniká glutathionsulfinamid (GSONH₂). Dále se za účasti vody a v kyselém prostředí vytváří kyselina glutathionsulfinová (GSOOH) a amoniak (NH₃) (Jensen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001; Staab *et al.*, 2008).



Obr. 5 GSNOR katalyzuje NADH-dependentní redukci S-nitrosoglutathionu (GSNO) na nestabilní intermediát N-hydroxysulfinamid (GSNHOH). GSNHOH může reagovat s redukovaným glutathionem (GSH) za tvorby glutathiondisulfidu (GSSG) a odštěpí se hydroxylamin (NH₂OH). Druhou možností je spontánní přeskupení GSNHOH na glutathionsulfinamid (GSONH₂). Za nízkého pH může probíhat hydrolyza GSONH₂ na kyselinu glutathionsulfinovou (GSOOH) a amoniak. Konečný produkt tedy závisí na koncentraci GSH. Převzato z Jensen *et al.* (1998).

Rostlinná GSNOR se skládá ze dvou monomerů (Obr. 6). Aktivní místo je vysoce konzervované a nachází se ve středu mezi velkou katalytickou doménou a menší nekatalytickou doménou, zahrnující vazebné místo pro koenzym. Katalytická doména se skládá z residuí 1-177 a 327-379. Malý NAD⁺-vazebný Rossmannův záhyb je složený z residuí 178-326 a představuje hlavní část styčné plochy podjednotky. Dimer se vytváří díky interakci dvanácti pseudo-kontinuálních beta-listů, které představují podstatnou část domény vázající koenzym. Homodimerní struktura obsahuje také dva zinečnaté ionty, umístěné ve velké katalytické doméně (Obr. 6). Jeden zastává funkci strukturální a je navázán na čtyři cysteinová residua (Cys99, Cys102, Cys105 a Cys113). Druhý katalytický zinek je vázán na Cys177, Cys47, His69 a Glu70 nebo hydroxidový aniont vody, v závislosti na specifickém komplexu. Vazba koenzymu je spojena s pohybem atomu zinku v aktivním místě a to změnou jeho koordinace (Kubienová *et al.*, 2013).

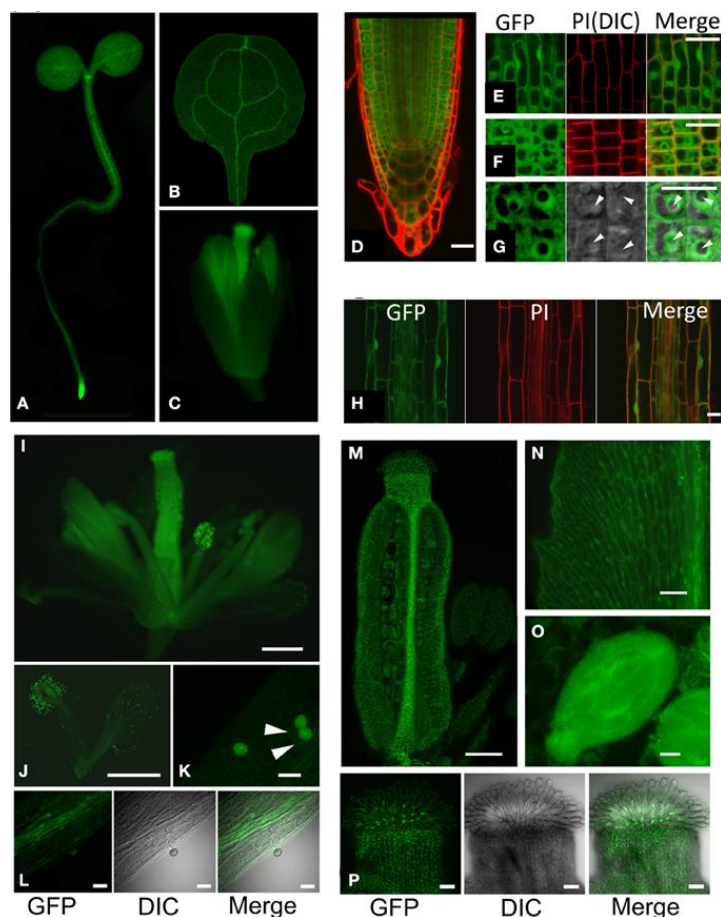
Díky bioinformatické studii Xu *et al.* (2013), zaměřené na analýzu konzervovaných a zinek-koordinujících cysteinových residuí proteinu GSNOR z *Arabidopsis* (*AtGSNOR*), bylo odhaleno, že residua Cys10, Cys271, Cys370 mohou mít významnou funkci v regulaci aktivity tohoto enzymu (Obr. 6). Dále ve studii Frungillo *et al.* (2014) poukázali na inhibici aktivity *AtGSNOR1*, ke které došlo po inkubaci s donorem NO. Metodou biotin-switch rovněž detekovali S-nitrosylaci *AtGSNOR1 in vitro* a také *in vivo*. Nedávná studie Guerra *et al.* (2016) potvrdila s využitím hmotnostní spektrometrie, že u *AtGSNOR1* dochází k S-nitrosylaci residuí Cys10, Cys271, Cys370. Využitím farmakologických přístupů s donory NO bylo zjištěno, že dochází k reversibilnímu snížení aktivity rostlinné GSNOR v reduktasovém i dehydrogenasovém modu (Tichá *et al.*, 2017). Kovacs *et al.* (2016) ve své studii popisují inhibici aktivity *AtGSNOR1* díky oxidačním modifikacím Cys47, Cys177 a Cys271 (Obr. 6), a to po přidavku H₂O₂ *in vitro* a také *in vivo* u rostlin *Arabidopsis* kultivovaných na médiu obsahujícím herbicid paraquat. Podobná studie, charakterizující posttranslační regulace rostlinných GSNOR *in vitro*, potvrdila částečnou reverzibilní inhibici reduktasové i dehydrogenasové aktivity oxidačními modifikacemi cysteinových residuí (Tichá *et al.*, 2017).



Obr. 6 Struktura GSNOR z *Arabidopsis* (PDB 3UKO). Podjednotky dimeru jsou znázorněny modře a šedě. Cysteinová residua, představující cíle nitrosylačních a oxidačních modifikací, jsou znázorněna červeně (Cys10, Cys271, Cys370) a oranžově (Cys47, Cys177). Navázaný kofaktor NAD^+ ve vazebné kapse pro substrát je znázorněn zeleně. Katalytický a strukturální zinek je znázorněn žlutě. Převzato z Lindermayr (2017).

2.3.3.1.2 Úloha GSNOR ve vývoji rostlin

U rostlin byl enzym GSNOR studován poprvé u *Arabidopsis thaliana*, kde byl v genomu nalezen gen kódující *AtGSNOR1* v jedné kopii (Martínez *et al.*, 1996). Ve studii Xu *et al.* (2013) byla lokalizována GSNOR u *Arabidopsis* pomocí techniky GFP (Obr. 7). Fluorescence byla pozorována v průběhu vývoje semene a květů (Obr. 7A-C). Intenzivní signál byl detekován v apikálním meristému a kořenové špičce semenáčků (Obr. 7A, D), avšak nejvyšší intenzita byla pozorována v kotyledonu, hypokotylu, kořene a okvětních lístcích (Obr. 7A-C). Detailní pozorování kořenové špičky (Obr. 7E-G) ukazuje distribuci GSNOR ve všech typech kořenových buněk s difuzní lokalizací v jádře a cytosolu, avšak kromě jádérka. To je také patrné v elongační zóně kořene, i když jádérka jsou v těchto buňkách podstatně menší (Obr. 7H). Signál odpovídající GSNOR-GFP byl také detekován v jednotlivých částech květu (Obr. 7): okvětních lístcích (I), tyčinkách a pestíku (J), pylu (K), prašníku a nitce (L), vajíčkách (M), koruně (N), semeni v zárodečném stádiu embrya (O) a blizně (P).



Obr. 7 *GSNOR* je exprimována v různých orgánech a vývojových stádiích *Arabidopsis*. Lokalizace *GSNOR* byla pozorována u rostlin transformovaných *GSNOR::GSNOR-GFP* v pozadí *hot5-2*. Všechny rostliny byly homozygotní pro *GSNOR::GSNOR-GFP* transgen, s výjimkou rostlin na fotkách (I-K). (A) Celá rostlina. (B) Kotyledon. (C) Květ. (D) Distribuce a lokalizace *GSNOR-GFP* v buňkách kořenových špiček v optickém průřezu uprostřed kořene. (E) *GSNOR-GFP* lokalizace v kořenových epidermálních buňkách. (F, G) Optický průřez lokalizace *GSNOR-GFP* v buňkách kořenového kortexu při dvou různých zvětšeních. Šípky: jádro. PI, barvení propidium jodidem; DIC, Nomarského interferenční kontrast. (H) *GSNOR-GFP* lokalizace v elongační zóně kořenů. Úsečka: 20 μm (D-H). (I-P) Lokalizace *GSNOR-GFP* v květu (I), tyčinkách a pestíku (J), pylu (K), prašníku a nitce (L), vajíčkách (M), koruně (N), semeni v zárodečném stádiu embrya (O), blizně (P). Šípky v (K) označují pyl u mutantu *hot5-2*, které neexprimují *GSNOR-GFP* kvůli segregaci transgenu u heterozygota. Úsečky: 500 μm (I, J); 200 μm (M); 40 μm (K, L, N-P). Převzato z Xu *et al.* (2013).

Mutace genu *GSNOR1* mají různé účinky na vývoj rostliny projevující se současně ve fenotypu několika různých znaků, a to zakrnělým růstem, poruchami větvení stonku a trichomů, poruchami kvetení a sníženou produkcí semen (Feechan *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Holzmeister *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2015). Morfologické defekty mutantu *gsnor1-3* u *Arabidopsis* s funkční mutací *GSNOR1* jsou zobrazeny na Obr. 8. Pro mutantní linii *gsnor1-3* je charakteristická ztráta *GSNOR* aktivity, zvýšená hladina RSNO, nižší vzrůst

(Obr. 8A), poruchy vývoje laterálních kořenů (Obr. 8B) a rozvětvení nadzemní části (Obr. 8C) i snížená plodnost (Obr. 8D, 8E) (Feechan *et al.*, 2005). Podobné defekty byly nalezeny rovněž u *Arabidopsis hot5-2* a *par2-1*, mutantních linií, které nesou dvě různé alely *gsnor1* (Lee *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013).



Obr. 8 Vývojové poruchy mutantu *gsnor1-3*. (A) Ztráta apikální dominance. (B) Krátký primární kořen a ztráta laterálních kořenů (bílé šipky). (C) Snížení plodnosti – nízká produkce semen a zkrácené šešule. (D, E) Fenotyp květů – prodloužený pestík a zkrácené nitky u tyčinek. Úsečka 1 mm. Převzato z Shi *et al.* (2015).

2.3.3.1.3 Úloha GSNOR v obranných reakcích rostlin

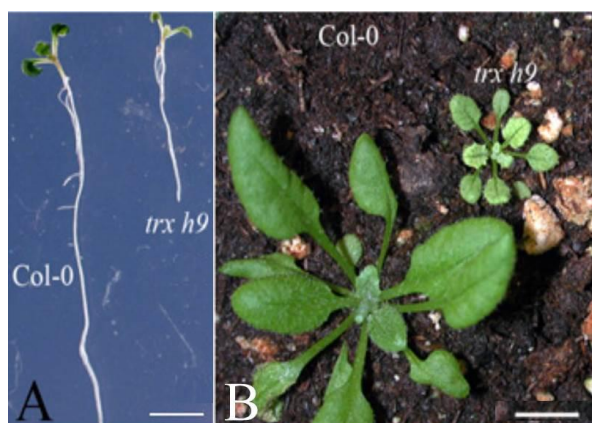
NO a RSNO jsou považovány za klíčové molekuly signálních drah podílející se na imunitní odpovědi jak u rostlin, tak i u živočichů. Předpokládá se, že vlivem katabolismu GSNO kontrolovaného GSNOR dochází ke změnám hladin RSNO, které mohou vyvolávat obranné reakce na patogeny u rostlin stejně jako u živočichů (Malik *et al.*, 2011). Několik publikací naznačilo, že regulace hladiny RSNO *in vivo* prostřednictvím GSNOR aktivity je významně zapojena v obranných mechanismech u rostlin při působení biotického i abiotického stresu (Feechan *et al.*, 2005; Rustérucchi *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Kubienová *et al.*, 2014; Tichá *et al.*, 2018).

V případě biotického stresu vznikly na základě výsledků několika publikací rozporuplné hypotézy. Studie Feechan *et al.* (2005) popisuje úlohu *AtGSNOR1* jako regulátoru hladiny RSNO - pokles aktivity *AtGSNOR1* a nárůst hladiny RSNO vedou ke snížení nehostitelské rezistence u *Arabidopsis* infikovaných bakterií *Pseudomonas syringae*. Podobné změny aktivity GSNOR a obsahu RSNO byly zaznamenány u slunečnice s rezistencí vůči houbovému patogenu *Plasmopara halstedii* (Chaki *et al.*, 2009). Naopak Rustérucchi *et al.* (2007) popisují zvýšení rezistence vůči biotrofnímu patogenu *Peronospora parasitica* u transgenních rostlin *Arabidopsis* se sníženou expresí *AtGSNOR1*. Byly zaznamenány zvýšené hladiny RSNO, došlo ke konstitutivní aktivaci obranného genu *PR-1* a zvýšení systémově získané rezistence (SAR). Naopak u rostlin s nadexpresí *AtGSNOR1* byla detekována snížená SAR. Tyto výsledky naznačují, že po rozpoznání patogenu dochází k přechodnému snížení aktivity GSNOR se současným nárůstem hladiny RSNO i GSNO. Výsledky studia zapojení GSNOR v obranných mechanismech u kulturních i divokých genotypů lociky salátové (*Lactuca* spp.) podporují hypotézu, že GSNOR hraje regulační úlohu pro zmírnění nitrosačního stresu projevujícího se zvýšenými hladinami GSNO resp. RSNO, k nimž dochází v rané fázi rozpoznání biotrofních patogenů (Tichá *et al.*, 2018).

2.3.3.2 Thioredoxinreduktasa

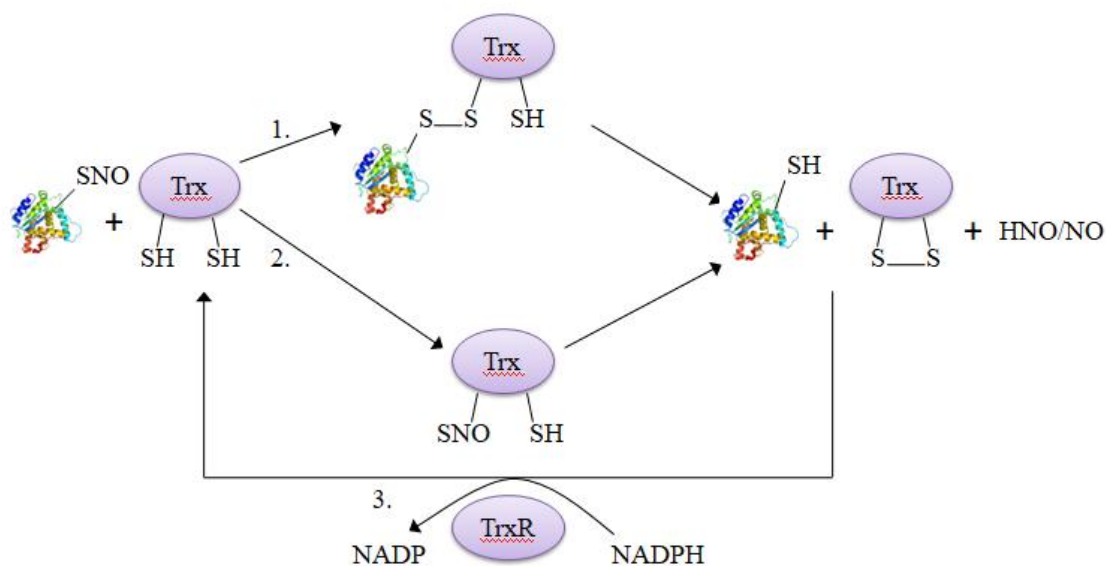
V místech, kde není odbourávání GSNO pod kontrolou GSNOR, enzymu podílejícího se nepřímo na regulaci metabolismu proteinových RSNO, se u rostlin uplatňuje thioredoxinový systém tvořený thioredoxinreduktasou (TrxR, EC 1.8.1.9), thioredoxinem (Trx) a NADPH (Sengupta a Holmgren, 2012).

