

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Úloha reaktivních forem dusíku v regulaci aktivity  
enzymů S-nitrosylací u hrachu setého**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Kateřina Vrbová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph. D.</b>
Rok:	2019

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 13. 5. 2019

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, vstřícnost, cenné rady a poskytnutí literatury a materiálů k vypracování této práce. Dále děkuji Mgr. Janě Sekaninové, Ph.D., Mgr. Tereze Tiché, Ph.D. a Mgr. Janě Jahnové za pomoc při vypracování experimentální části práce.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Vrbová
Název práce	Úloha reaktivních forem dusíku v regulaci aktivity enzymů S-nitrosylací u hrachu setého
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

Reaktivní formy dusíku (RNS) a kyslíku (ROS) jsou signální molekuly, které v rámci reakce na biotický či abiotický stres spouští řadu obranných reakcí. Největší význam v signálních drahách RNS má S-nitrosylace, posttranslační modifikace proteinů, která spočívá v připojení nitroso skupiny (-NO) na cílové cysteinové residuum proteinu, což má za následek změnu jeho aktivity a funkce.

Cílem bakalářské práce bylo ověření možné regulace enzymů katabolismu polyaminů, aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) a diaminoxidasy (DAO) S-nitrosylací. Pro studium byly použity hrachové rekombinantní enzymy *PsAMADH1* a *PsAMADH2*, vyizolovaný enzym *PsDAO* a 7denní rostliny dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset). Jako donory NO byly aplikovány S-nitrosoglutathion (GSNO), nitroprussid sodný (SNP) a S-nitroso-N-acetylpenicilamin (SNAP), které se liší intenzitou uvolnění NO. V korelaci s výsledky z predikční studie byl zaznamenán inhibiční efekt donorů NO na aktivitu enzymů *PsAMADH*, zatímco aktivita *PsDAO* nebyla v důsledku zvýšené koncentrace NO ovlivněna. Inhibiční efekt NO na *PsAMADH* aktivitu byl detekován i po aplikaci donorů NO k růstovému médiu, ve kterém se nacházely 7denní rostliny hrachu setého. Regulace aktivity AMADH S-nitrosylací byla potvrzena nepřímo reakcí s redukčními činidly, jako je glutathion a dithiotreitol. V následujících experimentech je nutné regulaci AMADH S-nitrosylací dále potvrdit např. metodou biotin-switch v kombinaci s hmotnostní spektrometrií.

Klíčová slova	<i>Pisum sativum</i> , aminoaldehyddehydrogenasa, diaminoxidasa, reaktivní formy dusíku, oxid dusnatý, reaktivní formy kyslíku, polyaminy, S-nitrosylace
Počet stran	79
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Kateřina Vrbová
Title	The role of reactive nitrogen species in regulation of enzyme activities by S-nitrosylation in pea
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2019

### Abstract

Reactive nitrogen species (RNS) and reactive oxygen species (ROS) are signaling molecules that trigger a number of defense responses during biotic or abiotic stress. The highest importance in RNS signaling pathways plays post-translational modifications of proteins including S-nitrosylation, consists in attaching a nitroso group (-NO) to a corresponding cysteine residue of target protein, resulting in a change in its activity and function.

The aim of this thesis was to verify possible regulation by S-nitrosylation of aminoaldehyde dehydrogenase (AMADH) and diaminoxidase (DAO), key enzymes of polyamine catabolism. Two pea recombinant enzymes *PsAMADH1* and *PsAMADH2*, the isolated *PsDAO* enzyme and 7-days plants of two pea cultivars (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč and *Pisum sativum* cv. Twinset) were used for the study. Different nitric oxide (NO) donors were tested: S-nitrosoglutathione (GSNO), sodium nitroprusside (SNP) and S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP). In correlation with the results of the bioinformatic prediction study, the inhibitory effect of NO donors on the activity of *PsAMADH* enzymes was observed, while *PsDAO* activity was not affected. The inhibitory effect of NO on *PsAMADH* activity was also detected after application of NO donors to the growth medium of 7-days pea plants. Regulation of AMADH activity by S-nitrosylation was confirmed indirectly by reaction with reducing agents such as glutathione and dithiothreitol. In the following experiments it is necessary to further confirm the AMADH regulation by S-nitrosylation, e.g. by biotin-switch method in combination with mass spectrometry.

Keywords	<i>Pisum sativum</i> , aminoaldehyde dehydrogenase, diamine oxidase, reactive nitrogen species, nitric oxide, reactive oxygen species, polyamines, S-nitrosylation
Number of pages	79
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>10</b>
2.1 REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU .....	10
2.1.1 OXID DUSNATÝ .....	12
2.1.2 POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE PROTEINŮ ZPROSTŘEDKOVANÉ REAKTIVNÍMI FORMAMI DUSÍKU .....	14
2.1.3 DONORY NO .....	24
2.1.4 MOŽNÁ ÚLOHA DONORŮ NO V OCHRANĚ ROSTLIN .....	30
2.2 POLYAMINY .....	32
2.2.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA POLYAMINŮ .....	32
2.2.2 BIOSYNTÉZA A DEGRADACE POLYAMINŮ.....	33
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>38</b>
3.1 MATERIÁL A METODY .....	38
3.1.1 CHEMIKÁLIE .....	38
3.1.2 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ .....	38
3.1.3 ROSTLINNÝ MATERIÁL.....	39
3.1.4 PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU.....	39
3.1.5 ZPRACOVÁNÍ ROSTLINNÉHO MATERIÁLU .....	40
3.1.6 STANOVENÍ PROTEINŮ .....	40
3.1.7 STANOVENÍ AKTIVITY AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY .....	41
3.1.8 STANOVENÍ AKTIVITY DIAMINOXIDASY .....	42
3.1.9 DETEKCE AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY METODOU WESTERN BLOT.....	43
3.1.10 HISTOCHEMICKÁ DETEKCE REAKTIVNÍCH FOREM DUSÍKU S VYUŽITÍM FLUORESCENČNÍ SONDY.....	45
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>46</b>
4.1 PREDIKCE MOŽNOSTI S-NITROSYLACE.....	46
4.2 VLIV DONORŮ NO NA AKTIVITU DIAMINOXIDASY .....	51
4.3 VLIV DONORŮ NO NA AKTIVITU AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY .....	53
4.3.1 VLIV KONCENTRACE DONORŮ NO.....	53
4.3.2 VLIV DOBY INKUBACE DONORŮ NO .....	54
4.3.3 VLIV APLIKACE DONORŮ NO NA AKTIVITU AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY V EXTRAKTECH HRACHU SETÉHO.....	56
4.4 VLIV DONORŮ NO NA AKTIVITU AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY PO APLIKACI DO RŮSTOVÉHO MEDIA .....	63
4.4.1 PRODUKCE NO .....	63
4.4.2 VLIV DONORŮ NO NA AKTIVITU AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY PO APLIKACI DO RŮSTOVÉHO MÉDIA.....	66
4.4.3 WESTERN BLOT .....	69
<b>5 ZÁVĚR</b> .....	<b>72</b>

<b>6 LITERATURA .....</b>	<b>73</b>
<b>7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>78</b>

## Cíle práce

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

- 1) reaktivních forem kyslíku a dusíku a jejich role v regulaci aktivity proteinů posttranslačními modifikacemi.
- 2) enzymů metabolismu polyaminů (tj. aminoaldehyddehydrogenasy a diaminoxidasy) a jejich zapojení v mechanismu obranných reakcí rostlin.

V experimentální části je cílem práce studium úlohy reaktivních forem dusíku v regulaci aktivity enzymů zapojených v metabolismu polyaminů hrachu setého:

- 1) Studium vlivu aplikace donoru NO na aktivitu připravených enzymů aminoaldehyddehydrogenasy a diaminoxidasy
- 2) Studium vlivu aplikace donoru NO ke kořenovému systému 7denních semenáčků hrachu setého (dva kultivary *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset) na aktivitu aminoaldehyddehydrogenasy a diaminoxidasy.
- 3) Studium možností regulace aktivity enzymů aminoaldehyddehydrogenasy a diaminoxidasy posttranslační modifikací typu S-nitrosylace.



# 1 ÚVOD

Reaktivní formy dusíku (RNS) jsou významné signální molekuly, které se v rostlinách účastní mnoha fyziologických procesů. Důležitou roli hrají v obranných reakcích na biotický či abiotický stres, kdy mohou mít dle intenzity působení pozitivní či negativní vliv na rostlinu. Mezi RNS se řadí např. radikály oxidu dusnatého (NO), oxid dusičitý (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), nitrosyl (NO<sup>+</sup>) či peroxydusitan (ONOO<sup>-</sup>). Klíčovou roli má NO. Je to velmi reaktivní molekula s krátkou životností, jejíž signální dráhy mohou vést k modulaci funkcí cílových proteinů v posttranslačních modifikacích (PTM-NO) (Corpas a Barroso, 2015). Mezi PTM-NO patří např. metalonitrosylace, kdy se NO váže na přechodné kovy. Dále se jedná o nitraci, kdy NO reaguje se superoxidovým radikálem (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) za vzniku ONOO<sup>-</sup>, který interaguje s tyrosinovým residuem proteinu. Poslední a velmi důležitou modifikací je S-nitrosylace, kdy dochází k reakci NO s cysteinovým residuem proteinu za vzniku S-nitrosothiolu (RSNO) (Fancy *et al.*, 2017). Nízkomolekulární sloučenina S-nitrosoglutathion (GSNO) může NO molekulu uvolnit či přenést na jinou thiolovou skupinu. Hladina GSNO je regulována enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR; EC 1.1.1.284). Další katabolická reakce GSNO probíhá za katalýzy thioredoxinreduktasy (TrxR; EC 1.8.1.9) (Sengupta a Holmgren, 2012).

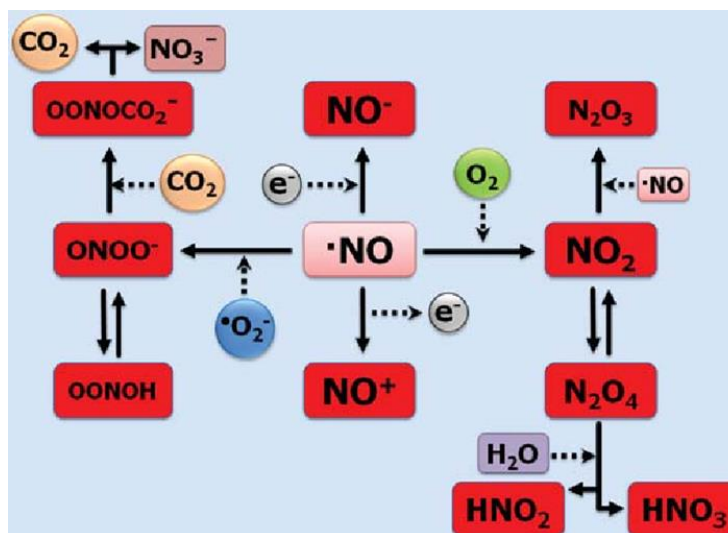
Polyaminy (PA) jsou alifatické kationty, které se vyskytují v prokaryotních i eukaryotních buňkách. Polyaminy zastávají řadu významných rolí v buňce. Regulují buněčné dělení, diferenciaci, organogenezi, reprodukci či senescenci. Účastní se také reakcí na vnější podněty, tj. působení biotických či abiotických stresových faktorů (Miller *et al.*, 2010). Na katabolismu PA v rostlinách se podílí enzymy polyaminoxidasy (PAO), diaminoxidasy (DAO) a aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH). FAD-dependentní PAO katalyzují oxidační štěpení sekundární aminoskupiny PA za vzniku peroxidu vodíku a příslušného aminoaldehydu a diaminu. Diaminy jsou za katalýzy DAO obsahující měď oxidovány v místě primární aminoskupiny na peroxid vodíku, amoniak a příslušný aminoaldehyd. AMADH katalyzují oxidaci aminoaldehydu na příslušnou aminokyselinu za současné redukce NAD<sup>+</sup>.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