Trx jsou malé proteiny (~12 kDa), které zprostředkovávají oxido-redukční reakce: oxidaci thiolových skupin za vzniku disulfidových vazeb. Trx patří do komplexní rodiny regulačních proteinů sestávajících z nejméně šesti odlišných typů v rostlinách, a to: *f*, *m*, *x*, *y*, *h* a *o*. V genomu *Arabidopsis* se nachází celkem 19 genů kódujících Trx, a to v cytosolu, chloroplastu či mitochondriích (Meyer *et al.*, 2002). Trx-*h* představují největší strukturně a biochemicky rozmanitou rodinu Trx (Gelhaye *et al.*, 2004). V cytosolu *Arabidopsis* bylo nalezeno 8 genů kódujících Trx-*h* a 2 geny kódující enzym NADPH-dependentní TrxR (Laloi *et al.*, 2001). Trx-*h* hrají významnou roli během klíčení a časného vývoje rostlin (Kobrehel *et al.*, 1992; Besse *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 2002; Marx *et al.*, 2003) a v mezibuněčné komunikaci (Meng *et al.*, 2010). U *Trx-h9* mutantních linií *Arabidopsis* byl identifikován fenotyp trpasličích rostlin s krátkými kořeny a listy s výraznou chlorózou (Obr. 9) (Meng *et al.*, 2010). U rostlin *Arabidopsis* infikovaných *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* došlo k významnému zvýšení exprese *TRX-h5* (Laloi *et al.*, 2004), zatímco exprese genu *TRX-h3* byla konstitutivní (Reichheld *et al.*, 2002).



Obr. 9 Fenotyp mutantu *Arabidopsis Trx-h9* u linie Salk_08660. (A) 7denní semenáčky rostoucí na MS médiu. (B) 35denní rostliny. Úsečka: 1 cm. Převzato z Meng *et al.* (2010).

Pro funkci Trxs je důležité aktivní místo obsahující tzv. dithiolový motiv (CXXC) (Obr. 10). Pokud je Trx v redukované formě (Trx-SH₂), dochází k narušení disulfidického můstku a vzniká oxidovaná forma (Trx-S₂). Následně dochází k redukci Trx-S₂ na Trx-SH₂ díky aktivitě NADPH-dependentní TrxR (Obr. 10) (Benhar *et al.*, 2008). V závislosti na oxidačním stavu se tedy Trxs účastní jak denitrosylace, tak i transnitrosylace cílových proteinů (Wu *et al.*, 2011; Sengupta a Holmgren, 2012).



Obr. 10 Schéma denitrosylace zprostředkované thioredoxinovým systémem. 1. Tvorba intermolekulárního disulfidového meziproduktu, kde je Trx kovalentně vázán na substrátový protein přes disulfidový můstek. 2. Transnitrosační mechanismus, kde je Trx přechodně S-nitrosylovaný. Redukovaný Trx se regeneruje působením thioredoxinreduktasy (TrxR) za použití NADPH jako donoru elektronů. Upraveno podle Liu *et al.* (2001).

U živočichů se předpokládá, že u většiny malých S-nitrosylovaných proteinů (20–30 kDa) dochází k denitrosylaci thioredoxinovým systémem (Sengupta *et al.*, 2007). Specifičnost systému Trx1/TrxR byla popsána pro denitrosylaci kaspasy-3 (EC 3.4.22.56), kaspasy-9 (EC 3.4.22.62), proteinové tyrosinfosfatasy (EC 3.1.3.48) či glycerinaldehydfosfát-3-dehydrogenasy (EC 1.2.1.12.). Zajímavé je, že inhibicí Trx1/TrxR systému došlo ke zvýšení S-nitrosylace u kaspasy-3 v lidských B-lymfocytech a stimulačních makrofágových buňkách (Behnar *et al.*, 2008).

Poznatky o denitrosylaci zprostředkované Trx/TrxR jsou u rostlin omezené, avšak bylo prokázáno zapojení tohoto systému na regulaci redoxní homeostázy v obranné reakci *Arabidopsis* po infekci *P. syringae* (Tada *et al.*, 2008). Kneeshaw *et al.* (2014) ve své studii potvrdili zapojení rostlinné TrxR *h-5* v denitrosylaci proteinů během imunitní odpovědi. TrxR *h-5* katabolizuje proteinové RSNO, které navíc může selektivně rozlišit (Kneeshaw *et al.*, 2014). Ve studii Zaffagnini *et al.* (2013) uvádí, že GSH může specificky zprostředkovat denitrosylaci GAPDH u *Arabidopsis*, přičemž TRXh5 nevykazuje schopnost denitrosylace tohoto proteinu. Procesy denitrosylace v rostlinách jsou tedy velice specifické a selektivní reakce (Begara-Morales a Loake, 2016).

2.3.4 Role S-nitrosylace v regulaci obranných reakcí rostlin

Proteomickými metodami byla odhalena řada signálních, stresových a regulačních proteinů, antioxidantních enzymů a proteinů cytoskeletu jako možných cílů S-nitrosylace *in vivo* u *Arabidopsis* (Lindermayr *et al.*, 2005). Později se detailněji charakterizovaly některé specifické proteiny, a to zejména metabolické enzymy zapojené v obranných mechanismech (Lindermayr *et al.*, 2005; Lindermayr *et al.*, 2006; Belenghi *et al.*, 2007; Romero-Puertas *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2011; Serrato *et al.*, 2018;).

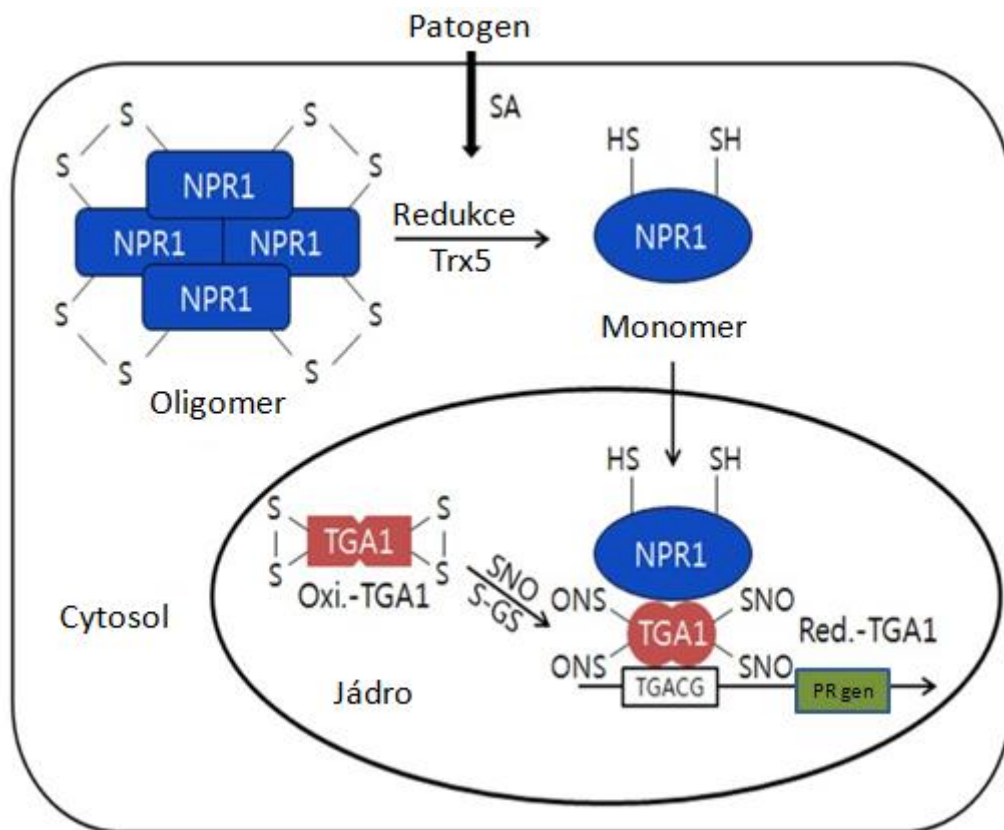
NADPH-oxidasa D (EC 1.6.3.1, též označovaná jako Respiratory Burst Homolog D, RBOHD) představuje důležitý enzymový zdroj produkce ROS lokalizovaný v plasmatické membráně rostlinných buněk. Je známo, že NADPH-oxidasa je S-nitrosylována během hypersenzitivní reakce (HR) na Cys 890, což snižuje jeho aktivitu a tím i produkci ROS (Yun *et al.*, 2011). V pozdějších stádiích HR tato redoxní modifikace působí jako negativní zpětná vazba, která omezuje rozsah buněčné smrti v důsledku snížené produkce ROS (Yun *et al.*, 2011).

Dalším enzymem podléhajícím S-nitrosylaci je GAPDH (EC 1.2.1.12), důležitý enzym glykolýzy, podílející se na přeměně glyceraldehyd-3-fosfátu na 1,3-bisfosfoglycerát. Jeho isoformy se vyskytují v jádře, plastidech a cytosolu (Anderson *et al.*, 2004). V jádře rostlinných buněk plní úlohu přenosu molekuly NO na cílové proteiny (Wawer *et al.*, 2010). Aktivita cytosolární GAPDH je snížena prostřednictvím S-nitrosylace Cys155 a Cys159 v aktivním místě (Lindermayr *et al.*, 2005; Holtgreffe *et al.*, 2008).

Studium S-nitrosylace během patogeneze *P. syringae* pv. *tomato* u *Arabidopsis* potvrdilo vztah mezi S-nitrosylací enzymu Rubisco (EC 4.1.1.39) a regulací jeho aktivity v obranné reakci (Maldonado-Alconada *et al.*, 2011). Je známo, že proteiny fotosystému II a dalších chloroplastových proteinů jsou modulovány během obranných reakcí (Jones a Dangl, 2006; Serrano *et al.*, 2016). Nedávná studie ukázaly, že hrachová fruktosa-1,6-bisfosfatasa (cFBP1, EC 3.1.3.11) je endogenně S-nitrosylovaná a pomocí *in vivo* experimentů bylo zjištěno, že S-nitrosylace cFBP1 se vyskytuje pouze během světelné fáze fotosyntézy. Bylo prokázáno, že cFBP1 je inaktivován S-nitrosylací Cys153 spontánně vedoucí k tvorbě regulačního disulfidového můstku (Serrato *et al.*, 2018).

Aktivita peroxiredoxinu II E (PrxII E, EC 1.11.1.15), antioxidačního enzymu vyskytujícího se ve stromatu chloroplastů, je inhibována S-nitrosylací Cys52 a Cys172. Tato inhibice vede v rostlině k poklesu odbourávání ONOO⁻, který vzniká převážně během obranných odpovědí rostliny rychlou reakcí molekuly NO a O₂^{-•} (Sakamoto *et al.*, 2003; Romero-Purtas *et al.*, 2007; Gaupels *et al.*, 2011).

S-nitrosylace je rovněž regulátorem biosyntézy i signálních drah kyseliny salicylové (SA) (Feechan *et al.*, 2005), kde klíčovou roli hraje S-nitrosylace/denitrosylace proteinu NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis-Related Protein 1). Neaktivní oligomerní forma NPR1 se nachází v cytosolu. Po infekci patogenem dochází k redoxní změně působením SA, což způsobí rozpad disulfidických můstků ve struktuře oligomeru a vzniká monomer, který je translokován do jádra (Obr. 11). V jádře se naváže na specifický transkripční faktor TGA1 a je spuštěna exprese obranných PR genů (Pathogenesis-Related) (Obr. 11). V inaktivní struktuře TGA1 jsou přítomny čtyři cysteinová residua, tvořící disulfidické můstky. V přítomnosti NPR1 dochází ke zvýšení vazebné schopnosti TGA1 přerušením disulfidické vazby mezi Cys172 a Cys287, přičemž tato residua dále podléhají S-nitrosylaci (SNO) nebo glutathionylaci (S-GS) (Obr. 11).



Obr. 11 Regulace rostlinné imunitní odpovědi S-nitrosylací/denitrosylace po napadení patogenem. Za normálních podmínek v cytosolu vytváří NPR1 strukturu inaktivního oligomeru s intermolekulárními disulfidovými vazbami. Při napadení patogenem však NPR1 mění svou strukturu na aktivní formu monomeru redukcí intermolekulárních můstků prostřednictvím thioredoxinu typu *h5* (*AtTrx-h5*). Poté je NPR1 translokován do jádra a interaguje s TGA1 transkripčním faktorem, který může indukovat expresi obranného *PR* genu. TGA1 je v normálním stavu neaktivní a nachází se v oxidované formě s intramolekulárními disulfidovými vazbami v jádře. Při stresovém stavu dochází k redukci TGA1, interakci s NPR1 a může zvýšit svou vazebnou aktivitu s DNA pomocí S-nitrosylace (SNO). Upraveno podle Moore *et al.* (2011).

2.3.5 Metody stanovení S-nitrosothiolů

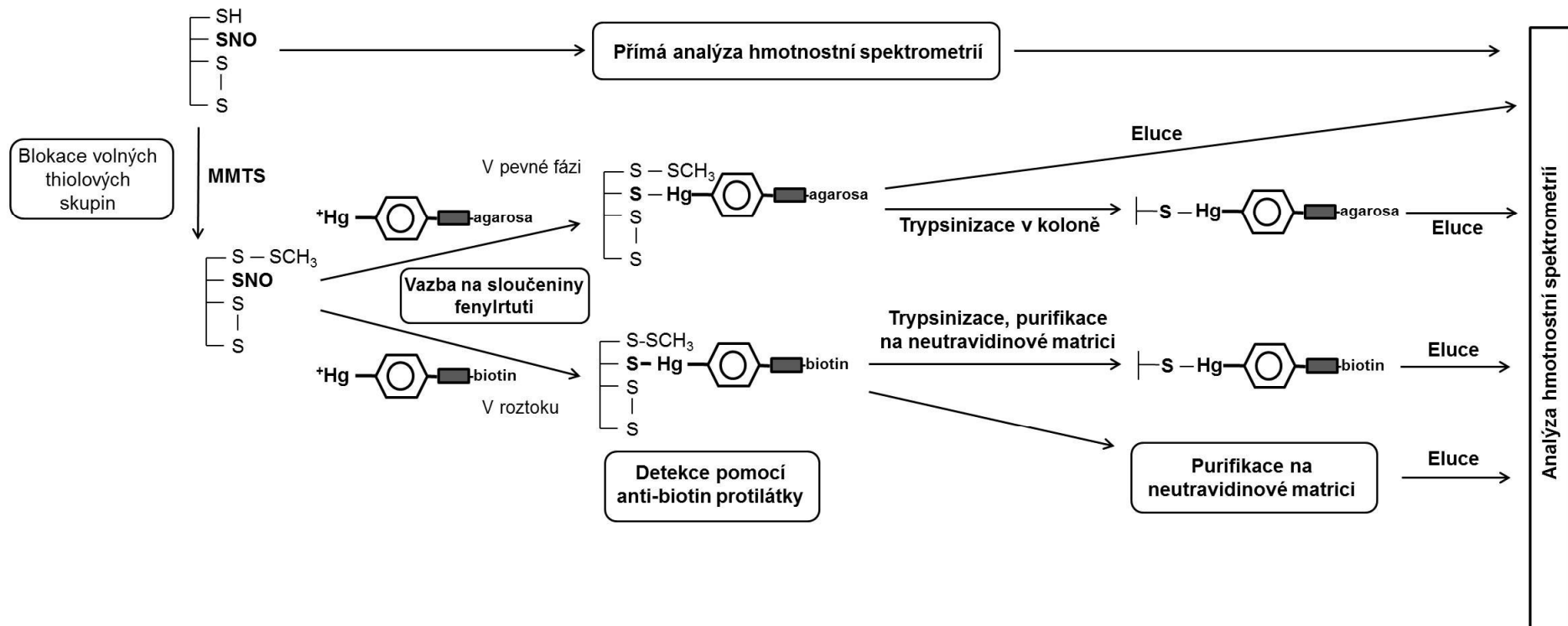
U RSNO se nejprve určuje jejich celkový obsah, což je součet koncentrací nízkomolekulárních a proteinových S-nitrosothiolů. Pomocí řady experimentálních metod jsou analyzovány RNS (NO/NO_x), které jsou produktem rozkladu RSNO, ať už v přítomnosti iontů přechodných kovů nebo při fotolýze (Diers *et al.*, 2014). Mezi metody detekující RNS patří fluorescenční metody, kde se využívají činidla 4,5-diaminofluorescein nebo 2,3-diaminonafalen k detekci RNS v nanomolárním množství (Kostka a Park, 1999). Dále se využívá chemiluminiscenční metoda, která je velice citlivá, protože plynný NO je při reakci z části v excitovaném stavu sloučen s ozónem za vzniku NO₂. Množství NO je přímo úměrné fotonům, které se uvolňují při přechodu excitovaných molekul do základního stavu (Gow *et al.*, 2007). Moderní přístroje obsahují fotonásobiče, které jsou schopny zachytit až jednotlivé fotony (Marquette a Blum, 2008) a samotná chemiluminiscence umožňuje měřit až nanomolární koncentrace S-nitrosothiolů za použití optimalizovaných redukčních činidel (Griveau a Bedioui, 2013). Další metody detekce NO představují kolorimetrická Savillova metoda, elektrochemické metody či elektronová paramagnetická (spinová) rezonance (D'Alessandro *et al.*, 2013; Diers *et al.*, 2014).

Mezi skupinou metod sloužících k analýze S-nitrosylovaných proteinů se základním standardem stala metoda tzv. biotinového přepínače (biotin-switch technique, BST) (Obr. 12), která spočívá v označení nitrosovaných cysteinových zbytků molekulou biotinu (Jaffrey *et al.*, 2001). BST v prvním kroku začíná navázáním thiomethylové skupiny činidla S-methylmethanthiosulfátu (MMTS) na nemodifikované cysteinové thioly v molekule, které se tímto tzv. zablokují. Přičemž nadbytek činidla je poté odstraněn acetonem. Reakce pokračuje redukcí –SNO skupiny na thiolovou skupinu (-SH) pomocí askorbátu (Huang *et al.*, 2006; Landino, 2008) nebo kyseliny sinapové (3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina), která by správně neměla poškozovat disulfidové vazby v proteinech, což bylo popsáno u askorbátu (Kallakunta *et al.*, 2010). Na závěr jsou –SH skupiny označeny specifickým modifikačním činidlem biotinem-HPDP (N-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamid). Pomocí metody Western blot, kde se používá anti-biotin protilátka, se detekují proteiny značené biotinem nebo se pro jejich detekci využije purifikace prostřednictvím afinitní chromatografie avidin-agarosovou maticí, kdy se purifikované S-nitrosylované

proteiny mohou identifikovat hmotnostní spektrometrií (Jaffrey *et al.*, 2001) nebo imunochemicky detekovat s využitím specifické protilátky proti danému proteinu.

U dalších metod lze použít také jiné značení než biotinem (Obr. 12). Konkrétně se jedná o metodu „His-tag switch“, kde reagují redukované cysteinové thioly s alkylovaným peptidem, na které je navázána hexahistidinová kotva (I-CH₂-CO-Gly-Arg-Ala-His₆). Identifikace označených proteinů poté probíhá nejčastěji prostřednictvím specifické protilátky safinitou k histidinové kotvě nebo purifikací zprostředkovanou chelatační chromatografií. Díky možnosti histidinové kotvy se snadno určují proteiny s navázaným cysteinem pomocí hmotnostní spektrometrie (Camerini *et al.*, 2007).

Metoda SNOSID (S-Nitrosothiols-Site Identification) funguje na podobném principu jako BST (Obr. 12). Zde dochází před afinitní purifikací ke štěpení biotinylových proteinů, což dává peptidům možnost efektivněji se navázat na neutravidinovou matici (Hao *et al.*, 2006). Metoda SNO-RAC (S-Nitrosothiols Resin-Assisted-Capture) je typická zachytáváním S-nitrosylovaných proteinů na matici s imobilizovanými rtuťnatými ionty navázanými na agarosové kuličky nebo přímo na biotin, čímž se může vynechat redukce askorbátem. Je nutné podotknout, že oproti klasické BST je SNO-RAC metoda významně účinnější pro purifikaci vysokomolekulárních proteinů (Forrester *et al.*, 2009). V závěru stojí za zmínění vysoce citlivá metoda 2D-SNO-DIGE (2D-Difference Gel Electrophoresis), která umožňuje porovnávat dva různé vzorky v jednom gelu prostřednictvím fluorescenčních zobrazovacích technik (Chouchani *et al.*, 2010).



Obr. 12 Metoda biotin switch (BST) a modifikované metody pro detekci a identifikaci proteinových S-nitrosothiolů. V první kroku se nemodifikované cysteinové zbytky zablokovaly činidlem S-methylmethaniosulfátem (MMTS). V druhém kroku se S-nitrosovaná cysteinová residua „označila“ činidlem biotin-HPDP (zde vazbou na sloučeniny fenylrtuti) a následně detekovala metodou Western blot za pomoci anti-biotin protilátky. Na závěr proběhla analýza hmotnostní spektrometrií, buď přes přímou eluci nebo přes trypsinizaci v koloně či přes purifikaci na neutravidinové matrici. Převzato z Jaffrey *et al.* (2001).

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Chemikálie

AppliChem (Německo): AEBSF – inhibitor proteas; dodecylsírán sodný; hovězí sérový albumin frakce V.

Acros organics (Belgie): redukovaný glutathion, Triton X-100.

Bio-Rad (USA): bromfenolová modř; Coomassie Brilliant Blue R250; marker molekulové hmotnosti Precision Plus DualXtraStandards.

Biotech (Nizozemsko): MS médium.

Lachema (Česká republika): dithiotreitol; hydroxid sodný; kyselina chlorovodíková; chlorid hořečnatý.

Lach-Ner (Česká republika): ethanol; kyselina chlorovodíková; methanol.

Sigma-Aldrich (Německo): aceton; agar; akrylamid; askorbát; bisakrylamid; PTIO; dimethylsulfoxid; dusitan sodný; ethylendiamintetraoctová kyselina; glycerol; glycin; L-cystein; MES hydrát; nikotinamindinukleotid redukovaný; nikotinamindinukleotidfosfát redukovaný; N, N'- tetramethylendiamin; Octová kyselina; Ponceau S; primární monoklonální myši anti-biotin protilátka konjugovaná salkalickou fosfatasou; sacharosa; seleno-L-cystin; S-methylmethanthiosulfonát; sulfanilamid.

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

Unilever (EU): Savo.

3.1.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA); blotovací systém Mini PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio-Rad, USA); centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo); destička Take3 Multi-Volume plate (BioTek, USA); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); dokumentační zařízení Gel-Doc (Bio-Rad, USA); eksikátor (Kavalierglass, Česká republika); elektroforetický systém Mini PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); inkubátor EN120 (Nüve, Turecko); kolonky NAP-5 (GE Healthcare, USA); laminární box (Schoeller Instruments, ČR); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový

reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA); nitroceluloseová membrána 0,45 μm (Bio-Rad, USA); třepačka 3D (BioSan, Litva); ultracentrifuga CS150NX (Hitachi Koki, Japonsko); vortex (Stuart, UK); zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (Bio-Rad, USA).

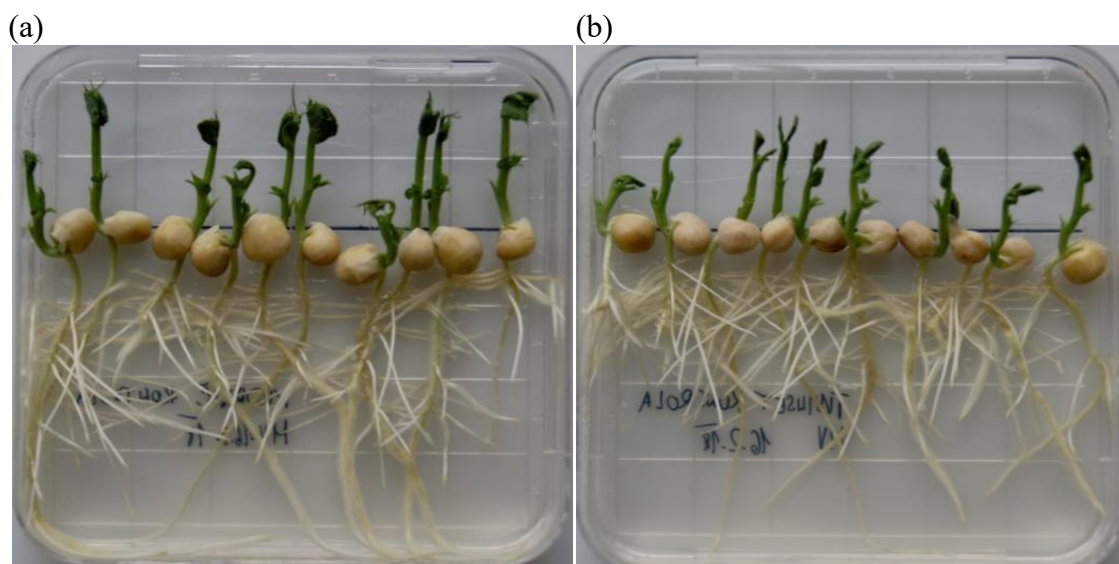
3.1.3 Rostlinný materiál

Pro studium regulace metabolismu RNS a ROS S-nitrosylací byly použity dva kultivary hrachu setého: *Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset s odlišnou odolností na některé hospodářsky významné patogeny, které způsobují rozsáhlé škody ve výnosech. Kultivar Twinset je rezistentní vůči padlí hrachovému, fusáriovému vadnutí a viru mozaiky hrachu (katalog výrobků Neoseeds, 2018).

Semena byla sterilizována 2 min v 70% ethanolu, poté 30 min na třepačce v 100% roztoku Sava (Savo Originál, Unilever) a 3x promyta sterilní vodou. Následně se semena nechala pro nabobtnání po dobu 24h v 50ml plastové zkumavce naplněné sterilní vodou. Poté se do sterilních čtvercových Petriho misek vložilo 6 vrstev sterilního filtračního papíru, který se zalil zhruba 20 ml sterilní vody. Do každé misky se rozmístilo 20 nabobtnaných semen tak, aby měly dostatek prostoru ke klíčení a uchovaly se ve tmě zhruba 48h při 25 °C. Po 48 h se do čtvercových Petriho misek nalilo 60 ml MS média s přidávanými testovanými látkami o určité koncentraci (Tab. 1). Po ztuhnutí MS média v šikmé poloze bylo vyseto pomocí pinzety (ve výšce 5 cm pod okraj) v jedné řadě 10 naklíčených semen hrachu setého. Kontrolní MS médium neobsahovalo přidané látky. Petriho misky s vysetými semeny byly umístěny v šikmé poloze na 7 dní do fytotronu při 25 °C. Po 7 dnech kultivace byly rostliny zpracovány pro následné experimenty (Obr. 13). Byla oddělena kořenová část od nadzemní části, vše se zvlášť zvažilo a zamrazilo při -80°C.

Tab. 1. Testované látky přidané do MS média.

Typ sloučeniny	Funkce sloučeniny	Množství přidaného roztoku do MS média	Koncentrace zásobního roztoku	Finální koncentrace v MS médiu
GSNO	Donor NO	120 μl	50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
PTIO	Lapač NO	24 μl	250 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$



Obr. 13 Studované kultivary hrachu setého (*Pisum sativum*) rostoucí na MS médiu bez testovaných modulátorů: (a) cv. Kudrnáč, (b) cv. Twinset.

3.1.4 Příprava pevného MS média k výsevu semen

Připravené MS médium obsahovalo makroprvky, mikroprvky a organické látky podle práce Murashige a Skoog (1962) a vitamíny podle práce Gamborg *et al.* (1968).

Podle Tab. 2 byly naváženy příslušné látky, ke kterým bylo přidáno 800 ml destilované vody. Na pH metru bylo upraveno pH na hodnotu 6,1 a následně se objem média doplnil na 1000 ml. Poté se médium rozlilo do 250 ml skleněných nádob a bylo sterilizováno v autoklávu.

Tab. 2 Látky potřebné k přípravě 1 l MS média.

Látka	Množství (g/l)
MS médium s vitamíny	2,2
Agar	8
Sacharosa	5
MES hydrát*	0,0975

*MES hydrát = hydrát 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina

3.1.5 Příprava rostlinného materiálu

Zamražené kořeny a nadzemní části obou kultivarů hrachu byly v třecí misce homogenizovány tekutým dusíkem a za stálého chlazení byly smíchány s extrakčním pufrem v poměru 1 g rostlinného materiálu:2 ml extrakčního pufru (1:2). Po 10 minutách stání na ledu byl homogenát centrifugován 20 minut při 16 000 g a 4 °C. Supernatant byl poté přečištěn gelovou filtrací na kolonkách NAP-5, která byla nejprve ekvilibrována 3 x 2,5 ml 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0. Poté se na kolonku naněs 1 ml supernatantu a po vsáknutí vzorku 2 ml 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0. Následně byl 1 ml eluátu zachycen do mikrozkušavky uložené na ledu.

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

3.1.6 Spektrofotometrické stanovení aktivity

S-nitrosoglutathionreduktasy

Aktivita GSNOR byla určena spektrofotometricky podle metodiky uvedené v práci Kubienová *et al.* (2016), a to sledováním oxidace NADH při 340 nm během redukce GSNO. Do jamek mikrotitrační destičky se postupně napipetovalo 225 µl Tris-HCl pufru (20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0), 15 µl vzorku a 30 µl 2 mmol·l⁻¹ NADH, a to v trojím opakování. Do blanku se poté přidalo 30 µl deionizované vody a do vzorku 30 µl GSNO, čímž se reakce nastartovala. Okamžitě po přidání GSNO byla změřena absorbance při vlnové délce 340 nm po dobu 10 minut. Na závěr se pro stejný vzorek změřila absorbance při vlnových délkách 900 a 970 nm pro výpočet délky optické dráhy.

Příprava pevného S-nitrosoglutathionu (GSNO)

Nejdříve bylo naváženo 614 mg glutathionu, který se rozpustil ve 3 ml 1 mmol·l⁻¹ HCl vychlazené na ledu. Poté se za stálého míchání přidalo 138 mg NaNO₂ a směs se ponechala 40 minut na ledové lázni, kdy vznikla červená sraženina. Následně se sraženina odsála na Büchnerově nálevce a byla promyta 2 x 10 ml vychlazené deionizované vody, 2 x 10 ml vychlazeného acetonu a 2 x 10 ml vychlazeného diethyletheru. Na závěr se sraženina odstranila z filtračního papíru a byla usušena v exsikátoru ve tmě a poté uchována v -28 °C.

3.1.7 Spektrofotometrické stanovení aktivity thioredoxinreduktasy

Aktivita TrxR byla určena spektrofotometricky podle metodiky uvedené v práci Cunniff *et al.* (2014), a to sledováním oxidace NADPH při 340 nm během redukce selenocystinu. Do jamek mikrotitrační destičky se nanoslo 120 μl Tris-HCl pufru (20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,0), 50 μl vzorku a 40 μl 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADPH. Do blanku bylo přidáno 30 μl deionizované vody a reakce se nastartovala přidavkem 80 μl 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ selenocystinu (v 100% ethanolu) do vzorku. Ihned poté se změřila absorbance při vlnové délce 340 nm po dobu 10 minut. Na závěr se pro stejný vzorek změřila absorbance při vlnové délce 900 a 970 nm pro výpočet délky optické dráhy.

3.1.8 Spektrofotometrické stanovení aktivity NADPH-oxidasy

Protokol pro stanovení aktivity NADPH-oxidasy byl použit podle práce Kaundal *et al.* (2012).

Izolace membránové frakce

K 1 g rostlinného materiálu byly přidány 4 ml extrakčního pufru (extrakce 1:4). Následovala centrifugace 20 min při 16 000 g a 4 °C. Poté byly 2 ml supernatantu přeneseny do ultracentrifugačních kyvet, které byly vyváženy a následovala centrifugace po dobu 60 min při 203 000 g a 4 °C. V závěru přípravy vzorku byl ze zkumavek odstraněn supernatant a sediment obsahující membránovou frakci se rozsuspendoval v 100 μl ledového 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7,5).