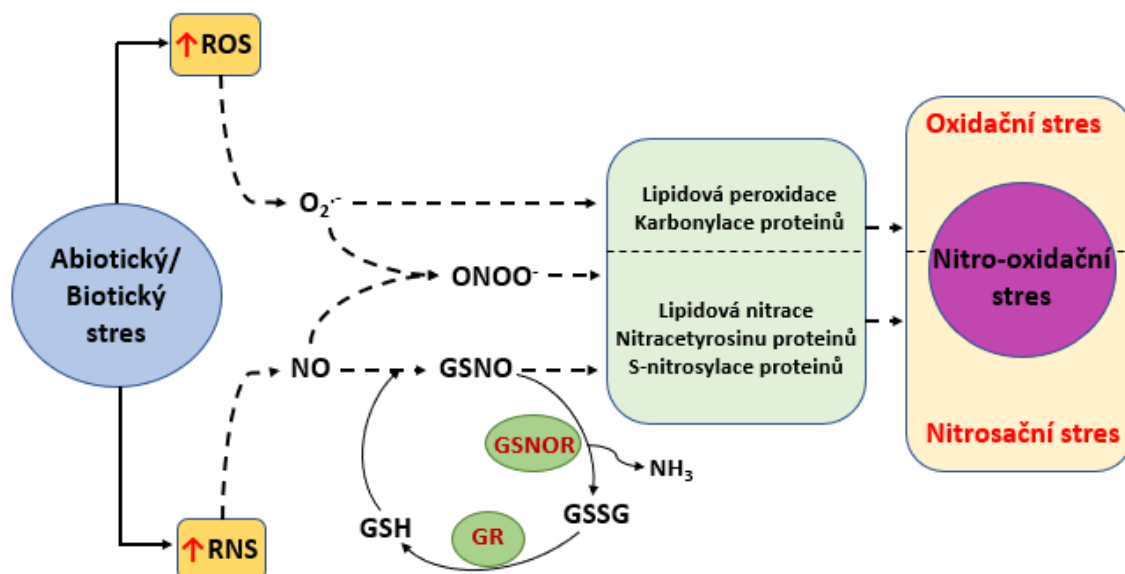
### 2.1 Reaktivní formy dusíku

Rostliny jsou během svého životního cyklu neustále vystavovány různým stresovým podmínkám. V přenosu stresového signálu a příslušné odezvě na tento signál hrají klíčovou roli reaktivní formy kyslíku (ROS) a také molekuly RNS, zejména NO. Peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoxidový a hydroxidový radikál ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ ) či singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ) se řadí mezi ROS (Halliwell, 2007). K RNS patří peroxydusitan ( $\text{ONOO}^-$ ), oxid dusitý a dusičitý ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $\text{NO}_2$ ) (Obr. 1) (Mittler, 2002).

Zvýšené koncentrace NO a ROS, v závislosti na schopnosti aktivace příslušných antioxidačních systémů, vedou k nitrosačnímu a oxidačnímu stresu (Obr. 2) (Corpas a Barroso, 2013).

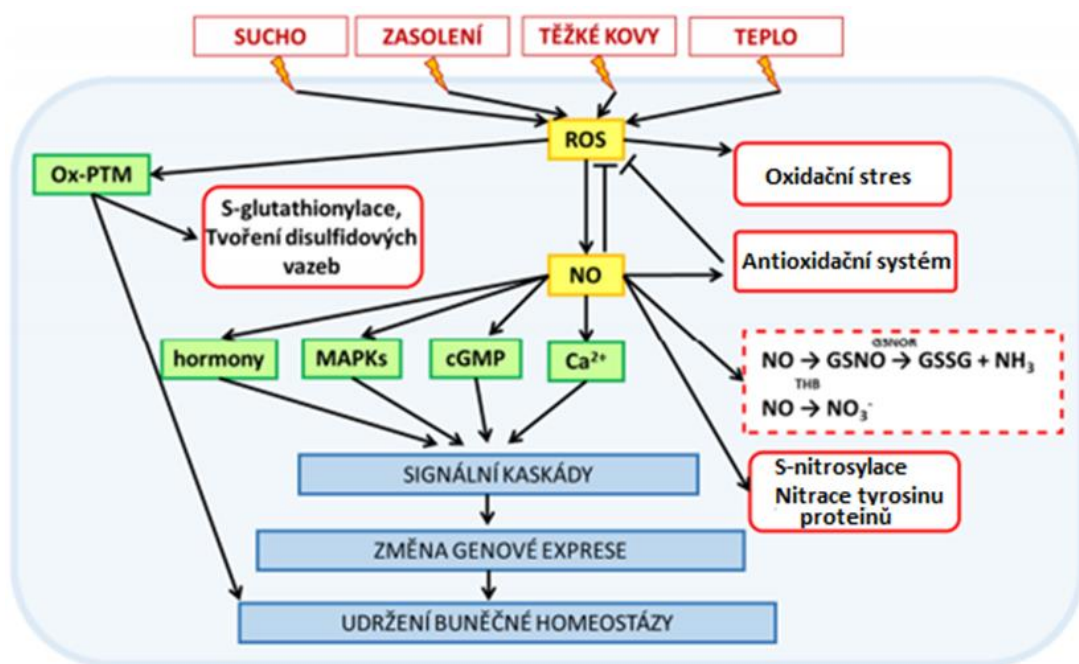


Obr. 1 Schéma přeměny reaktivních forem dusíku (RNS). (Převzato z Tharmalingam *et al.*, 2017)



Obr. 2 Nitro-oxidační stres vzniká reakcí RNS a ROS jako odpověď na abiotický/biotický stres způsobený poškozením buňky (Corpas a Barroso, 2013).

Mezi abiotické stresové podmínky řadíme například sucho, salinitu, působení těžkých kovů, vysoké teploty, deficienci živin či UV záření. Těmito procesy je omezen vývoj rostliny. Během evoluce si rostlina vytvořila adaptivní mechanismy umožňující překonání nepříznivých a neustále se měnících podmínek. Dle intenzity působení stresového faktoru dochází k buněčné signalizaci zajišťující příslušnou obrannou odpověď. Klíčovou molekulou v tomto procesu je molekula NO, která hraje důležitou roli často i v interakci s ROS např. v modulaci genové exprese, změně aktivity enzymů nebo regulaci produkce rostlinných hormonů (Obr. 3) (Simontacchi *et al.*, 2015).



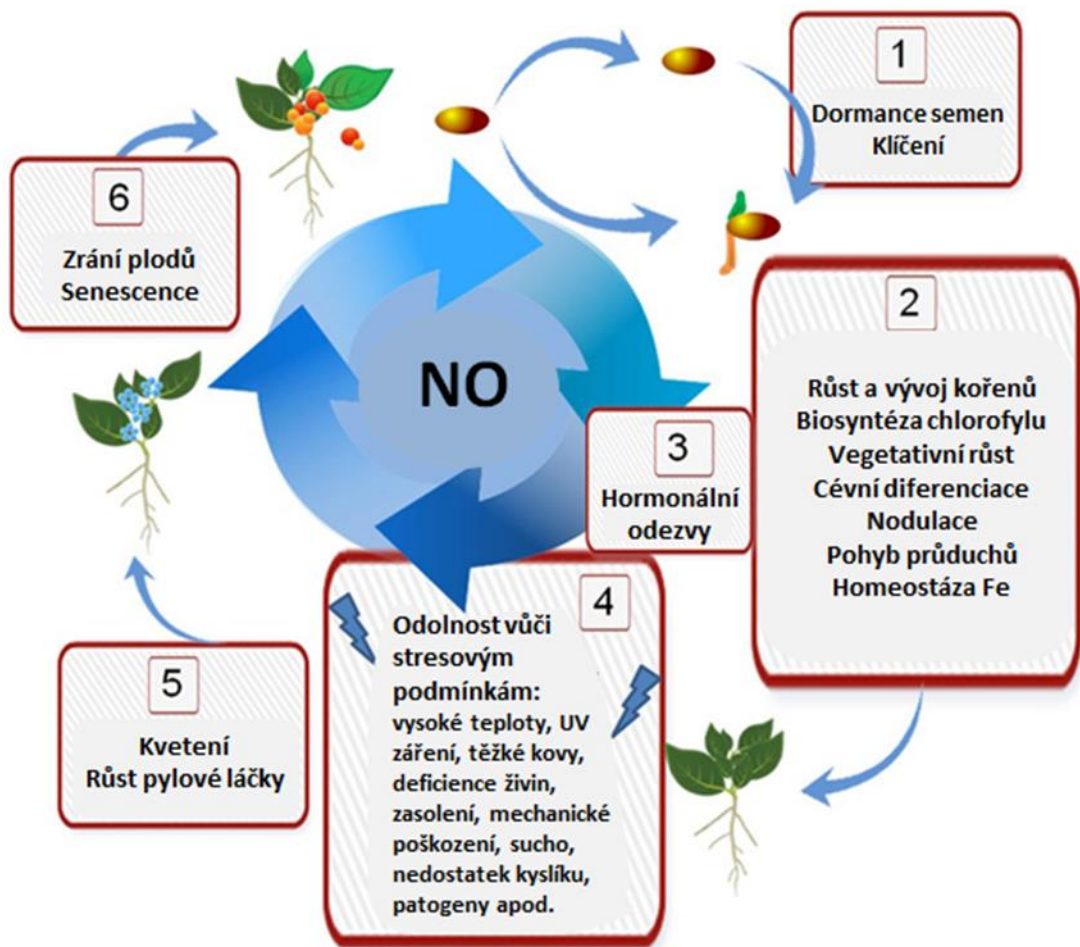
Obr. 3 Schematické znázornění interakcí mezi NO, ROS a dalšími signálními molekulami v reakci na abiotický stres. Signální molekuly zahrnují hormony, mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK), cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) a vápenaté ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ). NO a ROS také přenášejí signály pomocí posttranslačních modifikací, mezi které patří nitrace tyrosinu, S-nitrosylace nebo oxidační posttranslační modifikace (Ox-PTM). ROS, způsobující oxidační stres, mohou být degradovány antioxidačním systémem, který je stimulován molekulami NO. S-nitrosylací glutathionu vzniká S-nitrosoglutathion (GSNO), jehož hladina je regulována enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR). (Převzato z Farnese *et al.*, 2016)

### 2.1.1 Oxid dusnatý

Z chemického hlediska je NO bezbarvý plyn a jeho volný radikál  $\text{NO}^\bullet$  má krátkou životnost (při vyšších koncentracích je  $t_{1/2} < 6$  s). Přítomnost nepárového elektronu ve valenční vrstvě způsobuje jeho vysokou reaktivitu. Molekula NO interaguje s širokou škálou cílových biomolekul – DNA, proteiny či mastnými kyselinami. Může docházet k tvorbě vazby s reaktivním kyslíkem, sírou, dusíkem či uhlíkem. Interakce NO s cílovými molekulami mohou vést např. ke změně funkcí proteinů, přeprogramování genové exprese a aktivaci signálních kaskád.

Molekula NO díky lipofilnímu charakteru volně difunduje přes buněčné membrány. NO hraje důležitou roli v biologických a fyziologických procesech rostlin jako signální molekula, např. při klíčení a dormanci semen, růstu a vývoji kořenů, gravitropismu, buněčné smrti atd. (Obr. 4) (Yu *et al.*, 2014). V závislosti na dostupných podmínkách v buňce (lokální koncentrace NO, místo syntézy, rovnováha koncentrace mezi NO a ROS, aktivace antioxidačních systémů apod.) zastává NO funkci ochrannou ( $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ -

$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace NO) nebo toxickou ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace NO) vyvolávající indukci nitrosačního stresu a buněčné smrti. NO hraje zásadní roli jak za fyziologických podmínek, tak i v reakci na stres, např. v imunitní odpovědi na napadení rostlin patogeny či působení abiotických faktorů (Obr. 4). NO, stejně jako ROS, spouští reakci přenosu signálu vedoucí k expresi genů, které zajišťují toleranci rostliny ke stresovým podmínkám. Dále regulují odpovědi spojené s programovanou buněčnou smrtí, buněčnou hypersenzitivitou a stárnutím rostliny (Obr. 4) (Sami *et al.*, 2018; Sahay a Gupta, 2017).

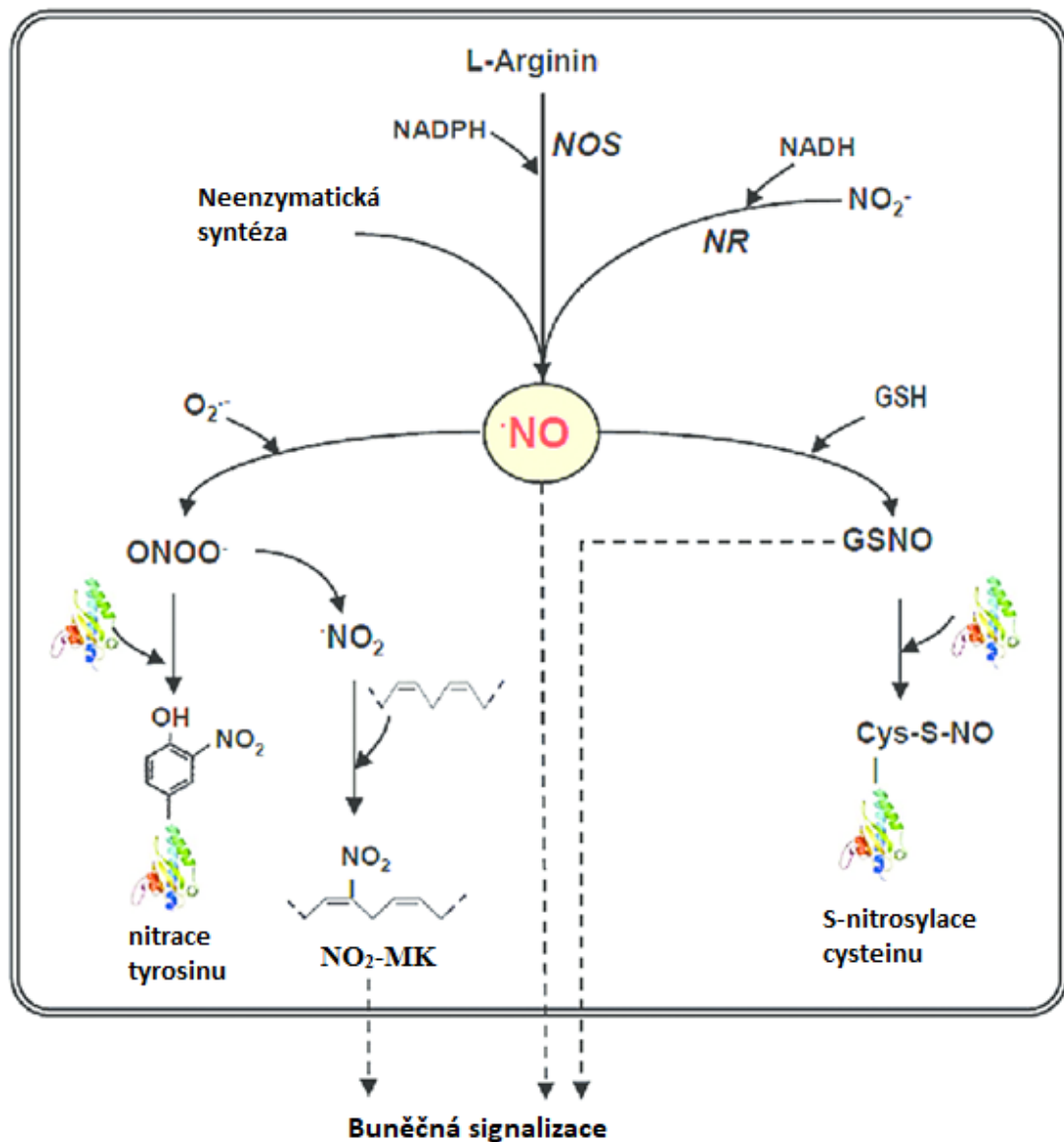


Obr. 4 Role oxidu dusnatého (NO) u rostlin. NO se účastní vývoje rostlin prostřednictvím interakcí s hormony, ROS,  $\text{Ca}^{2+}$  a posttranslačních modifikací proteinů. Na obrázku je uveden významný vliv NO na řadu fyziologických pochodů rostlin a obranné mechanismy při působení stresových faktorů. (Upraveno dle Simontacchi *et al.*, 2015)

V rostlině je NO syntetizován v různých buněčných organelách, jako jsou mitochondrie, chloroplasty, peroxisomy, cytoplasma, endoplasmatické retikulum a apoplast. Syntéza může probíhat oxidační či redukční cestou v závislosti na přítomnosti enzymů. Enzymová redukční cesta zahrnuje reakce spojené s xanthinoxidoreduktasou (XOD, EC 1.1.3.22) a nitrátreduktasou (NR, EC 1.6.6.1). Oxidační cesta zahrnuje reakce spjaté s přeměnou L-Argininu. První dráha je závislá na enzymové aktivitě tzv. NO-synthasy (NOS, EC 1.14.13.39) – uváděné v literatuře často jako enzym podobný NOS (NOS-like), protože jeho přítomnost nebyla u rostlin doposud jednoznačně prokázána. Jako další možné dráhy produkce NO se uvádějí mechanismy související s přeměnou polyaminů a hydroxylaminů, které také nebyly doposud přesněji charakterizovány. (Domingos *et al.*, 2015; Hancock a Neill, 2019).

### **2.1.2 Posttranslační modifikace proteinů zprostředkované reaktivními formami dusíku**

Molekula NO je schopná procházet lipidovými membránami, což umožňuje interakci s řadou dalších makromolekul. Příkladem bioaktivity NO jsou PTM-NO, které umožňují změnit funkci cílových proteinů (Astier a Lindermayr, 2012) (Obr. 5). Mezi PTM-NO patří metalonitrosylace, kdy dochází k vazbě NO na přechodné kovy, např. železo, měď či zinek. Tato reakce blokuje peroxidaci kovu a tím zabraňuje tvorbě ROS (Wink *et al.*, 2001). Další PTM-NO je nitrace tyrosinu, kdy molekula NO reaguje se superoxidovým radikálem za vzniku peroxydusitanu, který poté interaguje s aromatickým jádrem tyrosinového residua proteinu (Radi, 2004). Vznik peroxydusitanu nastává při intenzivním působení stresových faktorů na rostliny (Mur *et al.*, 2013). Poslední PTM-NO je S-nitrosylace, jejíž mechanismus je popsán v následující kapitole. Patří mezi klíčové mechanismy zprostředkované NO při reakci na stres (Fancy *et al.*, 2017).

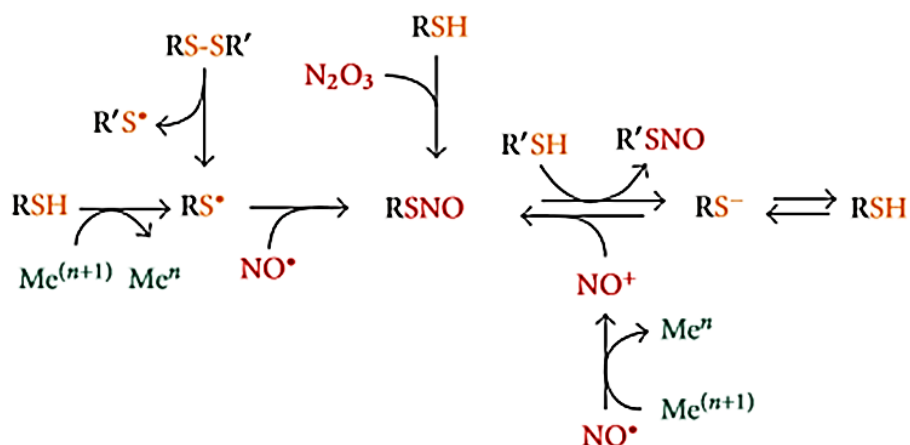


Obr. 5 Schéma posttranslační modifikace zprostředkovaných NO v rostlinných buňkách. NO vytvořený buď L-Arginin-dependentní NO-synthasou (NOS), nitrátreduktasou (NR) či neenzymovou dráhou může reagovat s redukováným glutathionem (GSH) za vzniku S-nitrosoglutathionu (GSNO), který může poskytovat S-nitrosylační reakce. NO může reagovat také se superoxidovým radikálem ( $O_2^{\cdot-}$ ) za vzniku peroxydusitanu ( $ONOO^{\cdot-}$ ), který působí jako silný oxidant zprostředkovávající nitraci tyrosinových residuí v proteinech. Při přeměně  $ONOO^{\cdot-}$  na radikál  $NO_2^{\cdot}$  jako meziprodukt může dojít k nitraci mastných kyselin (MK). NO, GSNO a  $NO_2$ -MK se účastní buněčné signalizace, stejně jako S-nitrosylované proteiny. (Upraveno dle Corpas *et al.*, 2015).