Příprava extrakčního pufru

Podle Tab. 3 byl připraven extrakční pufr obsahující finální koncentrace 0,25 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ sacharosy, 0,05 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HEPES (pH 7,2), 3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT a 0,4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgCl_2 . Poté se do 100 ml extrakčního pufru navážilo 0,0632 g L-cysteinu (finální koncentrace 3,6 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 0,6 g PVP (finální koncentrace 0,6 %) a 17,5 mg AEBSF (finální koncentrace 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Tab. 3 Příprava extrakčního pufru.

Složka	Koncentrace	Objem (ml)
Sacharosa	1 mol·l ⁻¹	25
HEPES	1 mol·l ⁻¹	5
EDTA	0,25 mol·l ⁻¹	1,2
DTT	1 mol·l ⁻¹	0,1
MgCl ₂	0,4 mol·l ⁻¹	0,1

Stanovení aktivity NADPH-oxidasy

Aktivita NADPH-oxidasy byla stanovena na 96 jamkové mikrodestičce měřením absorbance při 492 nm podle práce Jiang a Zhang (2002).

Do jamek mikrodestičky bylo napipetováno 10 µl vzorku membránové frakce a 240 µl roztoku A (Tab. 4). Protože je membránová frakce schopna spontánně redukovat XTT i bez účasti NADPH a tato redukce by nebyla výsledkem NADPH-oxidase aktivity, byly vzorky měřeny spolu se dvěma slepými vzorky, aby se zabránilo negativnímu vlivu zmíněné redukce. První slepý vzorek obsahoval 10 µl deionizované vody spolu s 240 µl roztoku A (Tab. 4). Druhý slepý vzorek obsahoval 10 µl vzorku membránové frakce spolu s 240 µl roztoku B (Tab. 4). Následně se změřil nárůst absorbance při 492 nm po dobu 30 min. Jako finální slepý vzorek byl použit rozdíl změn absorbancí prvního a druhého slepého vzorku v čase 0-30 min od doby zahájení měření.

Tab. 4 Příprava roztoků A a B

Roztok	Deionizovaná voda (ml)	1 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (ml)	1 mmol·l⁻¹ XTT (ml)	1 mmol·l⁻¹ NADPH (ml)
A	3,875	0,625	6,250	1,250
B	5,125	0,625	6,250	-

3.1.9 Spektrofotometrické stanovení proteinových S-nitrosothiolů

Nejdříve se do mikrotitrační destičky nanese 195 μl činidla Griess B a 5 μl extraktu. Po 5 min inkubace bylo přidáno 100 μl činidla NED a po dalších 5 min inkubace byla změřena absorbance při 540 nm. Jako blank bylo použito 195 μl činidla Griess A, 5 μl deionizované vody a 100 μl činidla NED.

V závěru byla koncentrace S-nitrosothiolů odečtena z optimalizované lineární regrese, při které se změřila kalibrační řada standardů GSNO. Byly použity roztoky 1; 1,25; 2,5; 5; 10; 50; 100; 200 a 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO v 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl.

Použité roztoky

Griess A: 3,5% sulfanilamid v 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl.

Griess B: 3,5% sulfanilamid v 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl a 1% HgCl_2 .

NED: 0,1% N-(1-naftylethylen)diamin v deionizované vodě.

3.1.10 Spektrofotometrické stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou

Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 45 μl deionizované vody, 5 μl vzorku a 200 μl Bradfordova činidla (0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Coomasie Brilliant Blue G-250; 0,25 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ methanol; 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselina fosforečná).

Následně byla po 5 min inkubace změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Jako slepý vzorek se použilo 5 μl deionizované vody namísto vzorku. V závěru se vypočítala koncentrace proteinů podle rovnice lineární regrese optimalizované sestavením kalibrační řady hovězího sérového albuminu (BSA). Koncentrace jednotlivých vzorků BSA činila 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.1.11 Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch

Principem metody detekce S-nitrosylovaných proteinů biotin-switch je reverzibilní značení S-nitrosylovaných proteinů značkou nesoucí navázanou molekulu biotinu (Jaffrey a Snyder, 2001).

V prvním kroku byl 1 g rostlinného materiálu smíchán s 2 ml extrakčního pufru HENT (extrakce 1:2). Vzorky se promíchaly a byly inkubovány 20 min na ledu. Následně byla provedena centrifugace extraktu 30 min při 16 000g a 4 °C. Poté se supernatant přenesl do nových mikrozkušavek a bylo provedeno spektrofotometrické

stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou. Objem vzorku, který obsahoval 0,5 mg proteinů, se opět přenesl do nové mikroskopické kumavky a k němu byly přidány jednotlivé objemy činidel pro metodu biotin-switch podle následujícího postupu.

Nejdříve bylo použito methylační činidlo S-methylmethanthiosulfonát (MMTS) o výsledné koncentraci $0,02 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, aby došlo k zablokování volných $-\text{SH}$ skupin. Poté byl přidán 2% dodecylsírán sodný (SDS) a vzorky byly inkubovány ve tmě po dobu 30 min při teplotě $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Jako pozitivní kontrola detekce všech cysteinových residuí v proteinech sloužil vzorek bez přídavku MMTS a jako absolutní negativní kontrola sloužil vzorek s přídavkem $0,1 \text{ mM}$ DTT po biotinylacii.

Po inkubaci byl nadbytek MMTS odstraněn precipitací proteinů v 80% ledově vychlazeném acetonu po dobu 30 min v $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Následovala centrifugace po dobu 30 min při $16\,000 \text{ g}$ a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté se sediment promyl 1 ml 80% acetonu a byl centrifugován po dobu 15 min za stejných podmínek. Po centrifugaci se sediment rozpustil v $500 \text{ }\mu\text{l}$ HENS pufru, byl přidán askorbát o finální koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a biotin-HPDP o finální koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně se vzorky inkubovaly 1 h při laboratorní teplotě ve tmě. Poté byl k nim přidán 1 ml 80% acetonu a vzorky byly ponechány precipitovat přes noc při $-28 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Druhý den byly vzorky dvakrát centrifugovány, a to nejprve po dobu 30 min a poté 15 min při $16\,000 \text{ g}$ a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Mezi centrifugacemi byly vzorky promyty 1 ml 80% acetonu. Na závěr byl sediment rozpuštěn v HEN pufru tak, aby výsledná koncentrace proteinů byla $2,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzorky byly poté 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; $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ AEBSF.

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.

3.1.12 Metoda SDS-PAGE a Western blot

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

Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Jednotlivé vzorky s proteiny se smíchaly v poměru 3:1 s 4x koncentrovaným Laemmliho vzorkovacím pufrem. Reakce proběhla za neredukujících podmínek bez obsahu dithiotreitolu (DTT) nebo β -merkapt ethanolu. Zároveň nebyla provedena inkubace vzorků v termobloku z důvodu lability vazby proteinů s biotinem-HPDP.

Takto připravené vzorky byly napipetovány do jamek v gelech (30 μ l do každé jamky). Jako standard molekulové hmotnosti se použil Precision Plus Protein Dual Xtra Standards, který byl aplikován v objemu 3 μ l do každé jamky.

Použité roztoky

4x koncentrovaný Laemmliho vzorkovací puf: 0,5 mol \cdot l⁻¹ Tris-HCl pH 6,8; 16% SDS; 80% glycerol; 0,8% bromfenolová modř.

Elektrodový puf: 0,025 mol \cdot l⁻¹ Tris-HCl; 0,192 mol \cdot l⁻¹ glycin; 0,1% SDS, pH 8,3.

Elektroforetická separace proteinů byla provedena podle práce Laemmli (1970). Za pomoci metody SDS-PAGE (v 12% dělicím polyakrylamidovém gelu, pH 8,8 a v 4% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu, pH 6,8 – viz. Tab. 5) se rozdělily proteiny při konstantním napětí 120 V v zaostřovacím gelu a následně při 200 V v dělicím gelu.

Tab. 5 Příprava zaostřovacího a dělicího polyakrylamidového gelu pro skla s mezníky 1,5 mm. Rozpis je uveden pro 2 gely.

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 $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 6,8.

** Přídavkem 10% APS byla zahájena polymerace.

Následně byla provedena metoda přenosu proteinů z gelu na membránu, tzv. tank blotting. Na spodní část blotovací kazety (anoda) se položila navlhčená porézní houbička, 2x blotovací papír, nitrocelulosová membrána, gel, 2x blotovací papír, porézní houbička a horní část kazety (katoda). Přenos probíhal při konstantním proudu 150 mA. Úspěšnost přenosu se prokázala barvením pomocí Ponceau S, což je ve vodě smývatelné červené diazobarvivo, které se využívá pro reverzibilní barvení proteinů na membráně.

Po přenosu proteinů byla membrána inkubována 1 h v blokovacím 5% roztoku BSA. Následně byla přenesena do roztoku primární monoklonální anti-biotin protilátky konjugované s alkalickou fosfatase zředěnou blokovacím roztokem v poměru 1:2000. Zde probíhala inkubace přes noc za stálého třepání při 4 °C.

Druhý den byla membrána 4x promyta po 15 min roztokem TTBS. Následně došlo k inkubaci v 5 ml barvicího roztoku chromogenního substrátu NBT-BCIP, dokud nedošlo k vyvinutí tmavě fialového zbarvení detekovaných bandů. Na závěr se reakce zastavila destilovanou vodou, membrána se usušila a vyhodnotila v programu ImageJ.

Použité roztoky a protilátky

Blotovací puf^r: $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl; $0,192 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycin; 20% methanol, pH 8,3.

Blokovací roztok: 1% roztok mléka obsahující 5% BSA v TBS puf^ru.

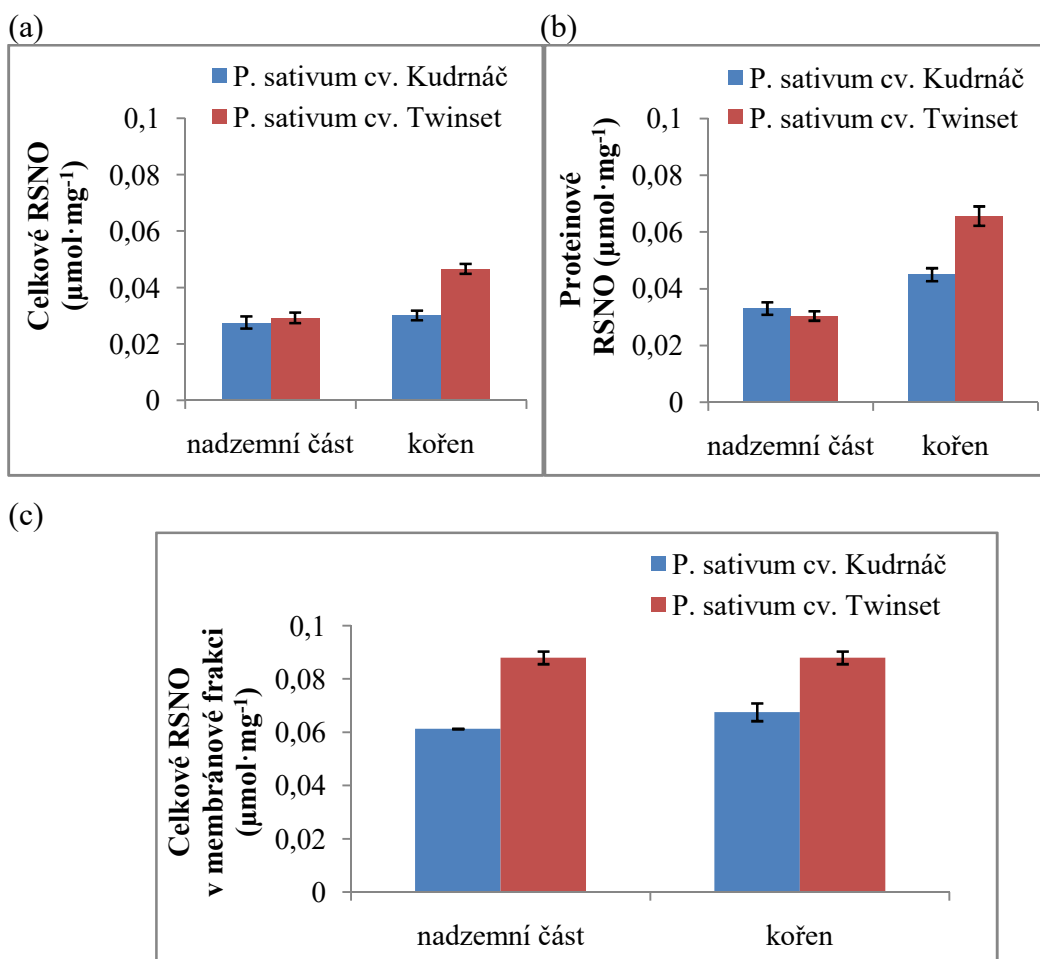
Barvicí roztok Ponceau S: 0,2% Ponceau S; 10% kyselina octová.

Primární protilátka: primární monoklonální myší anti-biotin protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase zředěná blokovacím roztokem v poměru 1:2000.

4 Výsledky

4.1 Stanovení hladiny S-nitrosothiolů

Obsah S-nitrosothiolů (RSNO) v $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ byl stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm s využitím Savillovy metody. Na Obr. 14 je znázorněn nárůst bazální hladiny (a) celkových RSNO v nepřečištěném extraktu, (b) proteinových RSNO v přečištěném extraktu, (c) RSNO obsažených v membránové frakci. Byl porovnáván obsah RSNO v nadzemních částech a kořenech studovaných kultivarů hrachu *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Kultivar Twinset vykazuje vyšší nárůst hladiny celkových RSNO (Obr. 14 (a)) a RSNO v membránové frakci (Obr. 14 (c)) v nadzemní části i v kořeni. Vyšší hladina proteinových RSNO byla zaznamenána v kořeni cv. Twinset (Obr. 14 (b)).