### 2.1.2.1 Charakterizace S-nitrosylace

S-nitrosylace je posttranslační modifikace probíhající bez enzymové katalýzy, kdy dochází ke kovalentní vazbě -NO skupiny na thiolovou skupinu cysteinových residuí proteinů. Touto reverzibilní reakcí vzniká S-nitrosothiol (RSNO), který je stabilnější v porovnání se samotným NO, jehož životnost je přibližně 5-15 s (Lancaster, 1997;

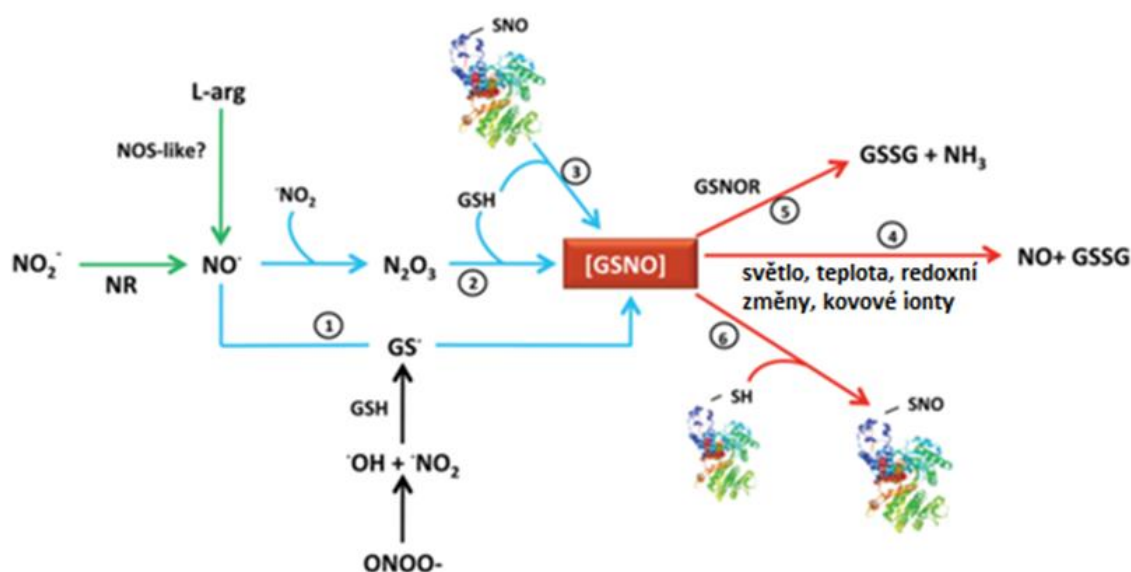
Williams, 1999). Regulace funkce proteinů S-nitrosylací probíhá několika způsoby. Nejčastěji změnou aktivity enzymů, dále změnou lokalizace proteinů nebo jejich interakcí s jinými proteiny. Takto regulované proteiny hrají důležitou roli v metabolismu a signalizaci zprostředkované NO (Hess *et al.*, 2012; Astier *et al.*, 2011). V současné době je řada studií zaměřena na roli S-nitrosylace proteinů v reakci rostlin na působení stresových faktorů. Za velmi důležitou signální formu RSNO v rostlině je považován S-nitrosoglutathion (GSNO). Existuje několik způsobů vzniku RSNO, jejichž mechanismy jsou popsány na Obr. 6 (Di Giacomo *et al.*, 2012).



Obr. 6 Mechanismy S-nitrosylace. Nízkomolekulární sloučeniny obsahující cystein (např. GSH) a proteiny s volnými sulfhydrylovými skupinami (označované jako RSH) mohou podstoupit S-nitrosylaci za vzniku S-nitrosothiolu (RSNO). RSNO může být tvořen při reakci NO• s RS•, který vzniká buď oxidací RSH katalyzovanou kovem, či homolytickým štěpením disulfidové vazby RS-SR' (vlevo). Nicméně, kvůli nestabilitě RS•, je pravděpodobnější vznik RSNO z thiolové skupiny cysteinu (RS-), který může vznikat deprotonací síry i při fyziologickém pH. Thiolová skupina cysteinu může podléhat nitrosylaci i reakcí s N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, nebo přímo s NO<sup>+</sup> tvořeným oxidací NO• za katalýzy kovem. Další reakce probíhající v buňce, při níž se tvoří RSNO, je transnitrosylace. RSNO může přenést svůj NO<sup>+</sup> na jiný R'S- za vzniku R'SNO. (Převzato z Di Giacomo *et al.*, 2012).

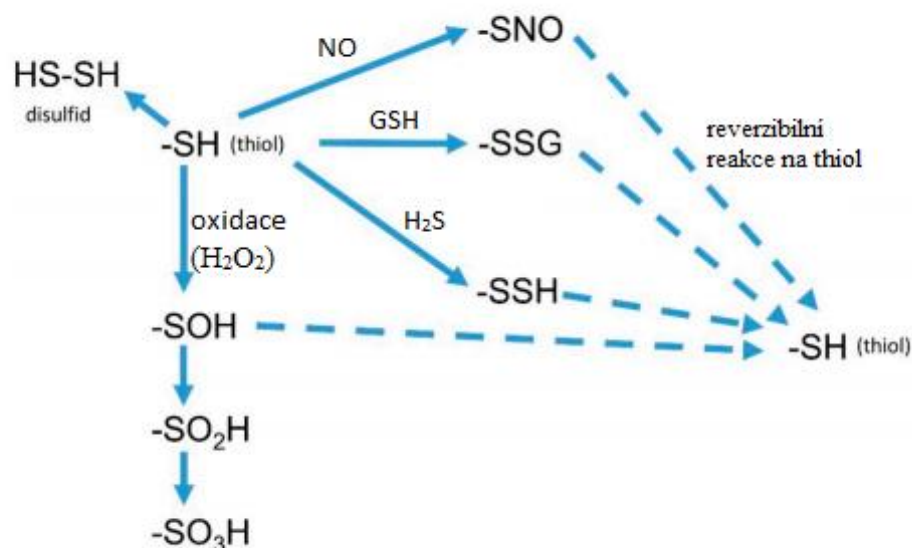


Za určitých podmínek může GSNO reaktivní molekulu NO uvolnit či ji přenést na jinou thiolovou skupinu v procesu transnitrosace (Obr. 7) (Martínez-Ruiz a Lamas, 2004). GSNO vzniká zejména za aerobních podmínek z glutathionu (GSH), což je neproteinový tripeptid složený z glutamové kyseliny, cysteinu a glycinu ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) (Hess *et al.*, 2012). GSH je antioxidant, který může podstoupit mnoho redoxních reakcí. Hraje důležitou roli v mnoha biosyntetických drahách. Vyskytuje se v poměrně vysoké koncentraci ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) vzhledem k jiným thiolům v buňce. Podle aktuálních podmínek v buňce se vyskytuje v redukovaném (GSH) či oxidovaném stavu (GSSG), je tedy důležitý pro udržení redoxní homeostázy (Noctor *et al.*, 2012).



Obr. 7 Vznik a regulace hladiny S-nitrosoglutathionu (GSNO) v rostlinách: Hladina GSNO je regulována jeho syntézou (modré šipky) a následnou degradací (červené šipky). Hlavními zdroji NO v rostlinách jsou enzym nitrátreduktasa (NR) a enzym podobný synthase oxidu dusnatého (NOS-like), který nebyl doposud identifikován (zelené šipky). Nicméně NO nereaguje s glutathionem (GSH) přímo, ale přes reakci s glutathionylovými radikály (1), které jsou pravděpodobně tvořeny při stresových podmínkách, nebo přes oxid dusitý ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), který S-nitrosyluje GSH (2). Dalším zdrojem GSNO je reakce GSH s S-nitrosothioly (RSNO), které mohou poskytnout NO skupinu (3). Snížení hladiny GSNO může být způsobeno teplotou, světlem, redoxními změnami, kovovými ionty (4), aktivitou enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) (5) či transnitrosylačními procesy (6). (Převzato a upraveno dle Begara-Morales *et al.*, 2018).

Thiolová skupina může být posttranslačně modifikována také oxidací, S-persulfidací pomocí  $\text{H}_2\text{S}$ , glutathionylací pomocí GSH, či reakcí s jinou thiolovou skupinou za vzniku disulfidu (Obr. 8). Reaktivní signální molekuly spolu soutěží při vazbě na thioly (Hancock *et al.*, 2017). Některé tyto modifikace mohou způsobit změnu jiných signalizačních drah zprostředkované jinými signalizačními molekulami. Např. při reakci  $\text{ONOO}^-$  s Tyr residuem enzymu superoxidodismutasy (SOD, EC 1.15.1.1) dojde k ovlivnění její aktivity prostřednictvím nitrace a následnému snížení schopnosti buňky odstranit superoxidové anionty, což dále ovlivní signalizační dráhy ROS, kdy vzniká  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Holzmeister *et al.*, 2015). Stejným způsobem může NO ovlivnit aktivitu katalasy (CAT, EC 1.11.1.6) a snížit tak schopnost buňky odstranit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bauer, 2015).



Obr. 8 Posttranslační modifikace thiolových skupin. Reakce zahrnují S-nitrosylaci a oxidaci. (Převzato a upraveno dle Hancock a Neill, 2019).

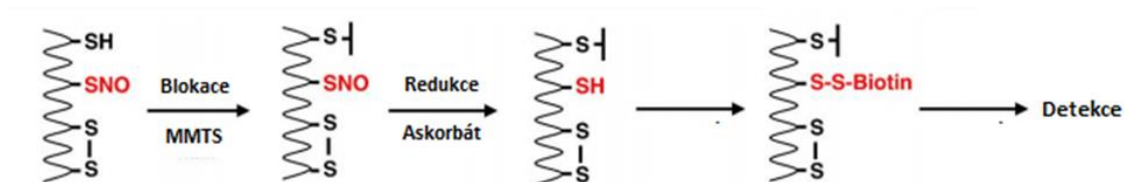
### 2.1.2.2 Analýza S-nitrosothiolů

S rozvojem moderních instrumentálních metod a narůstajících požadavků na jejich citlivost byla intenzivně vyvíjena a modifikována řada metodických přístupů pro sledování hladin RSNO. Pro stanovení celkového obsahu RSNO, tzn. nízkomolekulárních a proteinových RSNO, se nejčastěji využívá kvantifikace reaktivního NO. V přítomnosti přechodných kovů, např.  $\text{Hg}^{2+}$  či  $\text{Cu}^+$  iontů či fotolýzou, se nestabilní RSNO rozkládají a uvolněné molekuly NO z thiolové skupiny jsou následně detekovány kolorimetrickými, fluorescenčními, chemiluminiscenčními či elektrochemickými metodami (Diers *et al.*, 2014).

Nejstarší používaná metoda pro stanovení koncentrace RSNO je kolorimetrická Savillova metoda, která je založena na reakci uvolněných dusitanů z RSNO s Griessovým činidlem za přítomnosti  $\text{Hg}^{2+}$  solí (Saville, 1958). U velmi citlivé chemiluminiscenční metody (nanomolární až pikomolární koncentrace, Hetrick a Schoenfisch, 2009) dochází k reakci uvolněného plynného NO s ozonem za vzniku  $\text{NO}_2$ , který je v excitovaném stavu. Při návratu excitovaných molekul na jejich základní hladinu dochází k vyzáření fotonů, které je přímo úměrné množství uvolněného NO ze vzorku (Gow *et al.*, 2007). NO lze taktéž detekovat elektrochemicky pomocí elektrod citlivých na uvolněný NO (Allen *et al.*, 2005) či pomocí elektronové paramagnetické rezonance (EPR) (Hogg, 2010). Dále je často využívána fluorescenční metoda založená na reakci NO s barvivem, jako je např. 4,5-diaminofluorescein, N-(1-naftyl)-ethylendiamin nebo 2,3-diaminonaftalen pro detekci nanomolárních koncentrací NO (Kostka a Park, 1999). Nedávno byla úspěšně zavedena spektrofluorimetrická metoda pro kvantifikaci RSNO v rostlinných extraktech pomocí diamino-rhodaminového barviva DAR 4-M. Rostlinný vzorek/standard GSNO byl smíchán s DAR 4-M, polovina objemu byla uchována ve tmě po dobu 5 min a druhá polovina byla po stejnou dobu umístěna do UV transiluminátoru. Vlivem UV záření došlo k rozkladu RSNO a následnému uvolnění NO, který byl poté fluorimetricky kvantifikován (excitace 560 nm, emise 575 nm). Pro výpočet koncentrace RSNO byl použit rozdíl naměřené fluorescence mezi UV-ošetřeným vzorkem a vzorkem inkubovaným ve tmě, hodnoty koncentrací byly poté odečteny ze standardní křivky pro GSNO. V porovnání se Savillovou metodou je tato metoda značně citlivější a oproti

instrumentálně náročným metodám – chemiluminiscenční či EPR detekci, umožňuje snazší a rychlejší detekci RSNO v rostlinných extraktech (Mioto *et al.*, 2017).

Vzhledem k nízké abundanci a nestabilitě S-nitrosylovaných proteinů je v současné době jejich přímá detekce *in vivo* stále předmětem studia (Ruiz-May *et al.*, 2019). K nepřímé detekci S-nitrosylovaných proteinů v extraktech byla vyvinuta metoda značení pomocí tzv. biotinového přepínače (biotin-switch technique (BST)) (Jaffrey *et al.*, 2001), která byla v práci Lindermayr *et al.* (2005) úspěšně zavedena i pro rostlinné extrakty. Princip metody BST spočívá v reverzibilním značení S-nitrosylovaných cysteinových residuí pomocí modifikovaného biotinu. V prvním kroku BST dochází pomocí činidla S-methylmethanthiosulfonátu (MMTS) k zablokování volných -SH skupin proteinu, které nejsou S-nitrosylovány. V druhém kroku dochází pomocí askorbátu k redukci S-nitrosylovaných proteinů za vzniku thiolů a nestabilního o-nitrosoaskorbátu. V posledním kroku dochází ke značení vzniklých thiolů pomocí činidla biotinu-HPDP (N-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamid). Takto biotinem označené proteiny mohou být detekovány anti-biotin protilátkou metodou Western blot nebo mohou být purifikovány afinitní chromatografií na neutravidin-agarosové matici (Obr. 9) (Forrester *et al.*, 2009).



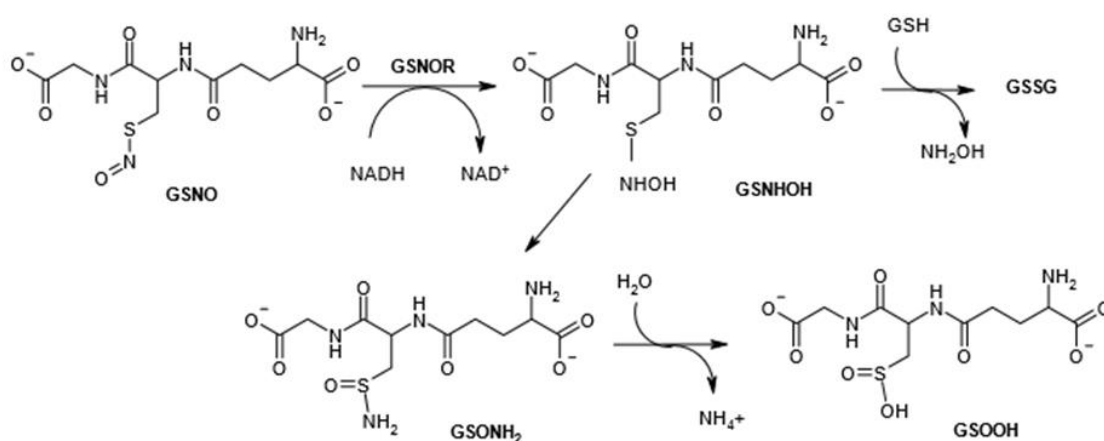
Obr. 9 Princip metody biotinového přepínače (BST). (Převzato a upraveno dle Lindermayr a Durner, 2009).

## 2.1.2.3 Enzymy podílející se na regulaci intenzity S-nitrosylace

### 2.1.2.3.1 S-nitrosoglutathionreduktasa

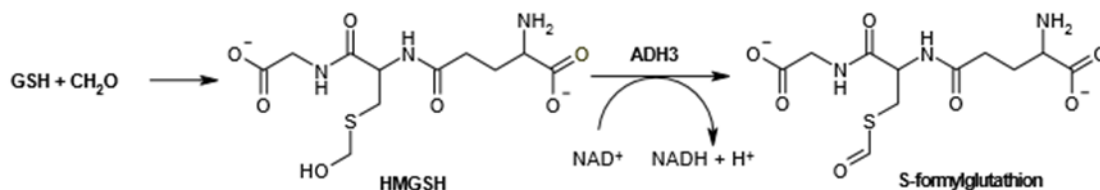
Enzym S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR, EC 1.1.1.284) je klíčovým enzymem katabolismu GSNO a hraje velmi důležitou roli v metabolismu RSNO v rostlinných buňkách. Dle EC nomenklatury je GSNOR zařazena mezi zinek-dependentní alkoholdehydrogenasy – konkrétně do třídy III (ALDH3), ale za fyziologicky významnější se považuje právě reduktasová reakce (Staab *et al.*, 2008a). Enzym GSNOR má homodimerní strukturu. Každý monomer obsahuje katalytickou doménu, v které jsou vázány dva atomy zinku, a menší nekatalytickou doménu s vazebným místem pro koenzym. Katalýzy se účastní pouze jeden atom zinku, zatímco druhý atom má pouze funkci strukturní (Sanghani *et al.*, 2003).

Při NADH-dependentní redukci GSNO dochází ke vzniku nestabilního N-hydroxysulfinamidu (GSNHOH). Další krok je závislý na koncentraci GSH v buňce. Při nadbytku GSH dochází k uvolnění  $\text{NH}_4\text{OH}$  a glutathiondisulfidu (GSSG), při nedostatku GSH je molekula GSNHOH přeskupena na glutathionsulfinamid (GSONH<sub>2</sub>). Tento produkt je následně v kyselém prostředí hydrolyzován na glutathionsulfinovou kyselinu (GSO<sub>2</sub>H) za uvolnění amoniaku (Obr. 10) (Jensen *et al.*, 1998).



Obr. 10 NADH-dependentní redukce GSNO katalyzovaná GSNOR. GSNHOH – N-hydroxysulfinamid, GSSG – glutathiondisulfid, GSONH<sub>2</sub> – glutathionsulfinamid, GSOOH – glutathionsulfinová kyselina. (Převzato a upraveno z Jensen *et al.*, 1998).

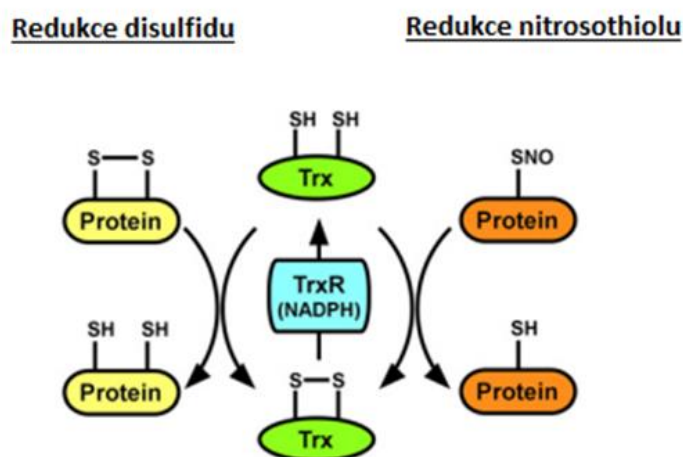
Dalším důležitým faktorem je dostatek koenzymu NADH, kdy při jeho vyšší hladině dochází k vyšší redukci GSNO. K tvorbě NADH může docházet v rámci dehydrogenasového modu katalyzovaného ALDH3, kdy reakcí GSH s formaldehydem vzniká S-(hydroxymethyl)glutathion (HMGSH) (Obr. 11) (Staab *et al.*, 2008b). Tato reakce je důležitá při intracelulární detoxifikaci formaldehydu. Vzniklý S-formylglutathion je dále hydrolyzován prostřednictvím aktivity S-formylglutathionhydrolasy (EC 3.1.2.12) (Espunya *et al.*, 2006).



Obr. 11 Reakce katalyzovaná ALDH3. V dehydrogenasovém modu dochází k oxidaci S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGSH), aduktu formaldehydu (CH<sub>2</sub>O) a glutathionu (GSH), na S-formylglutathion. (Převzato a upraveno z Jensen *et al.* (1998)).

### 2.1.2.3.2 Thioredoxinreduktasa

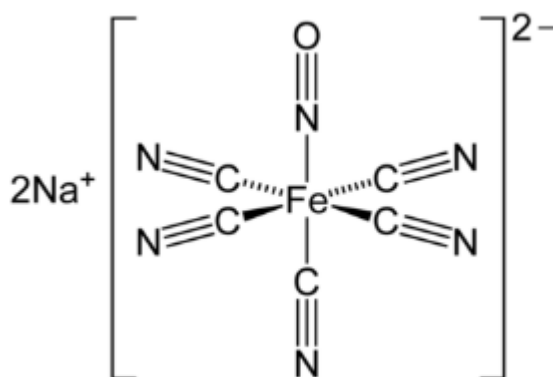
Katabolismu RSNO se účastní také enzym thioredoxinreduktasa (TrxR, EC 1.8.1.9) společně s thioredoxinem (Trx) a NADPH (Holmgren, 1985; Holmgren a Lu, 2010). Rostlinná TrxR je homodimer obsahující kofaktor FAD a cysteinová residua v aktivním místě. Jedná se o selenoenzym, který redukuje Trx v oxidovaném stavu s využitím NADPH jako donoru elektronů (Obr. 12). U rostlin bylo detekováno až 19 isoform Trx (Schurmann a Buchanan, 2008). Trx má mnoho funkcí, jako je donor elektronů při syntéze DNA katalyzované ribonukleotidreduktasou, či je zahrnut v obraně proti oxidačnímu stresu, signalizaci a redoxní regulaci (Lillig a Holmgren, 2007). Trx obsahuje disulfidové aktivní místo umožňující redukcí cysteinových residuí cílových proteinů (Meyer *et al.*, 2008).



Obr. 12 Role Trx při redukcí proteinů. Trx obsahuje dithiolovou skupinu, pomocí které je schopen redukovat disulfidovou a nitrosothiolovou skupinu proteinu na volnou -SH skupinu. Zoxidovaný Trx je zpětně aktivován pomocí TrxR a NADPH. (Převzato a upraveno dle Benhar, 2015).

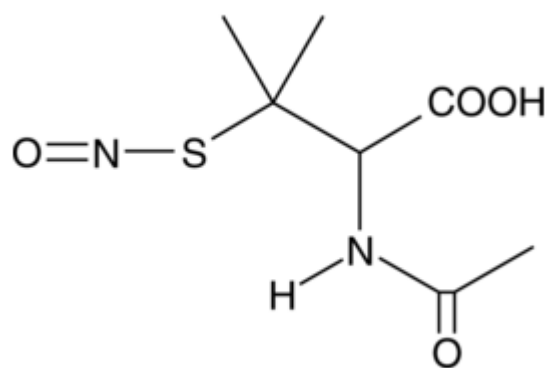
### 2.1.3 Donory NO

Pro objasnění biologické role NO v živých organismech jsou hojně využívány sloučeniny uvolňující exogenní NO do biologického systému, tedy donory NO. Jsou studovány pro jejich schopnost vyvolat v rostlině příslušnou biologickou odpověď. Pro stanovení vztahu mezi NO a biologickými účinky je třeba znát koncentraci donoru NO a jeho časový průběh uvolňování NO. Při studii metabolických odpovědí indukovaných donory NO nejsou výsledky vždy spolehlivé a opakovatelné, neboť dochází k uvolňování různého množství NO, z jiných typů donorů a při proměnlivých podmínkách (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2006). Osud NO se může dle jeho hladiny významně lišit. Může dojít k tvorbě ONOO<sup>-</sup> s následnou přeměnou na 3-nitrotyrosin proteinu nebo S-nitrosylaci proteinu apod. Nejběžněji používaným donorem NO je nitroprussid sodný (SNP) (Obr. 13). Tato sloučenina vytváří NO<sup>+</sup>, je vysoce fotosenzitivní a je považována za látku uvolňující NO po ozáření světlem. Jako vedlejší produkt vzniká toxický kyanid (Arnold *et al.*, 1984). Rozklad SNP je také podpořen působením redukčních činidel, thiolů a kyslíku. Mezi další často používané donory NO patří S-nitroso-N-acetylpenicilamin (SNAP) (Obr. 14) a S-nitrosoglutathion (GSNO) (Obr. 15), které jsou řazeny mezi RSNO a uvolňují radikál NO.