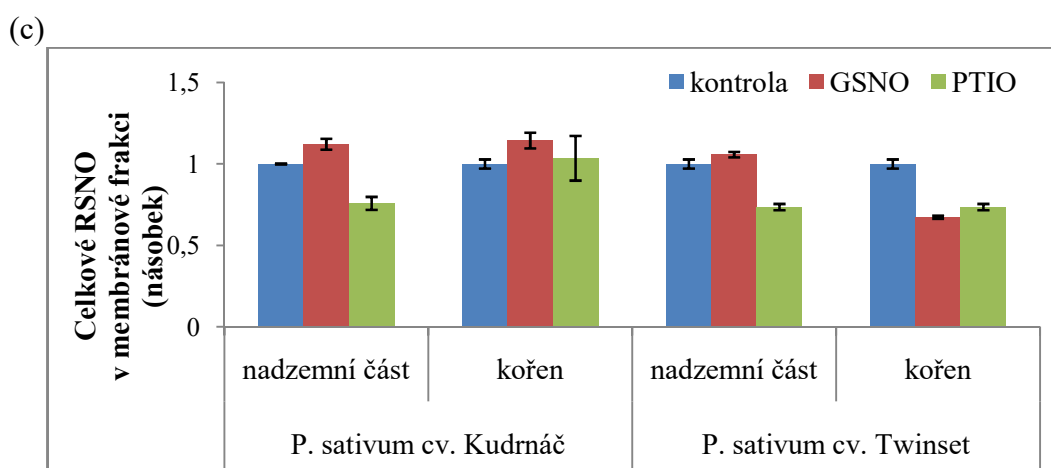
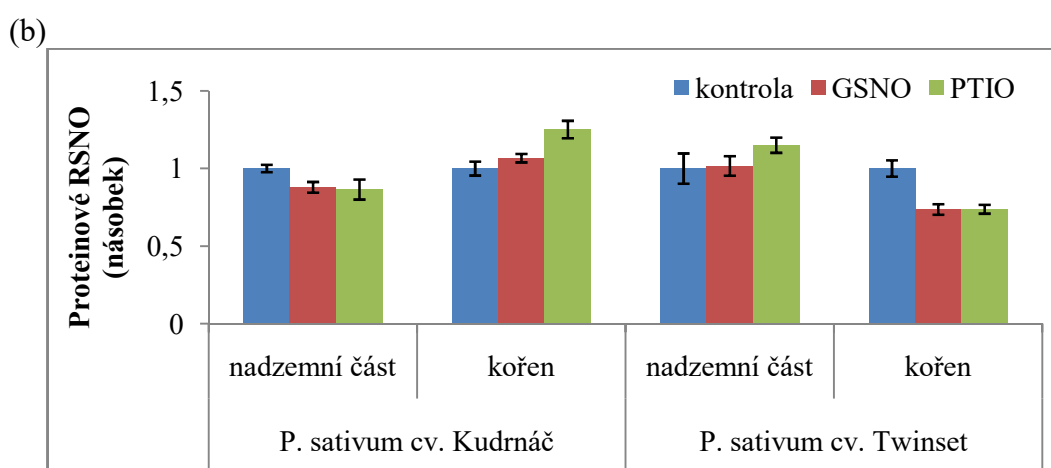
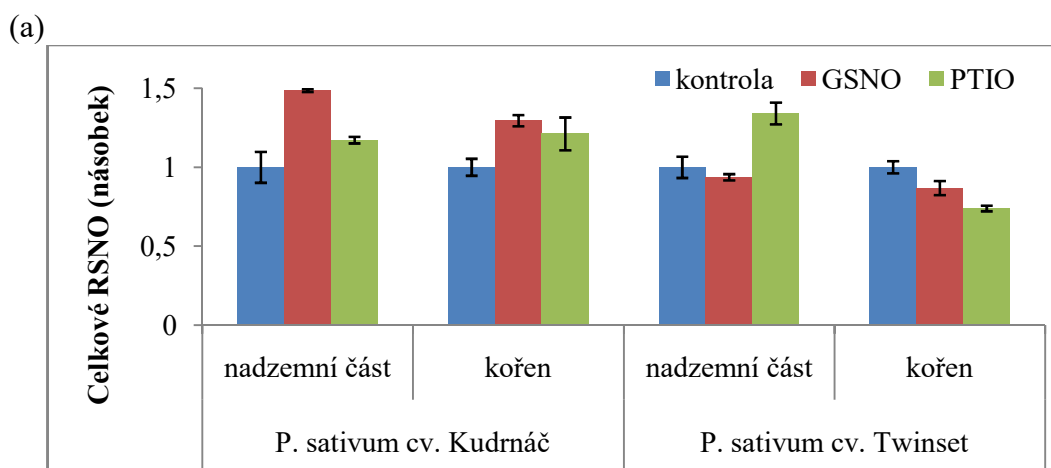
Obr. 14 Porovnání bazální hladiny S-nitrosothiolů (RSNO). (a) celkové RSNO, (b) proteinové RSNO, (c) RSNO obsažené v membránové frakci v nadzemních částech a kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. RSNO byly analyzovány spektrofotometricky Savillovou metodou při 540 nm.

Vliv modulátorů hladiny NO na koncentraci RSNO v nadzemní části a kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset je znázorněn na Obr. 15: (a) celkové RSNO, (b) proteinové RSNO, (c) RSNO v membránové frakci. Rostlinný materiál byl kultivován na MS médiu obsahující 0,1 mmol·l⁻¹ GSNO (donor NO) nebo 0,1 mmol·l⁻¹ PTIO (lapač NO). Nárůst hladiny RSNO byl vztažen jako násobek ke kontrolnímu vzorku, který neobsahoval testované látky.

Přídavkem GSNO se zvýšila hladina celkových RSNO u cv. Kudrnáč v nadzemní části i kořeni, naopak u cv. Twinset jejich hladina klesala v obou částech oproti kontrole. Přídavkem látky PTIO byl zaznamenán nárůst hladiny celkových RSNO v nadzemní části i kořeni cv. Kudrnáč, avšak v kořeni cv. Twinset hladina poklesla (Obr. 15 (a)).

Hladina proteinových RSNO se mírně zvýšila vlivem GSNO v kořeni cv. Kudrnáč a nadzemní části cv. Twinset. Naopak k poklesu vlivem obou modulátorů došlo v nadzemní části cv. Kudrnáč a v kořeni cv. Twinset (Obr. 15 (b)).

V membránové frakci byl detekován mírný nárůst celkových RSNO po aplikaci GSNO v nadzemních částech i kořenech cv. Kudrnáč, u cv. Twinset byl detekován pokles RSNO v kořeni. Přídavkem látky PTIO se snížila v membránové frakci hladina RSNO v nadzemní části cv. Kudrnáč i v obou částech cv. Twinset (Obr. 15 (c)).



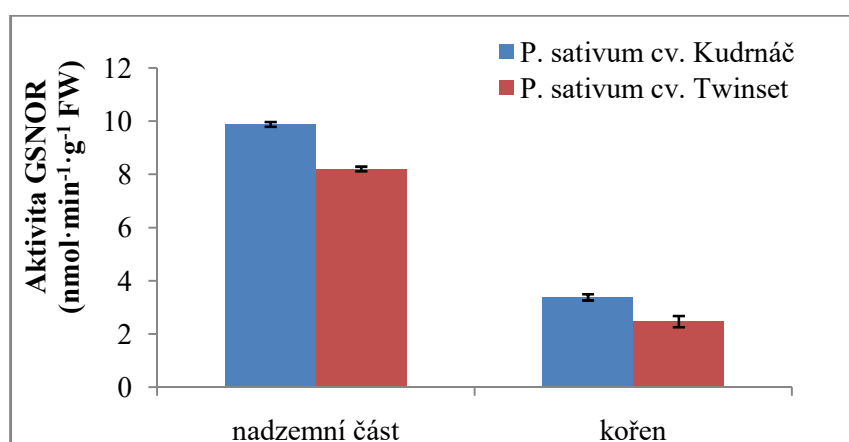
Obr. 15 Vliv modulátorů hladiny NO na koncentraci (a) celkových RSNO, (b) proteinových RSNO, (c) celkových RSNO obsažených v membránové frakci v nadzemních částech a kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset kultivovaných na MS médiu obsahujícím $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PTIO nebo $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO. Kontrolní médium neobsahovalo testované látky. RSNO byly analyzovány spektrofotometricky Savillovou metodou při 540 nm. Hladina RSNO ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$) byla vztažena ke kontrolnímu vzorku v násobku.

4.2 Stanovení aktivity enzymů zapojených do katabolismu S-nitrosothiolů

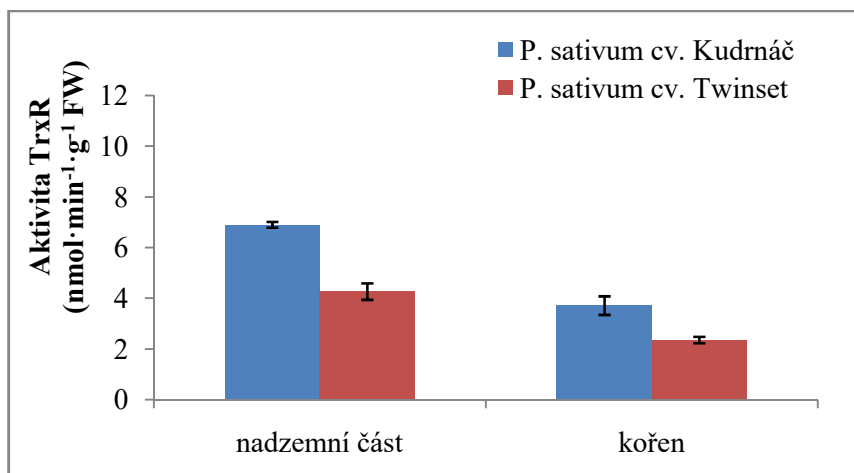
GSNOR a TrxR, enzymy denitrosylace, tj. degradace S-nitrosothiolů, se podílejí na udržování hladiny RSNO a mají vliv na imunitní obranné reakce rostlin (Malik *et al.*, 2011; Sengupta a Holmgren, 2012).

Na Obr. 16 je porovnána (a) aktivita GSNOR, (b) aktivita TrxR v nadzemních částech a kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Aktivita GSNOR i TrxR je zvýšená u cv. Kudrnáč v nadzemní části i kořeni ve srovnání s cv. Twinset.

(a)



(b)

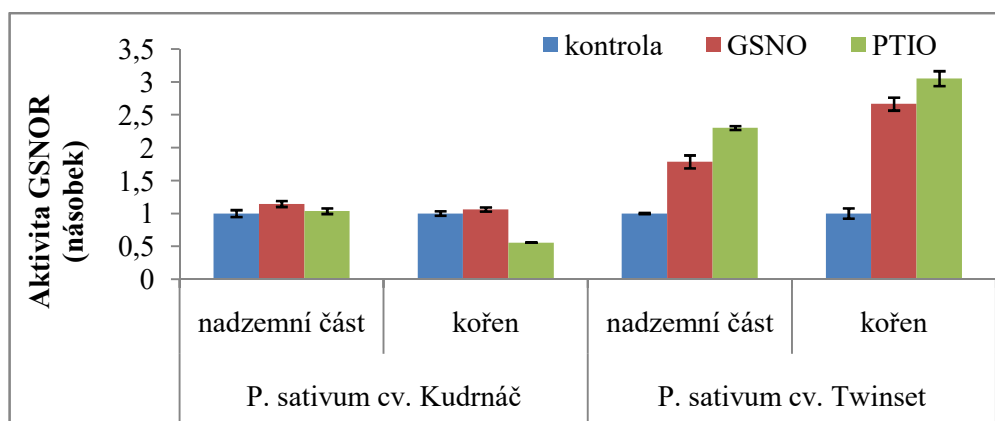


Obr. 16 Porovnání aktivity enzymů denitrosylace v nadzemních částech a kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. (a) Aktivita GSNOR byla stanovena spektrofotometricky sledováním oxidace NADH při vlnové délce 340 nm. Jako substrát byl do reakce přidán 4 mmol·l⁻¹ GSNO. (b) Aktivita TrxR byla stanovena spektrofotometricky sledováním oxidace NADPH při vlnové délce 340 nm. Jako substrát byl do reakce přidán 2 mmol·l⁻¹ selenocystin.

4.2.1 Aktivita S-nitrosoglutathionreduktasy

Na Obr. 17 je znázorněn vliv studovaných modulátorů na změnu aktivity GSNOR v nadzemních částech a kořenech dvou kultivarů hrachu Kudrnáč a Twinset. Rostlinný materiál byl kultivován na MS médiu obsahujícím $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO nebo $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PTIO. Změna aktivity je znázorněna v násobku oproti kontrole rostoucí na MS médiu, které neobsahovalo testované látky.

Po přidavku látky GSNO nebyly zaznamenány významné rozdíly v GSNOR aktivitě u cv. Kudrnáč. Naopak, u cv. Twinset vzrostla aktivita GSNOR dvojnásobně v nadzemní části a 2,5krát v kořeni. Po aplikaci PTIO byl u cv. Kudrnáč zaznamenán výrazný pokles aktivity o 50 % v kořeni, avšak u cv. Twinset byl naopak pozorován významný nárůst GSNOR aktivity v obou částech.

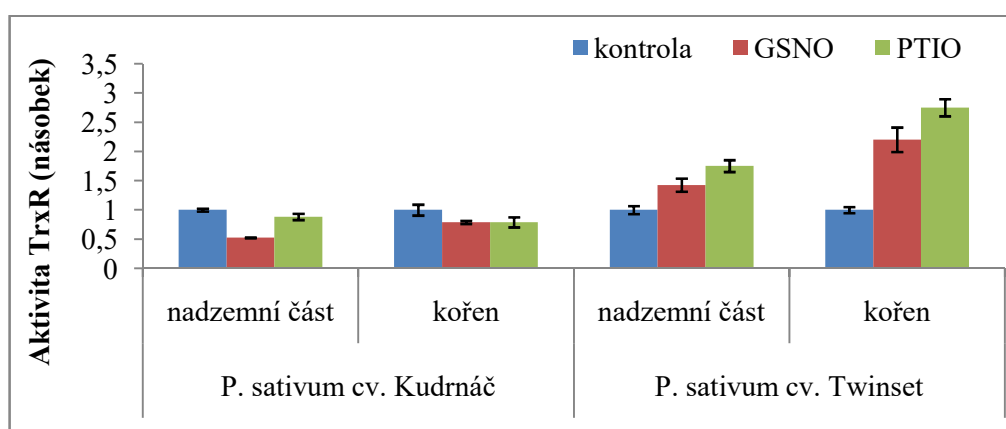


Obr. 17 Vliv modulátorů hladiny NO na aktivitu GSNOR v nadzemních částech a kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset kultivovaných na MS médiu obsahujícím $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PTIO nebo $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO. Kontrolní médium neobsahovalo testované látky. Aktivita GSNOR byla stanovena spektrofotometricky sledováním oxidace NADH při vlnové délce 340 nm. Jako substrát byl do reakce přidán $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO. Aktivita GSNOR ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) byla vztažena ke kontrolnímu vzorku.

4.2.2 Aktivita thiooxidinreduktasy

Na Obr. 18 je znázorněn vliv modulátorů hladiny NO na změnu aktivity enzymu TrxR v nadzemních částech a kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset kultivovaných na MS médiu obsahujícím 0,1 mmol·l⁻¹ GSNO či 0,1 mmol·l⁻¹ PTIO. Změna aktivity TrxR je znázorněna jako násobek ke kontrole kultivované na MS médiu bez testovaných látek.

Po přidavku GSNO i PTIO poklesla aktivita TrxR v nadzemní části i v kořeni kultivaru Kudrnáč. Naopak v obou částech cv. Twinset aktivita TrxR významně vzrostla po aplikaci obou modulátorů (Obr. 18).

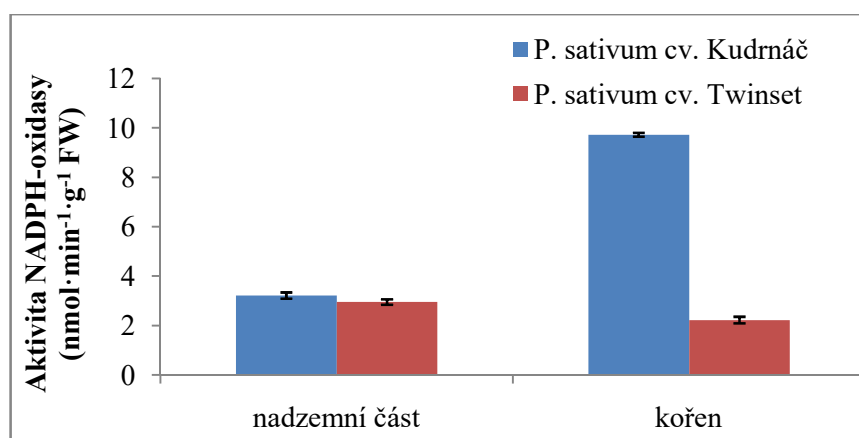


Obr. 18 Vliv modulátorů hladiny NO na aktivitu TrxR v nadzemních částech a kořenech dvou kultivarů hrachu *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset rostoucích na MS médiu obsahujícím 0,1 mmol·l⁻¹ PTIO nebo 0,1 mmol·l⁻¹ GSNO. Kontrolní médium neobsahovalo testované látky. Aktivita TrxR byla stanovená spektrofotometricky sledováním oxidace NADPH při vlnové délce 340 nm. Jako substrát byl do reakce přidán 2 mmol·l⁻¹ selenocystin. Aktivita TrxR (nmol·min⁻¹·g⁻¹ FW) byla vztažena ke kontrolnímu vzorku.