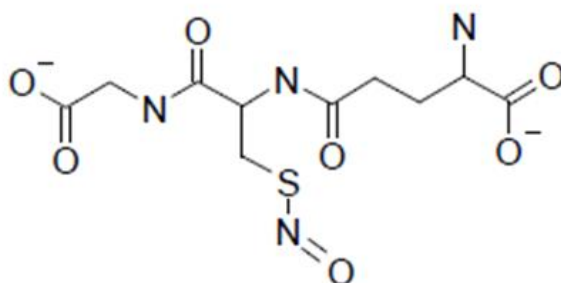


Obr. 13 Strukturální vzorec nitroprussidu sodného (SNP). Systematický název je pentakyanonitrosylželezitan sodný Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO]. V pevném stavu má podobu tmavě červených krystalů.



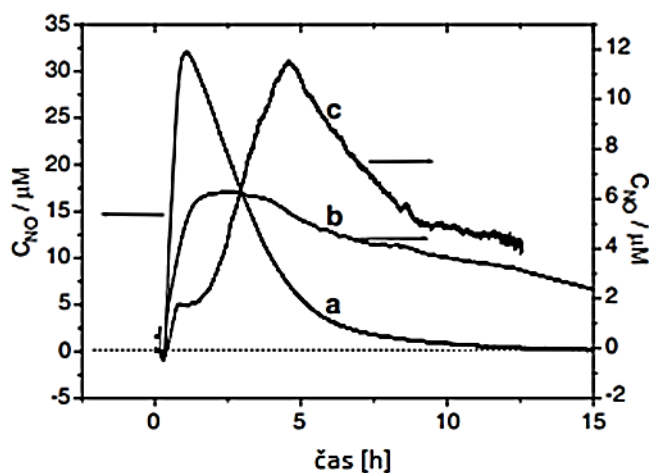


Obr. 14 Strukturní vzorec *S*-nitroso-*N*-acetylpenicilaminu (SNAP). Sumární vzorec je  $C_7H_{12}N_2O_4S$ .



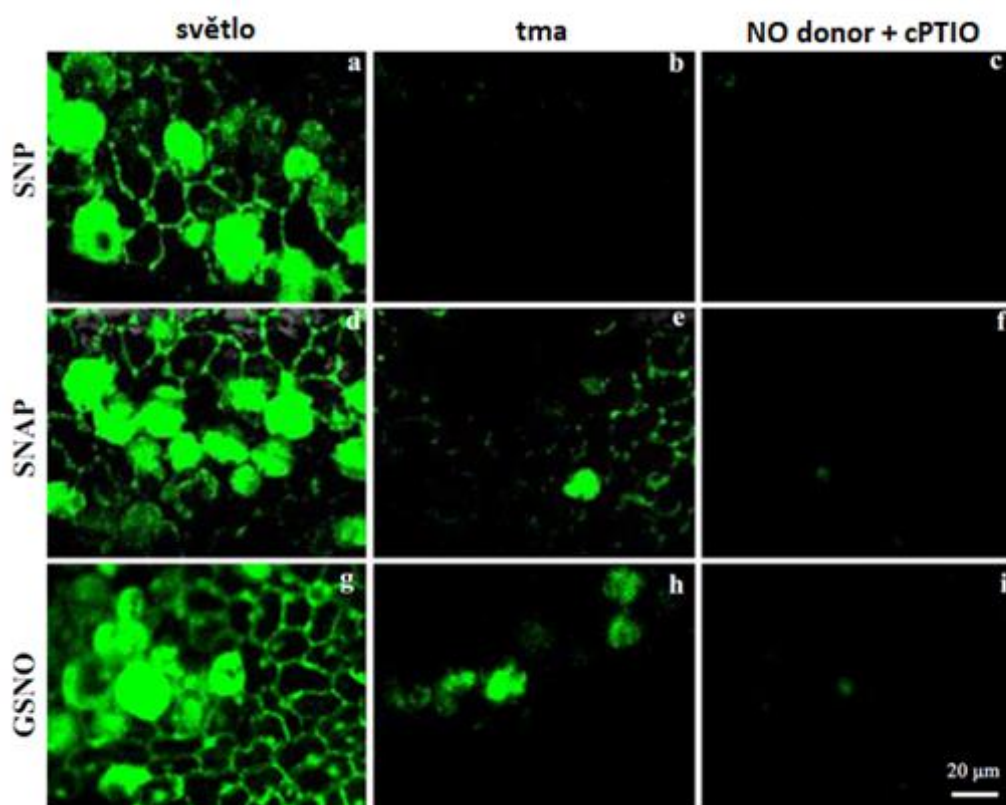
Obr. 15 Strukturní vzorec *S*-nitrosoglutathionu (GSNO). Sumární vzorec je  $C_{10}H_{16}N_4O_7S$  a systematický název je 2*S*-2-amino-5-[[2*R*-1-(karboxymethylamino)-3-nitrososulfanyl-1oxopropan-2-yl]amino]-5-oxopentanová kyselina.

V práci Floryszak-Wieczorek *et al.* (2006) byla studována kinetika NO uvolňovaného z donorů SNP, GSNO a SNAP v přítomnosti stálého osvětlení či redukčních činidel. Každý ze zmíněných donorů vykazuje různou dynamiku a jejich poločas rozpadu se liší. V následujícím grafu (Obr. 16) je znázorněna kinetika uvolňování NO z donorů o stejné koncentraci za podmínek stálého osvětlení. 2 h po zapnutí světla byla v roztoku SNP zaznamenána maximální koncentrace NO, která poté postupně klesala. Jeho poločas rozpadu byl přibližně 12 h. Naopak v roztoku SNAP byla zaznamenána téměř ihned po zapnutí světla až pětikrát vyšší koncentrace NO a poté prudce klesala. Jeho poločas rozpadu byl 3 h. U roztoku GSNO byla naměřena maximální koncentrace NO až po 5 h a poločas rozpadu byl 7 h. Nejrychlejší uvolnění NO bylo tedy zaznamenáno u SNAP, poté GSNO a nakonec SNP.



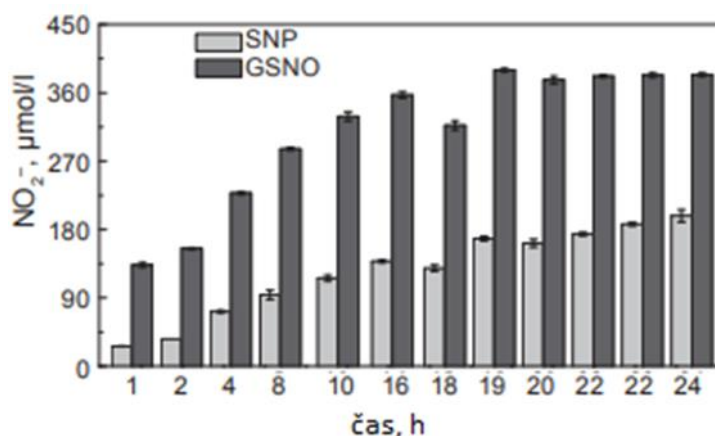
Obr. 16 Graf závislosti koncentrace NO uvolněného z donorů (a) SNAP, (b) SNP, (c) GSNO na čase za podmínek stálého osvětlení. Podmínky experimentu:  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace donorů NO; fosfátový pufr pH 7,4; polychromatické osvětlení o intenzitě  $35 \text{ }\mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ; počáteční teplota  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , konečná teplota  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . (Upraveno dle Floryszak *et al.*, 2006).

Vliv světelných podmínek na uvolnění NO z testovaných donorů (GSNO, SNAP a SNP) byl dokumentován histochemickou detekcí NO s využitím fluorescenční sondy DAF-2 DA (4,5-diaminofluorescein diacetát) na listech pelargonie ošetřených donory NO. Za světelných podmínek dochází k intenzivnímu uvolnění NO, po 6 h nebyl zaznamenán detekovatelný rozdíl v intenzitě signálu odpovídající hladině NO. Při inkubaci listů ošetřených donory NO byl naopak po 6 h ve tmě pozorován slabý signál, potvrzující přítomnost NO uvolněného pouze z GSNO případně SNAP (Obr. 17) (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2006).



Obr. 17 Vizualizace NO v listech pelargonie pomocí fluorescenční sondy DAF-2DA (a - i) po 6 h působení donorů NO za podmínek světla a tmy. Pozitivní zelená fluorescence uvolněného NO je za světelných podmínek zaznamenána u všech donorů NO ( $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SNP,  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SNAP,  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  GSNO) (a, d, g). Negativní zbarvení se vyskytlo u SNP za tmy (b). Mírně pozitivní zbarvení se vyskytlo u SNAP a GSNO za tmy (e, h). Negativní zbarvení bylo také u listů inkubovaných s donory NO a poté přeneseny na 1 h do  $200 \mu\text{M}$  cPTIO (2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid) (c, f, i). Všechny snímky jsou získány pomocí laserového konfokálního mikroskopu. (Upraveno dle Floryszak-Wieczorek *et al.*, (2006))

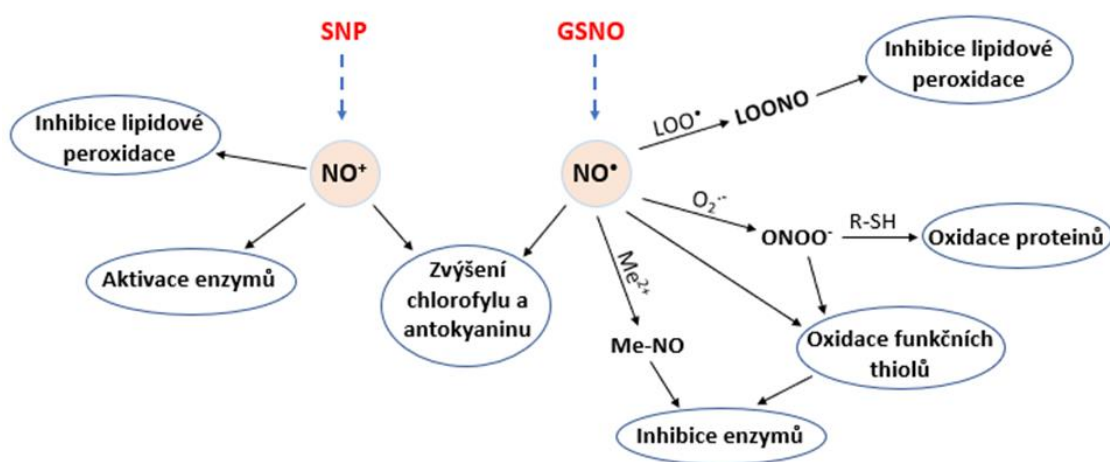
V práci Semchuk *et al.* (2011) byla zkoumána schopnost tokoferolu, lipofilního antioxidantu, měnit fyziologickou a antioxidační odpověď vyvolanou donory NO. V této práci byla stanovena kinetika uvolňování NO z roztoků SNP a GSNO, s využitím Griessovy metody, která je založena na spektrofotometrickém stanovení dusitanů odpovídající hladině uvolněného NO z testovaných donorů NO (Privat *et al.*, 1997). Výsledek experimentu je znázorněn v grafu závislosti množství dusitanů, vytvořených z uvolněného NO z čerstvě připravených roztoků donorů NO – GSNO a SNP v průběhu 24 h (Obr. 18). Nejvyšší koncentrace dusitanů byla zaznamenána po 19 h za stálého osvětlení u GSNO, v případě SNP docházelo v průběhu 24 h k průběžnému uvolňování NO. Po 1. h bylo množství NO uvolněné z GSNO pětinasobně vyšší a po 24 h byl rozdíl přibližně dvojnásobný v porovnání se SNP (Semchuk *et al.*, 2011).