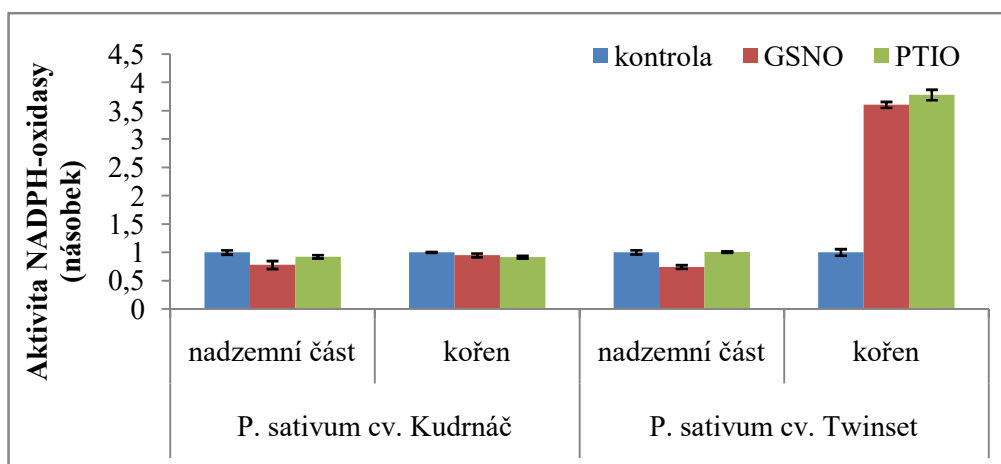
4.3. Stanovení aktivity NADPH-oxidasy

Produkce ROS je z velké části ovlivněna aktivitou NADPH-oxidasy (Lamb a Dixon *et al.*, 1997). Na Obr. 19 je uvedeno porovnání aktivity NADPH-oxidasy u *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Stanovení aktivity NADPH-oxidasy u obou kultivarů rostoucích na MS médiu obsahujícím modulátory NO, a to 0,1 mmol·l⁻¹ GSNO (donor NO) nebo 0,1 mmol·l⁻¹ PTIO (lapač NO) je na Obr. 20.

U *P. sativum* cv. Kudrnáč byl pozorován vyšší nárůst aktivity NADPH-oxidasy v nadzemní části i kořeni oproti cv. Twinset (Obr. 19). Po přidání GSNO a PTIO nebyl pozorován významný rozdíl v nadzemních částech obou genotypů a také v kořeni cv. Kudrnáč. Naopak významný nárůst aktivity NADPH-oxidasy byl zaznamenán po přidání GSNO i PTIO v kořeni cv. Twinset (Obr. 20).



Obr. 19 Porovnání aktivity NADPH-oxidasy v nadzemních částech a kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Rychlost redukce XTT (1mmol·l⁻¹) prostřednictvím O₂⁻, produkovaného aktivitou NADPH-oxidasy, byla stanovena spektrofotometricky při 492 nm.

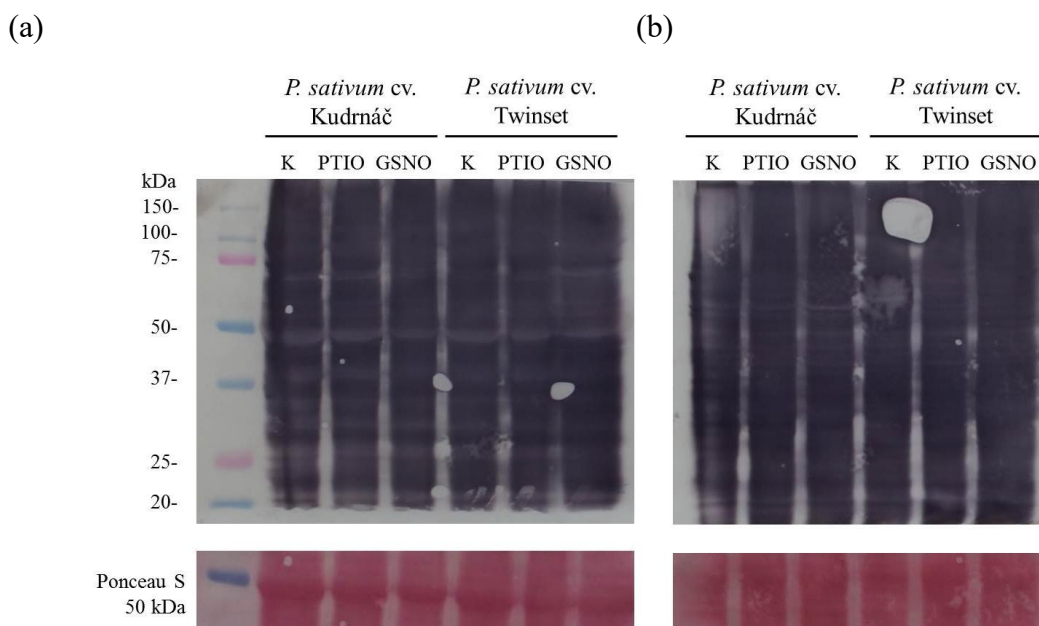


Obr. 20 Vliv modulátorů hladiny NO na aktivitu NADPH-oxidasy v nadzemních částech a kořenech hrachu *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset kultivovaných na MS médiu obsahujícím $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PTIO nebo $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO. Kontrolní médium neobsahovalo testované látky. Rychlost redukce XTT ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) prostřednictvím O_2^- , produkovaného aktivitou NADPH-oxidasy, byla stanovena spektrofotometricky při 492 nm. Aktivita NADPH-oxidasy ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) byla vztažena ke kontrolnímu vzorku.

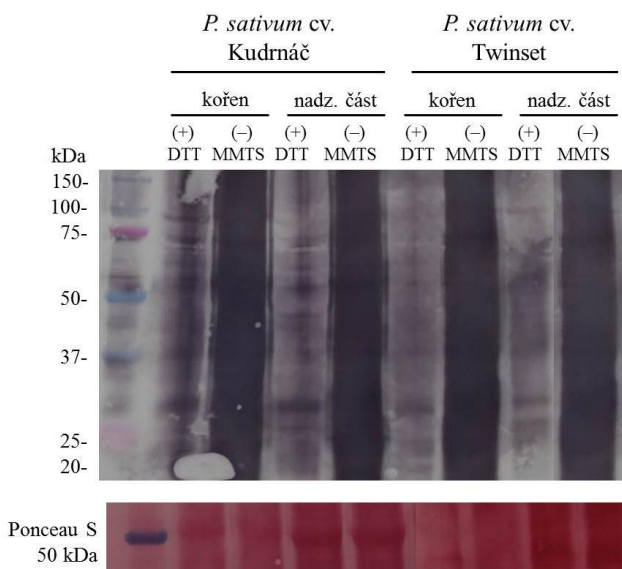
4.4 Detekce S-nitrosylovaných proteinů

Metoda biotin-switch slouží ke značení S-nitrosylovaných proteinů, a to značkou s navázanou molekulou biotinu-HPDP (Jaffrey *et al.*, 2001). Detekce S-nitrosylovaných proteinů poté byla realizována metodou Western blot dle metodiky uvedené v práci Lindermayr *et al.* (2005).

Na Obr. 21 (a) jsou znázorněny detekované S-nitrosylované proteiny v nadzemních částech a na Obr. 21 (b) S-nitrosylované proteiny v kořenech kultivarů hrachu *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu byl ověřen barvením Ponceau S, kde jsou vidět ve výřezu proteiny s molekulovou hmotností 50 kDa. Pro metodu biotin-switch byl rovněž proveden kontrolní experiment (Obr. 22), a to ve vzorcích kontrol obou kultivarů, které byly inkubovány bez blokačního činidla MMTS nebo bylo do vzorku přidáno redukční činidlo DTT po biotinylnaci pro redukci vazby thiol-biotin-HPDP.

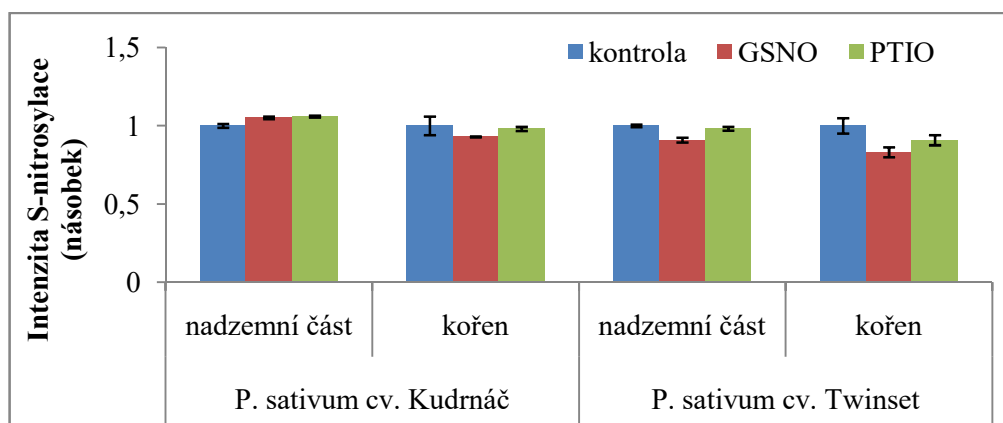


Obr. 21 Detekce S-nitrosylovaných proteinů u dvou kultivarů hrachu *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset rostoucích na MS médiu obsahujícím $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PTIO či $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO. Kontrolní médium neobsahovalo testované látky. (a) S-nitrosylované proteiny detekované v nadzemní části, (b) v kořenech. Na gel bylo naneseno $100 \mu\text{g}$ celkových proteinů, které byly přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Kontrolní barvení membrány pomocí barviva Ponceau S – ve výřezu jsou proteiny s molekulovou hmotností 50 kDa. Použita anti-biotin protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase (1:2000), barvení NBT-BCIP.



Obr. 22 Kontrolní experiment pro metodu biotin-switch provedený ve vzorcích kontrol nadzemní části a kořenů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Inkubace bez činidla $0,02 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMTS (-) pro blokaci volných thiolů, nebo s $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT po značení biotinem-HPDP. Na gel bylo naneseno $100 \mu\text{g}$ celkových proteinů, které byly přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Kontrolní barvení membrány pomocí Ponceau S – ve výřezu jsou proteiny s molekulovou hmotností 50 kDa. Použita anti-biotin protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase (1:2000), barvení NBT-BCIP.

Intenzita signálu detekovaných S-nitrosylovaných proteinů byla provedena pomocí programu ImageJ. Na Obr. 23 jsou u obou kultivarů porovnány intenzity S-nitrosylace proteinů vlivem aplikace modulátorů hladiny NO. V nadzemních částech obou studovaných kultivarů nebyl zaznamenán významný rozdíl v intenzitě detekovaných S-nitrosylovaných proteinů. V kořenech došlo k mírnému poklesu intenzity S-nitrosylace vlivem PTIO i GSNO u *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 23).



Obr. 23 Vliv modulátorů hladiny NO na intenzitu S-nitrosylace v nadzemních částech a kořenech *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset kultivovaných na MS médiu obsahujícím $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ PTIO nebo $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSNO. Kontrolní médium neobsahovalo testované látky. Intenzita signálu S-nitrosylace byla vyhodnocena v programu ImageJ a byla vztažena k příslušnému kontrolnímu vzorku.

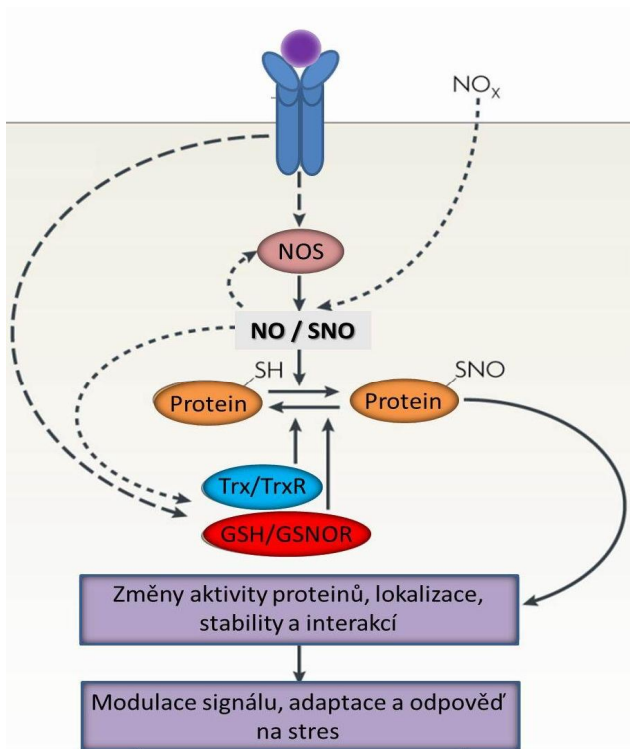
5 Diskuze

Rostliny jsou během svého života neustále vystavovány stresovým podmínkám, ať už biotickým, které zahrnují například působení patogenů nebo abiotickým, do kterých se řadí například extrémní klimatické podmínky (Lawlor a Cornic, 2002). Na spouštění obranných reakcí proti stresovým faktorům se podílejí signální molekuly, do kterých můžeme zařadit RNS, zejména NO a jeho metabolity. NO se vyznačuje širokým spektrem regulačních schopností v rámci fyziologických a patofyziologických procesů. (Wendehenne *et al.*, 2001; Lamattina *et al.*, 2003; Neill *et al.*, 2003; Del Río *et al.*, 2004). Významnou úlohu v signálních mechanismech NO u rostlin zaujímá S-nitrosylace (Lindermayr *et al.*, 2005).

V experimentální části předložené bakalářské práce byl studován vliv modulátorů NO na proces S-nitrosylace a denitrosylace u dvou kultivarů hrachu *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Semena byla po naklíčení přenesena na MS médium obsahujícím 0,1 mmol·l⁻¹ GSNO nebo 0,1 mmol·l⁻¹ PTIO. V rámci tohoto experimentu jsme předpokládali, že bezprostředně po modulaci hladiny NO (zvýšení/snížení) dochází k narušení homeostázy RNS a s ní také úzce propojené homeostázy ROS. Vyvolané změny v hladinách RNS a ROS tedy navozují stresový stav v buňkách a ovlivňují následně i vývoj rostlin. Role NO v procesu klíčení a růstu rostlin byla popsána v řadě publikací (Correa-Aragunde *et al.*, 2007; Wendehenne a Hancock, 2011; Tripathi *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). GSNO, patřící mezi nejvýznamnější nízkomolekulární S-nitrosothioly (RSNO), slouží jako zásobní a transportní forma NO *in vivo* (Martínez-Ruiz *et al.*, 2004). Avšak v mnoha studiích byl prokázán rozdílný vliv tohoto fyziologického donoru NO na vývojové procesy u rostlin (Liu *et al.*, 2007b; Zandonadi *et al.*, 2010; Semchuk *et al.*, 2011). Naopak, PTIO a jeho karboxyderivát cPTIO se v mnoha studiích používají jako lapače NO (Correa-Aragunde *et al.*, 2004) a studie potvrzují jejich inhibiční vlastnosti ve vývoji rostlin (Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Zandonadi *et al.*, 2010; Fernandez-Marcos *et al.*, 2012; Piterková *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2018).

Změny v produkci NO a hladinách celkových i proteinových RSNO významně regulují metabolické dráhy rostlin na úrovni S-nitrosylace (Kovacs a Lindermayr, 2013), kdy se molekula NO váže na cysteinová residua cílových proteinů, čímž vznikají RSNO a dochází následně ke změně aktivity proteinů, jejich lokalizaci, interakci s jinými proteiny, stability, což následně ovlivňuje modulaci signálu, adaptaci

a odpověď na stres (Obr. 24). U mitochondrií rostlin hrachu *P. sativum* cv. Lincoln vystavených působení $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl po dobu 5 a 14 dní, se studoval vliv S-nitrosylace/denitrosylace na respirační a fotorespirační dráhy. Výsledky ukázaly, že S-nitrosylace moduluje tyto dráhy za fyziologických podmínek i při salinitním stresu (Camejo *et al.*, 2013). V rámci našeho experimentu byly detekovány zvýšené hladiny celkových RSNO v kořenech i nadzemní části cv. Kudrnáč po aplikaci GSNO. V kořeni cv. Twinset byl naopak zaznamenán mírný pokles po aplikaci PTIO. Hladina proteinových RSNO se mírně zvýšila vlivem GSNO v kořeni cv. Kudrnáč a v nadzemní části cv. Twinset. Naopak, k poklesu došlo v nadzemní části cv. Kudrnáč a v kořeni cv. Twinset vlivem GSNO i PTIO. Po detekci celkových S-nitrosylovaných proteinů a vyhodnocení intenzity signálu byl pozorován pokles intenzity S-nitrosylace vlivem PTIO i GSNO v kořenech *P. sativum* cv. Twinset. Tyto výsledky poukazují na rozdílnou modulaci hladin celkových i proteinových RSNO, k nimž dochází v důsledku narušení homeostázy NO.