Obr. 18 Grafické znázornění množství uvolněného  $\text{NO}_2^-$  z  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku GSNO a  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku SNP během 24 h ( $n=3$ ). (Upraveno dle Semchuk *et al.*, 2011).

V další práci Bradley a Steinert (2015) byla potvrzena pomocí NO citlivých mikrosenzorů rozdílná dynamika a intenzita uvolňování NO z různých donorů. Byl prokázán negativní efekt skladování (zamražení) zásobních roztoků donorů NO na schopnost uvolnit NO. Detekované rozdíly v množství uvolněného NO jsou dány chemickou strukturou příslušného donoru a závisí na reakčních podmínkách (přítomnost thiolů, světlo, kyslík, pH, přechodné kovy, kyselá katalýza a redukční podmínky).

Z práce Semchuk *et al.* (2011) lze konstatovat, že působením dvou donorů NO může dojít k odlišným nebo dokonce opačným účinkům na fyziologické a antioxidační vlastnosti rostliny. Donory NO mohou tedy mít dvojitý efekt NO (Obr. 19), který může záviset na koncentraci donoru a časovém průběhu uvolnění NO při jeho rozkladu. SNP uvolňoval menší množství NO než GSNO, indukoval enzymy zachycující  $H_2O_2$ , stejně tak zvýšení aktivity glutathion-S-transferasy (GST; EC 2.5.1.18) a glutathionreduktasy (GR; EC 1.6.4.2). GSNO indukoval zvýšení obsahu karbonylových proteinů a inaktivoval askorbátperoxidasu (APX; EC 1.11.1.11), guajakolperoxidasu (GPX; EC 1.11.1.7) a dehydroaskorbátreduktasu (DHAR; EC 1.8.5.1).



Obr. 19 Možné působení donorů NO na rostliny. (Upraveno dle Semchuk *et al.*, 2011)

#### 2.1.4 Možná úloha donorů NO v ochraně rostlin

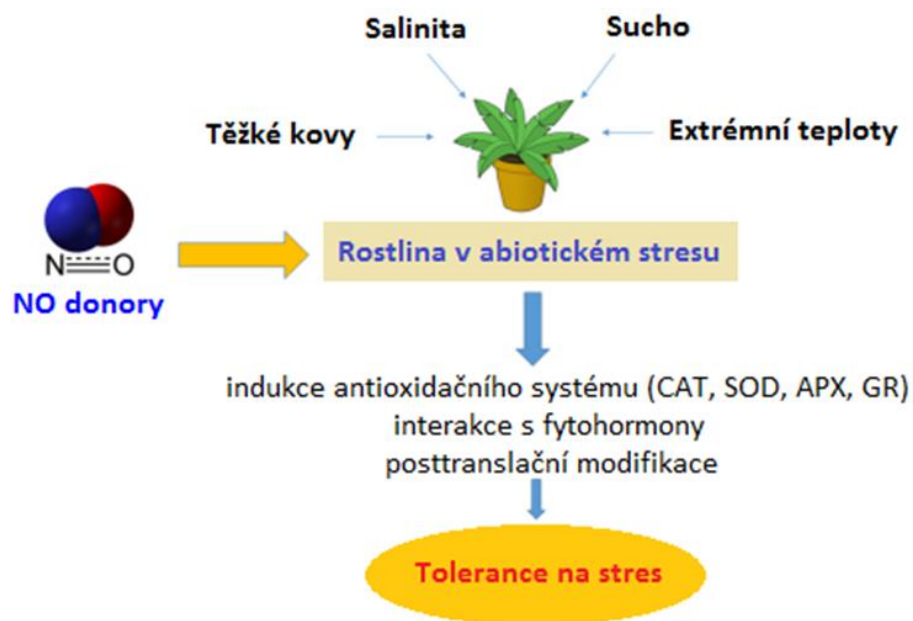
V nedávných studiích byly objeveny ochranné účinky aplikace donorů NO na rostliny při působení abiotického stresu. Při použití nízkomolekulárních donorů NO může dojít ke zlepšení tolerance rostliny k stresovým podmínkám. V rostlině dochází k aktivaci buněčné signalizace prostřednictvím molekuly NO zahrnující interakci s ROS, následně dochází ke změnám v genové expresi, případně funkce proteinů (Obr. 20) (Seabra a Oliveira, 2016).

Mezi současné nejběžnější negativní stresové faktory, které zhoršují vývoj rostlin a následně produkci plodů, tzn. výnosy v zemědělské produkci, patří nedostatek vody - sucho. Sucho vyvolává v rostlině zvýšenou produkci ROS ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2$  apod.), které mohou poškodit DNA, proteiny, lipidy či sacharidy (Cechin *et al.*, 2015). Rostliny proto vyvinuly obranné mechanismy, které zvyšují aktivitu antioxidantních enzymů, jejichž účinkem dochází k eliminaci ROS. Dále dochází k akumulaci prolinu (působí jako osmoprotektant), změně genové exprese za účelem tvorby genů podílejících se na toleranci rostlin na daný stres a v neposlední řadě se jedná o aktivaci regulace uzavírání průduchů (role kyseliny abscisové a  $Ca^{2+}$ ) (Cai *et al.*, 2015). Ve výsledcích studie Seabra a Oliveira (2016) byl prokázán pozitivní vliv NO donoru SNP, který změnil rostlinnou odpověď na sucho regulací hladiny nitrosačního stresu. Uvolněním NO ze SNP došlo k S-nitrosylaci řady proteinů vedoucí ke změně jejich interakcí a aktivit podporující následnou aklimatizaci rostliny na stresové podmínky dané nedostatkem vody. Předmětem studia zůstávají cílové proteiny přímo zapojené do obranných reakcí rostlin v reakci na sucho, které jsou ovlivněny po aplikaci donorů NO.

Dalším stresovým faktorem významně ohrožujícím zemědělskou produkci je zasolení půdy - salinita. U tohoto typu stresu dochází zejména ke snížení růstu, degradaci chlorofylu. Naopak bylo detekováno zvýšení obsahu karotenoidů, osmolytů a zvýšení produkce ROS ( $H_2O_2$ ). Po zvýšení hladiny ROS jsou aktivovány antioxidantní systémy, které zabraňují poškození buněk (Ahmad *et al.*, 2016). Škodlivé účinky ROS mohou být potlačeny zvýšenou hladinou NO uvolněného po aplikaci donoru NO, který se podílí na zvýšení aktivity antioxidantních enzymů, reguluje expresi genů podílejících se na toleranci salinity, snižuje tvorbu  $O_2^-$  v mitochondriích způsobující peroxidaci lipidů (Fatma *et al.*, 2016).

V poslední době je vlivem industrializace znečištěno životní prostředí také těžkými kovy. Některé kovy, jako např. Cu, Ni, Zn, jsou v malých dávkách pro růst rostliny prospěšné a patří mezi mikroživiny, ale jejich nadměrná akumulace způsobuje toxicitu. Jiné kovy, jako např. Cd, Pb, Al, As, jsou pro rostlinu toxické již při velmi malých dávkách. Způsobují snížení růstu, pokles fotosyntézy, chlorózu listů a nakonec může docházet k odumření celé rostliny (Emamverdian *et al.*, 2015). Typickou reakcí na přítomnost těžkých kovů je indukce oxidačního stresu. Na eliminaci volných kovových iontů v cytosolu rostlinných buněk se podílí chelatační mechanismy thiolů (př. GSH, fytochelatiny), organické kyseliny či aminokyseliny (Anjum *et al.*, 2015). Dále dochází k indukci antioxidantních mechanismů neenzymovou či enzymovou drahou. Několik studií prokázalo zmírnění toxicity kovů v rostlině působením donorů NO. Jejich prospěšný účinek spočívá v zabránění oxidačního stresu, kdy dochází k eliminaci ROS či k aktivaci antioxidantních enzymů. Přesná role NO v odpovědi na stres těžkými kovy je stále předmětem studia (He *et al.*, 2014).

Dalším stresovým faktorem rostlin mající negativní dopad na zemědělství je působení extrémních teplot (chladový, teplotní stres). Tyto stresové podmínky vyvolávají změnu funkce proteinů a fluidity membrán, zvýšení produkce ROS a poškození buněk, což vede ke zhoršení růstu a následně odumření rostliny. Mechanismy tolerance k extrémním teplotám zahrnují změnu ve složení membránových lipidů a indukci antioxidantního systému. Nízké teploty dále vyvolávají akumulaci osmolytů, jako je prolin, glycin betain a rafinóza (Theocharis *et al.*, 2012). Při vysokých teplotách je důležitá tvorba proteinů teplotního šoku Hsp (heat shock protein), které napomáhají mimo jiné udržet prostorové uspořádání bílkovin, které by byly teplem denaturovány. V neposlední řadě je prokázáno zvýšení produkce NO v rostlinách čelících extrémním teplotám. Aplikace donorů NO prokázala příznivý vliv na rostlinu, kdy dochází k zamezení oxidačního stresu (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).



Obr. 20 Schematické znázornění obecného mechanismu působení donorů NO na rostliny čelících různým abiotickým stresovým podmínkám, který vede ke zvýšení tolerance a odolnosti rostlin na tyto podmínky. (Upraveno dle Seabra *et al.*, 2016).

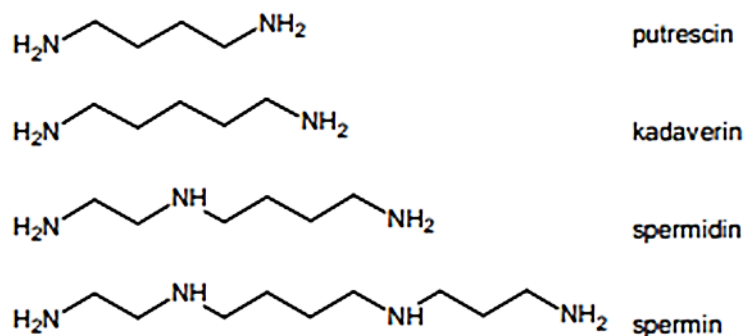
Souhrnně lze říci, že hlavním ochranným účinkem donorů NO je indukce antioxidantního obranného systému zahrnující zvýšení aktivit příslušných enzymů (CAT, SOD, APX, GR) (Molassiotis *et al.*, 2016). Vliv NO na snížení hladiny ROS se projeví v eliminaci lipidové peroxidace a destrukce DNA. Dále má NO schopnost regulovat funkci klíčových proteinů prostřednictvím posttranslačních modifikací (S-nitrosylace, nitrace tyrosinu, metalonitrosylace). Jako příklad lze uvést S-nitrosylaci NADPHoxidasy (EC 1.6.3.1) a glykolátoxidasy (EC 1.1.3.1) vedoucí k inhibici produkce ROS (Yun *et al.*, 2011).