Obr. 24 Signální mechanismy S-nitrosylace. Oxid dusnatý (NO), produkovaný například z L-argininu prostřednictvím aktivity synthasy oxidu dusnatého (NOS, EC 1.14.13.39), se naváže na cysteinová residua cílových proteinů, čímž vzniknou S-nitrosothioly (RSNO), které ovlivňují aktivitu proteinů, jejich lokalizaci, stabilitu, interakce a následnou modulaci signálu, adaptaci a odpověď na stres. RSNO mohou být degradovány enzymy S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR) a thioredoxinreduktasou (TrxR) v procesu zvaném denitrosylace. Převzato z Benhar *et al.* (2009).

Proces S-nitrosylace je regulován dvěma enzymy – GSNOR a TrxR, odstraněním nitroso-skupiny tzv. denitrosylací (Obr. 24) (Benhar *et al.*, 2009). Ve studii Corpas *et al.* (2008) byl hodnocen vliv abiotických faktorů (vysoká intenzita světla, nízká a vysoká teplota, nepřetržité světlo a mechanické poranění) na vznik nitrosačního stresu u hrachu *P. sativum* cv. Lincoln. Nízká teplota (8 °C po dobu 48h) způsobila významný nárůst GSNOR aktivity, což bylo doprovázeno zvýšením hladin celkových RSNO i NO (Corpas *et al.*, 2008). Aktivita GSNOR byla zvýšená v listech topolu vystavených chladovému stresu po dobu 3 dnů a 12 h po aplikaci 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cPTIO. Za stejných podmínek byl detekován významný nárůst aktivity NR a NOS, klíčových enzymů produkce NO (Cheng *et al.*, 2015). Získané výsledky v rámci bakalářské práce ukázaly, že se aktivita GSNOR významně zvýšila po aplikaci látky GSNO v kořeni *P. sativum* cv. Kudrnáč a nadzemní části *P. sativum* cv. Twinset. Po aplikaci látky PTIO byl detekován 2,5násobný nárůst v nadzemní části a trojnásobný nárůst GSNOR aktivity v kořeni *P. sativum* cv. Twinset. Aktivita dalšího enzymu denitrosylace, TrxR, vykazovala podobný trend po aplikaci obou látek pouze u kultivaru Twinset. Naopak u kultivaru Kudrnáč byl pozorován významný pokles TrxR aktivity po aplikaci GSNO i PTIO. Z uvedených výsledků tedy vyplývá, že oba enzymy denitrosylují proteiny u obou kultivarů hrachu, avšak s rozdílnou modulací aktivity. Ve studii Kneeshaw *et al.* (2014) byl navržen schematický model, kde enzym GSNOR denitrosyluje jiné proteiny než TrxR. Dále některé proteiny, například NPR1, mohou být denitrosylovány oběma enzymy. Tyto mechanismy mají významnou funkci v signálních drahách obranných reakcí, kde přispívají k expresi obranných genů a imunitní odpovědi závislé na kyselině salicylové (Kneeshaw a Spoel, 2018).

Je známo, že S-nitrosylace ovlivňuje aktivitu NADPH-oxidasy, klíčového enzymu produkce ROS lokalizovaného v plasmatické membráně. K S-nitrosylaci dochází u Cys890 v blízkosti Phe921, který je součástí ve struktuře vazebného místa pro FAD, a dochází tak ke snížení enzymové aktivity (Yun *et al.*, 2011). V předložené bakalářské práci byla v membránové frakci stanovena aktivita NADPH-oxidasy a také obsah celkových RSNO. V membránové frakci detekován mírný nárůst celkových RSNO po aplikaci GSNO v nadzemních částech i kořenech cv. Kudrnáč, u cv. Twinset byl detekován naopak pokles RSNO v kořeni. Přídavkem látky PTIO se významně snížila v membránové frakci hladina celkových RSNO v nadzemní části cv. Kudrnáč a v obou částech cv. Twinset. Aktivita NADPH-oxidasy byla významně snížena po aplikaci GSNO v nadzemních částech obou kultivarů. V kořeni cv. Twinset byl nárůst aktivity

téměř čtyřnásobný. Získané výsledky tedy naznačují možnou regulaci aktivity tohoto enzymu na úrovni S-nitrosylace u obou studovaných kultivarů hrachu setého, kterou by bylo vhodné potvrdit dalšími experimenty. Například by mohla být využita metoda biotin-switch pro izolaci S-nitrosylovaných proteinů z membránové frakce. Po afinitní purifikaci proteinů značených biotinem-HPDP by bylo možné semi-kvantitativně určit zastoupení NADPH-oxidasy, a to s využitím imunochemické detekce pomocí specifické protilátky proti NADPH-oxidase.

6 Závěr

Cílem práce bylo studium úlohy S-nitrosylace a denitrosylace v procesu vývoje kořene a nadzemní části hrachu *Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset s využitím modulátorů hladiny NO: 0,1 mmol·l⁻¹ GSNO (donor) a 0,1 mmol·l⁻¹ PTIO (lapač). Z výsledků provedených experimentů vyplývají následující závěry:

- Studované kultivary hrachu setého se odlišují bazální hladinou celkových i proteinových S-nitrosothiolů, přičemž vyšší hladiny byly detekovány u rezistentního kultivaru *P. sativum* cv. Twinset.
- Aplikace donoru GSNO i lapače PTIO způsobila rozdílné změny obsahu S-nitrosothiolů v nadzemních částech i kořenech obou kultivarů. Intenzita S-nitrosylace proteinů se významně snížila po aplikaci GSNO i PTIO v kořenech *P. sativum* cv. Twinset.
- Enzymy GSNOR i TrxR jsou zapojeny v denitrosylaci proteinů u obou kultivarů hrachu setého. Byly nalezeny rozdílné změny jejich aktivity po aplikaci modulátorů hladiny NO. Aktivita GSNOR i TrxR se významně zvýšila po aplikaci GSNO i PTIO v nadzemní části a kořenech *P. sativum* cv. Twinset. U *P. sativum* cv. Kudrnáč došlo k významnému poklesu aktivity TrxR vlivem obou modulátorů. Tyto rozdíly naznačují, že se enzymy denitrosylace podílejí na katabolismu odlišných proteinových S-nitrosothiolů.
- U obou kultivarů hrachu setého došlo po aplikaci modulátorů NO ke změnám hladiny celkových S-nitrosothiolů v membránové frakci a také aktivity NADPH-oxidasy, klíčového enzymu produkce ROS, jehož aktivita podléhá regulaci prostřednictvím S-nitrosylace.

7 Literatura

- Anderson L. E., Ringenber M. R., Carol A. A. (2004): Cytosolic glyceraldehyde-3-P dehydrogenase and the B subunit of the chloroplast enzyme are present in the pea leaf nucleus. *Protoplasma* **223**, 33.
- Begara-Morales J. C., Loake G. J., (2016): Protein denitrosylation in plant biology. In: *Gasotransmitters in Plants: The Rise of a New Paradigm in Cell Signaling* **23**. (František Baluška ed.), Springer International Publishing, Švýcarsko, 2.
- Belenghi B., Romero-Puertas M. C., Vercammen D., Brackenier A., Inzé D., Delledonne M., Van Breusegem F. (2007): Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 1352-1358.
- Beligni M. V., Laxalt A. M., Lamattina L. (1997): Putative role of nitric oxide in plant-pathogen interactions. In: *The biology of nitric oxide* **6**. (Moncada S., Toda N., Higgs E. A. eds), 250.
- Benhar M., Forrester M. T., Hess D. T., Stamler J. S. (2008): Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* **320**, 1050–1054.
- Benhar M., Forrester M. T., Stamler J. S. (2009): Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 721.
- Besse I., Wong J. H., Kobrehel K., Buchanan B. B. (1996): Thiocalcin: a thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 3169-3175.
- Broniowska K. A., Diers A. R., Hogg N. (2013): S-nitrosoglutathione. *Biochimica et Biophysica Acta* **1830**, 3173-3181.
- 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.
- Camejo D., Romero-Puertas M. C., Rodríguez-Serrano M., Sandalio L. M., Lázaro J. J., Jiménez A., Sevilla F. (2012): 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.
- Chaki M., Fernández-Ocana A. M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F. J., Luque F., Gómez Rodríguez M. V., Begara-Morales J. C., Corpas F. J., Barroso J. B. (2009): Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant & Cell Physiology* **50**, 265–279.
- Chen R., Sun S., Wang C., Li Y., Liang Y., An F. (2009): The *Arabidopsis* PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Research* **19**, 1377-1387.
- Cheng T., Chen J., Abd Allah E. F., Wang P., Wang G., Hu X., Shi J. (2015): Quantitative proteomics analysis reveals that S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) and nitric oxide signaling enhance poplar defense against chilling stress. *Planta* **242**, 1361-1390.
- Chouchani E. T., Hur T. R., Nadtochi S. M., Brookes P. S., Fearnley I. M., Lilley K. S., Smith R. A. J., Murphy M. P. (2010): Identification of S-nitrosated mitochondrial proteins by S-nitrosothiol difference in gel electrophoresis (SNO-DIGE): implications for the regulation of mitochondrial function by reversible S-nitrosation. *Biochemical journal* **430**, 49.
- Clementi E., Brown G. C., Feelisch M., Moncada S. (1998): Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 7631.
- Corpas F. J., Chaki M., Fernandez-Ocana A., Valderrama R., Palma J. M., Carreras A., Begara-Morales J. C., Airaki M., del Río L. A., Barroso J. B. (2008): Metabolism of Reactive Nitrogen Species in Pea Plants Under Abiotic Stress Condition. *Plant & Cell Physiology* **49**, 1711–1722.

- Corpas F. J., Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Barroso J. B. (2015): Nitration and S-nitrosylation: two post-translational modifications (PTMs) mediated by reactive nitrogen species (RNS) which participate in signalling processes of plant cells. In: *Reactive oxygen and nitrogen species signaling and communication in plant*. **23** (Gupta K. J., Igamberdiev K. J. eds.) Berlin, Heidelberg Springer-Verlag, 268.
- Correa-Aragunde N., Graziano C. M., Lamattina L. (2004): Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**, 900-905.
- Correa-Aragunde N., Lanteri M. L., García-Mata C., Ten Have A., Laxalt A. M., Graziano M., Lamattina L. (2007): Nitric oxide functions as intermediate in auxin, abscisic acid, and lipid signaling pathways. *Plant Cell Monographs* **34**, 113-130.
- Cunniff B., Snider G. W., Fredette N., Stumpff J., Hondal R. J., Heintz N. H. (2014): Resolution of oxidative stress by thioredoxinreductase: Cysteine versus selenocysteine. *Redox Biology* **2**, 475-484.
- D'Alessandro S., Posocco B., Costa A., Zahariou G., Lo Schiavo F., Carb D., Zottini M. (2013): Limits in the use of cPTIO as nitric oxide scavenger and EPR probe in plant cells and seedlings. *Frontiers in Plant Science* **4**, 340.
- Del Río L. A., Corpas F. J., Barroso J. B. (2004): Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**, 783-792.
- Derakhshan B., Hao G., Gross S. S. (2007): Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide. *Cardiovascular Research* **75**, 210.
- Diers A. R., Keszler A., Hogg N. (2014): Detection of S-nitrosothiols. *Biochimica et Biophysica Acta* **1840**, 892.
- Doulias P. T., Greene J. L., Greco T. M., Tenopoulou M., Seeholzer S. H., Dunbrack R. L., Ischiropoulos H. (2010): Structural profiling of endogenous S-nitrosocysteine residues reveals unique features that accommodate diverse mechanisms for protein S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16958-16963.
- Dubreuil-Maurizi C., Poinssot B. (2012): Role of glutathione in plant signaling under biotic stress. *Plant Signaling & Behaviour* **7**, 210-212.
- Feechan A., Kwon E., Yun B. W., Wang Y., Pallas J. A., Loake G. J. (2005): A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8054-8059.
- Ford P. C., Fernandez B. O., Lim M. D. (2005): Mechanisms of reductive nitrosylation in iron and copper models relevant to biological systems. *Chemical Reviews* **105**, 2439-2455.
- Forrester M. T., Thompson J. W., Foster M. W., Nogueira L., Moseley M. A., Stamler J. S.: Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture. *Nature Biotechnology* **27**, 557.
- Frendo P., Baldacci-Cresp F., Benyamina S. M., Puppo A. (2013): Glutathione and plant response to the biotic environment. *Free Radical Biology & Medicine* **65**, 724-730.
- Frungillo L., Skelly M. J., Loake G. J., Spoel S. H., Salgado I. (2014): S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communications* **5**, 5401.
- Gaston B. (1999): Nitric oxide and thiol groups. *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**, 123.
- Gaupels F., Kuruthukulangarakoola G. T., Durner J. (2011): Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 707.
- Gelhay E., Rouhier N., Jacquot J. P. (2004): The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 265-271.
- Gill S. S., Anjum N. A., Hasanuzzaman M., Gill R., Trivedi D. K., Ahmad I., Pereira E., Tuteja N. (2012): Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* **70**, 204-212.
- Gow A. J., Buerk D. G., Ischiropoulos H. (1997): A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2841.

- Gow A., Doctor A., Mannick J., Gasto B. (2007): Highly Sensitive Detection of S-Nitrosylated Proteins by Capillary Gel Electrophoresis with Laser Induced Fluorescence. *Journal Chromatography B* **851**, 140.
- Greco T. M., Hodara R., Parastatidis I., Heijnen H. F., Dennehy M. K., Liebler D. C., Ischiropoulos H. (2006): Identification of S-nitrosylation motifs by site-specific mapping of the S-nitrosocysteine proteome in human vascular smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7420-7425.
- Griveau S., Bedioui F. (2013): Electroanalytical methodologies for the detection of S-nitrosothiols in biological fluids. *Analyst* **118**, 5159- 5504.
- Guerra D., Ballard K., Truebridge I., Vierling E. (2016): S-Nitrosation of conserved cysteines modulates activity and stability of S-nitrosogluthione reductase (GSNOR). *Biochemistry* **55**, 2452-2464.
- Gupta K. J., Fernie A. R., Kaiser W. M., van Dongen J. T. (2011): On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* **16**, 160–168.
- Gupta K. J., Igamberdiev A. U. (2015): Compartmentalization of ROS Production. In: *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants, Signaling and Communication in Plants*. **23** (František Baluška ed.), Springer International Publishing, Švýcarsko, 2.
- Haendeler J., Hoffmann J., Tischler V., Berk B. C., Zeiher A. M., Dimmeler S. (2002): Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nature Cell Biology* **4**, 743.
- Handy D. E., Loscalzo J. (2006): Nitric oxide and posttranslational modification of the vascular proteome: S-nitrosation of reactive thiols. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26**, 1207.
- Hao G., Derakhshan B., Shi L., Campagne F., Gross S. S. (2006): SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine S-nitrosylation sites in complex protein mixtures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1012.
- Hess D. T., Stamler J. S. (2012): Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 4395.
- Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2009): Nitrace proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické Listy* **103**, 788.
- Hogg N. (1999): The kinetics of S-transnitrosation--a reversible second-order reaction. *Analytical Biochemistry* **272**, 257.
- Hogg N. (2002): The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **42**, 585–600.
- Holmes A. J., Williams D. L. H. (2000): Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways. *Journal of Chemical Society Perkin Transaction* **2**, 1639–1644.
- Holzmeister C., Fröhlich A., Sarioglu H., Bauer N., Durner J., Lindermayr C. (2011): Proteomic analysis of defense response of wildtype *Arabidopsis thaliana* and plants with impaired NO homeostasis. *Proteomics* **11**, 1664-1683.
- Huang B., Che C. (2006): An ascorbate-dependent artifact that interferes with the interpretation of the biotin switch assay. *Free Radical Biology & Medicine* **41**, 562.
- Ignarro L. J. (1999): Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Bioscience Report* **19**, 51.
- 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.
- Jaffrey S. R., Erdjument-Bromage H., Ferris C. D., Tempst P., Snyder S. H. (2001): Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature Cell Biology* **3**, 193.
- Jahnová J., Tichá T., Kubienová L., Luhová, L., Petřivalský M. (2013): Biologické funkce a význam S-nitrosace proteinů. *Chemické Listy* **107**, 350.
- Jensen D. E., Belka G. K., Du Bois G. C. (1998): S-Nitrosogluthione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemistry Journal* **331**, 659.

- Jiang M., Zhang J. (2002): Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2401-2410.
- Jones J. D. G., Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Jourd'heuil D., Jourd'heuil F. L., Feelisch M. (2003): Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide. Evidence for a free radical mechanism. *Journal Biological Chemistry* **278**, 15720 – 15726.
- Kallakunta V. M., Staruch A., Mutus B. (2010): Sinapinic acid can replace ascorbate in the biotin switch assay. *Biochimica et Biophysica Acta* **1800**, 23.
- Kaundal A., Rojas C. M., Mysore K. S. (2012): Measurement of NADPH oxidase activity in plants. *Bio-Protocol* **2**, 278.
- Kelm M. (1999): Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**, 273-89.
- Kharitonov V. G., Sundquist A. R., Sharma V. S. (1995): Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 28158.
- 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.
- Klepper L. (1979): Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment* **13**, 537-542.
- Kneeshaw S., Gelineau S., Tada Y., Loake G. J., Spoel S. H. (2014): Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Molecular Cell* **56**, 153–162.
- Kneeshaw S., Spoel, S. H. (2018): Thioredoxin-Dependent Decomposition of Protein S-Nitrosothiols. In: *Nitric Oxide. Methods in molecular biology*, 1747 (Mengel A., Lindermayr C. eds), Humana Press, New York, NY, 281-297.
- Kobrehel K., Wong J. H., Balogh A., Kiss F., Yee B. C., Buchanan B. B. (1992): Specific reduction of heat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiology* **99**, 919-924.
- Kostka P., Park J. K. J. (1999): Fluorometric detection of S-nitrosothiols. In: *Methods in Enzymology*. **42** (Packer L., ed.), Academic Press, San Diego, 227.
- Kovacs I., Holzmeister C., Wirtz M., Geerlof A., Fröhlich T., Römling G., Kuruthukulangarakoola G. T., Linster E., Hell R., Arnold G. J., Durner J., Lindermayr C. (2016): ROS mediated inhibition of S-nitrosoglutathione reductase contributes to the activation of antioxidative mechanisms. *Frontiers in Plant Science* **10**, 7.
- Kovacs I., Lindermayr C. (2013): Nitric oxide-based protein modification: formation and sitespecificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science* **4**, 137.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tache R., Luhová L., Barroso J. B., Petřivalský M. (2013): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosoglutathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889-902.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Mieslerová B., Petřivalský M. (2014): Effect of abiotic stress stimuli on S nitrosoglutathione reductase in plants. *Planta* **239**, 139-146.
- Kwon E., Feechan A., Yun B. W., Hwang B. H., Pallas J. A., Kang J. G., Loake G. J. (2012): AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in Arabidopsis. *Planta* **236**, 887–900.
- Laloi C., Rayapuram N., Chartier Y., Grienenberger J. M., Bonnard G., Meyer Y. (2001): Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14144-14149.
- Laloi C., Mestres-Ortega D., Marco Y., Meyer Y., Reichheld J. P. (2004): *The Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology* **134**, 1006-1016.
- Lamattina L., Garcia-Mata C., Graziano M., Pagnussat G. (2003): Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review in Plant Biology* **54**, 109-136.

- Lancaster J. R., Jr. (2008): Protein cysteine thiol nitrosation: maker or marker of reactive nitrogen species-induced nonerythroid cellular signaling? *Nitric Oxide* **19**, 68.
- Landino L. M. (2008): Protein Thiol Modification by Peroxynitrite Anion and Nitric Oxide Donors. In: *Methods in Enzymology*. **440** (Packer E. C., ed.), Academic Press, San Diego, 95.
- Lawler D.W., Cornic G. (2002): Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment*, **25**, 275–294.
- Laxalt A., Beligni M. V., Lamattina L. (1997): Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Europe Journal of Plant Pathology* **103**, 643–651.
- Lee U., Wie C., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E. (2008): Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 786–802.
- Lindermayr C. (2017): Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in plants: Key role of S-nitrosoglutathione reductase. *Free Radical Biology & Medicine* **5849**, 31231–31235.
- Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., Durner J. (2006): Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 4285.
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J. (2005): Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**, 921.
- Lindermayr C., Sell S., Muller B., Leister D., Durner J. (2010): Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell* **22**, 2894.
- 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.
- Luiking Y. C., Engelen M. P., Deutz N. E. (2010): Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition* **13**, 97.
- Maldonado-Alconada A. M., Echevarría-Zomeño S., Lindermayr C., Redondo-López I., Durner J., Jorrín-Novo J. V. (2011): Proteomic analysis of *Arabidopsis* protein S-nitrosylation in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 1493–1514.
- Malik S. I., Hussain A., Yun B. W., Spoel S. H., Loake G. J. (2011): GSNOR-mediated de-nitrosylation in the plant defence response. *Plant Science* **181**, 540.
- Mannick J. B., Schonhoff C., Papeta N., Ghafourifar P., Szibor M., Fang K., Gaston B. (2001): S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *Journal Cell Biology* **154**, 1111.
- Manukhina E. B., Smirin B. V., Malyshev I. Y., Stoclet J. C., Muller B., Solodkov A. P., Shebeko V. I., Vanin A. F. (2002): Nitric oxide storage in the cardiovascular system. *The Biological Bulletin* **29**, 477–486.
- Marino S. M., Gladyshev V. N. (2010): Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acidbased motif and the emerging role of trans-nitrosylation. *Journal of Molecular Biology* **395**, 844–859.
- Marquette C., Blum, L. (2008): Electro-chemiluminescent biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**, 155–168.
- Martínez M. C., Achkor H., Persson B., Fernández M. R., Shafqat J., Farrés J., Jörnvall H., Parés X. (1996): *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase. Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class p and liver class I alcohol dehydrogenases. *Europe Journal of Biochemistry* **241**, 849.
- Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2004): S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovascular Research* **62**, 43.
- Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2007): Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovascular Research* **75**, 220.
- Marx C., Wong J. H., Buchanan B. B. (2003): Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. *Planta* **216**, 454–460.

- Meng L., Wong J. H., Feldman L. J., Lemaux P. G., Buchanan B. B. (2010): A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America* **107**, 3900–3905.
- Meyer Y., Vignols F., Reichheld J.P. (2002): Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods in Enzymology* **347**, 394–402.
- Moore J. W., Loake G. J., Spoel S. H. (2011): Transcription Dynamics in Plant Immunity. *Plant Cell* **23**, 2809 – 2820.
- Moreau M., Lindermayr C., Durner J., Klessig D. F. (2010): NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? *Physiology Plant* **138**, 372–383.
- Neill S. J., Desikan R., Hancock J. T. (2003): Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* **159**, 11–35.
- Neoseeds - semena: <http://www.neoseeds.cz/cz/e-shop/c76428/hrach.html?page=2> (25. 4. 2018).
- Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y. I., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C. H. (2012): Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environment* **35**, 454–484.
- Noritake T., Kawakita K., Doke N. (1996): Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiology* **37**, 113–116.
- Paige J. S., Xu G., Stancevic B., Jaffrey S. R. (2008): Nitrosothiol reactivity profiling identifies S-nitrosylated proteins with unexpected stability. *Chemical Biology* **15**, 1307.
- Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S. (1987): Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524–526.
- Piterková J., Luhová L., Hofman J., Turečková V., Novák O., Petřivalský M., Fellner M. (2012): Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany* **110**, 767–776.
- Piterková J., Mieslerová B., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A., Petřivalský M. (2011): Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp. – *Oidium neolycopersici* interactions. *Environmental and Experimental Botany* **74**, 37.
- Piterková J., Petřivalský M., Luhová L. (2008): Signalling Pathways of Nitric Oxide in Plants. *Chemické Listy* **102**, 410.
- Rafikova O., Rafikov R., Nudler E. (2002): Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: The mechanism and implication in vascular control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 5913.
- Reichheld J. P., Mestres-Ortega D., Laloï C., Meyer Y. (2002): The multigenic family of thioredoxin h in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 685.
- Romero-Puertas M. C., Laxa M., Matte A., Zaninotto F., Finkemeier I., Jones A. M. E., 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.
- Rusterucci C., Espunya M. C., Diaz M., Chabannes M., Martinez M. C. (2007): S-nitrosogluthathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology* **143**, 1282.
- Sakamoto A., Tsukamoto S., Yamamoto H., Ueda-Hashimoto M., Takahashi M., Suzuki H., Morikawa H. (2003): Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species. *Plant Journal* **33**, 841.
- Schonhoff C. M., Gaston B., Mannick J. B. (2003): Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 18265.
- Semchuk N. M., Vasylyk V., Kubrak O. I., Lushchak V. I. (2011): Effect of sodium nitroprusside and S-nitrosogluthathione on pigment content and antioxidant system of tocopherol-deficient plants of *Arabidopsis thaliana*. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* **83**, 69–79.
- Sengupta R., Holmgren A. (2012): The role of thioredoxin in the regulation of cellular processes by S-nitrosylation. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1820**, 689–700.

- Sengupta R., Ryter S. W., Zuckerbraun B. S., Tzeng B., Billiar T. R., Stoyanovsky D. A. (2007): Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols. *Biochemistry* **46**, 8472.
- Serrano I, Audran C, Rivas S. (2016): Chloroplasts at work during plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany* **67**, 3845-3854.
- Serrato A. J., Romero-Puertas M. C., Lázaro-Payo A., Sahrawy M. (2018): Regulation by S-nitrosylation of the Calvin-Benson cycle fructose-1,6-bisphosphatase in *Pisum sativum*. *Redox Biology* **14**, 409–416.
- Shahani N., Sawa A. (2011): Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for S-nitrosylation. *Antioxidants and Redox Signaling* **14**, 8.
- Shi Y. F., Wang D. L., Wang C., Culler A. H., Kreiser M. A., Suresh J., Cohen J. D., Pan J., Baker B., Liu J. Z. (2015): Loss of GSNOR1 function leads to compromised auxin signaling and polar auxin transport. *Molecular Plant* **8**, 1350-1365.
- Singh R. J., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B. (1996): Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *Journal Biological of Chemistry* **271**, 18596.
- Šírová J., Sedlářová M., Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2011): The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Science* **181**, 560.
- Staab C. A., Alander J., Brandt M., Lengqvist J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2008): Reduction of S-nitrosoglutathione by alcohol dehydrogenase 3 is facilitated by substrate alcohols via direct cofactor recycling and leads to GSH-controlled formation of glutathione transferase inhibitors. *Biochemistry Journal* **413**, 493.
- Staab C., Hellgren M., Höög J. O. (2008): Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3950.
- Stamler J. S., Toone E. J. (2002): The decomposition of thionitrites. *Current Opinion in Chemistry and Biology* **6**, 779.
- Tada Y., Spoel S. H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. (2008): Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952–956.
- Tichá T., Kubienová L., Luhová L., Petřivalský M. (2016): Detection of S-nitrosoglutathione reductase activity in plants. In: *Plant Nitric Oxide: Methods & Protocols* **1424** (Gupta K. J., Ed.) Springer International Publishing, 175-189.
- Tichá T., Sedlářová M., Činčalová L., Drábková-Trojanová Z., Mieslerová B., Lebeda A., Luhová L., Petřivalský M. (2018): Involvement of S-nitrosothiols modulation by S-nitrosoglutathione reductase in defence responses of lettuce and wild *Lactuca* spp. to biotrophic mildews. *Planta* **247**, 1203-1215.
- Tichá T., Lochman J., Činčalová L., Luhová L., Petřivalský M. (2017): Redox regulation of plant S-nitrosoglutathione reductase activity through post-translational modifications of cysteine residues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **494**, 27-33.
- Tripathi D. K., Singh S., Singh S., Srivastava P. K., Singh V. P., Singh S., Chauhan D. K. (2017): Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* **110**, 167-177.
- Tripathy B. C., Oelmüller R. (2012): Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 1621–1633.
- 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.
- Vanin A. F. (1998): Dinitrosyl iron complexes and S-nitrosothiols: two possible forms of nitric oxide stabilization and transport in biological systems. *Biochemistry* **63**, 782–796.
- Wawer I., Bucholc M., Astier J., Anielska-Mazur A., Dahan J., Kulik A., Wyslouch-Cieszynska A., Zareba-Kozioł M. K. 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. *Biochemistry Journal* **429**, 73.

- Wendehenne D., Hancock J. T. (2011): New frontiers in nitric oxide biology in plant. *Plant Science* **181**, 507-508.
- Wendehenne D., Pugin A., Klessig D. F., Durner J. (2001): Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science* **6**, 177-183.
- Wong J. H., Kim Y. B., Ren P. H., Cai N., Cho M. J., Hedden P., Lemaux P. G., Buchanan B. B. (2002): Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16325-16330.
- Wu C., Parrott A. M., Liu T., Jain M. R., Yang Y., Sadoshima J., Li H. (2011): Distinction of thioredoxin transnitrosylation and denitrosylation target proteins by the ICAT quantitative approach. *Journal of Proteomics* **74**, 2498–2509.
- Xu S., Guerra D., Lee U., Vierling E. (2013): S-nitrosogluthathione reductases are low-copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **4**, 430.
- Xu Y., Ding J., Wu L. Y., Chou K. C. (2013): iSNO-PseAAC: predict cysteine S-nitrosylation sites in proteins by incorporating position specific amino acid propensity into pseudo amino acid composition. *PLOS One* **8**, 55844
- Yang L., Zhang D., Liu H., Wei C., Wang J., Shen H. (2018): Effects of a nitric oxide donor and nitric oxide scavengers on *Sorbus pohuashanensis* embryo germination. *Journal of Forestry Research* **29**, 631-638.
- Yu M., Yun B. W., Spoel S. H., Loake G. J. (2012): A sleigh ride through the SNO: regulation of plant immune function by protein S-nitrosylation. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 424–430.
- Yun B. W., Feechan A., Yin M., Saidi N. B., Le Bihan T., Yu M., Moore J. W., Kang J. G., Kwon E., Spoel S. H., Pallas J. A., Loake G. J. (2011): S nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264-268.
- Zaffagnini M., Morisse S., Bedhomme M., Marchand C. H., Festa M., Rouhier N., Lemaire S. D., Trost P. (2013): Mechanisms of nitrosylation and denitrosylation of cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 22777–22789.
- Zandonadi D. B., Santos M. P., Dobbss L. B., Olivares F. L., Canellas L. P., Binzel M. L., Okorokova-Facanha A. L., Facanha A. R. (2010): Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta* **231**, 1026-1035.

8 Seznam použitých zkratk a symbolů

$^1\text{O}_2$	Singletový kyslík
2D-SNO-DIGE	Metoda 2D-Difference Gel Electrophoresis
ADH	Alkoholdehydrogenasa
BSA	Hovězí sérový albumin
BST	Metoda tzv. biotinového přepínače
cv.	Kultivar
DTT	Dithiothreitol
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GSH	Redukovaný glutathion
GSH-FALDH	Glutathion dependentní formaldehyddehydrogenasa
GSNHOH	N-hydroxysulfinamid
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSO ₂ H	Glutathionsulfinová kyselina
GSONH ₂	Glutathionsulfinamid
GSSG	Oxidovaný glutathion
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
HMGSH	S-(hydroxymethyl)glutathion
M	Kovy
MAT	Methioninadenosyltransferasa
MK	Mastné kyseliny
MMTS	S-methylmethanthiosulfonát
N ₂ O ₃	Oxid dusitý
NH ₂ OH	Hydroxylamin
-NO	Nitroso skupina
NO	Oxid dusnatý
NO ⁻	Nitroxylový aniont
NO [·]	Radikál oxidu dusnatého
NO ⁺	Nitrosioniový kationt
NO ₂	Oxid dusičitý
NO ₂ ⁻	Dusitany
NO ₃ ⁻	Dusičnany

NOS	Synthasa oxidu dusnatého
NR	Nitrátreduktasa
ns-1Hb	Nesymbiotický hemoglobin
O ₂	Bimolekulární kyslík
O ₂ ⁻	Superoxid
O ₂ ^{•-}	Superoxidový radikál
OH [•]	Hydroxylový radikál
ONOO ⁻	Peroxydusitan
PrxII E	Peroxiredoxin II E
PTIO	2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide
PVDF	Polyvinylidendifluoridová membrána
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RS ⁻	Thiolový aniont
RS [•]	Thiolový radikál
RSH	Thioly
RSNO	S-nitrosothioly
RUBISCO	Ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenia
SNO-RAC	Metoda -Nitrosothiols Resin-Assisted-Capture
SNOSID	Metoda S-Nitrosothiols-Site Identification
Trx	Thioredoxiny
TrxR	Thioredoxinreduktasa
Trx-S ₂	Thioredoxin v oxidované formě
Trx-SH ₂	Thioredoxin v redukované formě