## 2.2 Polyaminy

### 2.2.1 Základní charakteristika polyaminů

Polyaminy jsou alifatické kationty, které se vyskytují v prokaryotních i eukaryotních buňkách. Polyaminy zastávají řadu významných rolí v buňce. Regulují buněčné dělení, diferenciaci, organogenezi, reprodukci či senescenci. Účastní se také reakcí na vnější podněty, tj. působení biotických či abiotických stresových faktorů. Mezi nejběžnější polyaminy vyskytující se v rostlinách patří putrescin (Put), kadaverin (Kad), spermidin, spermin a thermospermin (Obr. 21) (Miller *et al.*, 2010).

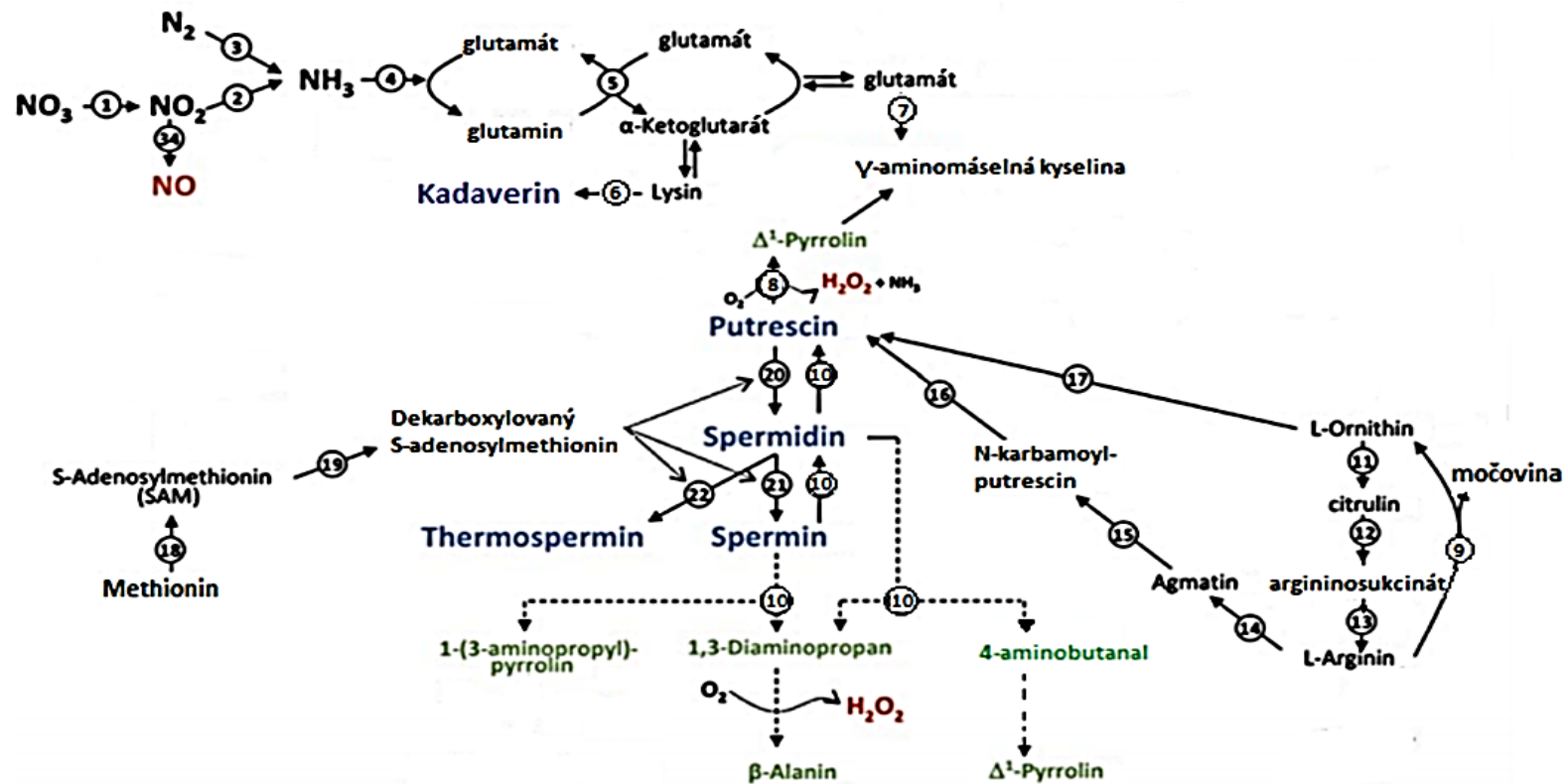




Obr. 21 Nejvýznamnější polyaminy vyskytující se v rostlinách.

### 2.2.2 Biosyntéza a degradace polyaminů

Hladina polyaminů je regulována anabolickými a katabolickými procesy a konjugací s hydroxyskořicovými kyselinami (Obr. 22). V rostlinách začíná biosyntéza polyaminů tvorbou diaminu Put, který vzniká z argininu za přítomnosti enzymu arginindekarboxylasy (ADC, EC 4.1.1.19), dále následuje tvorba agmatinu za katalýzy agmatiniminohydrolasy (AIH, EC 3.5.3.12) a tvorba N-karbamoylputrescinu pomocí N-karbamoylputrescinamidohydrolasy (CPA, EC 3.5.1.53) (Slocum *et al.*, 1984).



Obr. 22 Metabolismus polyaminů a interakce s jinými metabolickými drahami. Přerušované čáry ukazují katabolické procesy a kontinuální čáry znázorňují biosyntetické dráhy pro polyaminy a příbuzné metabolity. Čísla přísluší následujícím enzymům: 1 nitrátreduktasa, 2 nitritreduktasa, 3 nitrogenasa, 4 glutaminsynthetasa, 5 glutamát-synthasa, 6 lysindekarboxylasa, 7 glutamátdekarboxylasa, 8 diaminoxidasa, 9 arginasa, 10 polyaminoxidasa, 11 ornithinkarbamoyltransferasa, 12 argininosukcinát-synthetasa, 13 argininosukcinát-lyasa, 14 arginindekarboxylasa, 15 agmatiniminohydrolasa, 16 N-karbamoylputrescinamidohydrolasa, 17 ornithindekarboxylasa, 18 SAM syntetasa, 19 SAM dekarboxylasa, 20 spermidinsynthasa, 21 sperminsynthasa, 22 thermosperminsynthasa. (Převzato a upraveno dle Alcázar *et al.*, 2010)

Klíčovými enzymy katabolismu polyaminů jsou aminoxidas (AO), které katalyzují oxidační deaminaci polyaminů za vzniku peroxidu vodíku a aminoaldehydu, který je za katalýzy aminoaldehyddehydrogenasy přeměňován na příslušnou aminokyselinu. AO lze klasifikovat do dvou skupin dle kofaktoru: diaminoxidas obsahující měď (DAO, EC 1.4.3.6) a polyaminoxidas obsahující FAD (PAO; EC 1.5.3.3). AO se liší substrátovou specifitou, lokalizací v buňce a mechanismy degradace substrátu. DAO katalyzují oxidaci diaminů Put a Kad v místě primární aminoskupiny. Oxidací Put vzniká 4-aminobutanal, amoniak a peroxid vodíku. 4-aminobutanal se dále cyklizuje za vzniku  $\Delta^1$  pyrrolinu. PAO katalyzují oxidační štěpení sekundární aminoskupiny spermidinu či sperminu za vzniku propan-1,3-diaminu, peroxidu vodíku a příslušného aminoaldehydu (Šebela *et al.*, 2001).

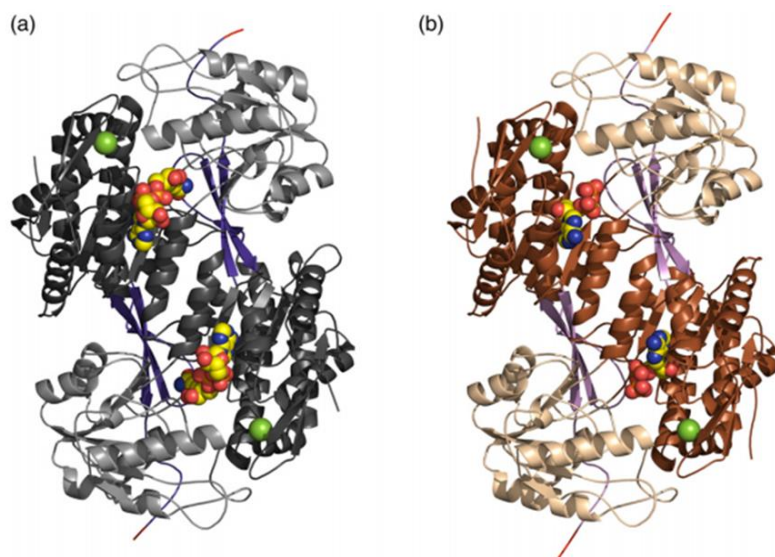
### 3.2.3 Aminoaldehyddehydrogenasa

Aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH, EC 1.2.1.19) jsou  $\text{NAD}^+$  dependentní enzymy patřící do rodiny aldehyddehydrogenas 10 (ALDH 10). Katalyzují oxidaci  $\omega$ -aminoaldehydů, zejména 3-aminopropanal (APAL), 3-aminobutanal (ABAL), 4-guanidinobutyraldehyd (GBAL) na příslušnou  $\omega$ -aminokyselinu, v tomto případě na  $\beta$ -alanin, 4-aminobutanovou kyselinu a 4-guanidinbutanovou kyselinu za současné redukce  $\text{NAD}^+$ . Nejlepším substrátem pro AMADH je APAL. Vzniklý  $\beta$ -alanin je prekurzorem osmoprotektantu  $\beta$ -alaninbetainu. ALDH 10 mohou být zapojeny do tří na sobě nezávislých metabolických drah, tj. metabolismus polyaminů, cholinu a lysinu. Všechny tři dráhy končí příslušnými aminoaldehydy, které jsou poté oxidovány za katalýzy enzymů ALDH 10. Enzymy rodiny ALDH 10 jsou klasifikovány dle substrátové specifity na 4-aminobutyraldehyddehydrogenasy (ABALDH, EC 1.2.1.19), 4-guanidinobutyraldehyddehydrogenasy (GBALDH, EC 1.2.1.54), betainaldehyddehydrogenasy (BADH, EC 1.2.1.8) a 4-trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasy (TMABALDH, EC 1.2.1.47).

Rostlinné AMADH se vyskytují jako homodimery. Každá podjednotka obsahuje doménu katalytickou, koenzymovou a oligomerizační. Aktivní místo pro přeměnu substrátu katalytickým cysteinem se nachází mezi katalytickou a koenzymovou doménou (Tylichová *et al.*, 2010). Reakční mechanismus AMADH začíná nukleofilním atakem substrátu (aldehydu) za tvorby thiohemiacetalového intermediátu (Wymore *et*

*al.*, 2004). V dalším kroku je přenesen hydrid na C4 atom  $\text{NAD}^+$  za vzniku NADH a thioesteru. Nakonec dochází k aktivaci molekuly vody pomocí glutamátového residua, která nukleofilně atakuje thioester za uvolnění příslušné aminokyseliny (Tylichová *et al.*, 2010).

U hrachu setého (*Pisum sativum*) byly detekovány dva isoenzymy *PsAMADH1* a *PsAMADH2*. Oba isoenzymy obsahují 503 aminokyselin, přičemž jejich sekvence je z 80 % identická (Šebela *et al.*, 2000; Brauner *et al.*, 2003). *PsAMADH* se vyskytuje jako tetramer (monomer má 57 kDa) (Obr. 23). Jeho N-terminální sekvence aminokyselin se podobá sekvencím rostlinné betainaldehyddehydrogenasy katalyzující tvorbu glycin betainu, který se účastní v procesech osmotické tolerance rostliny a v odpovědích na stres způsobeným zasolením či suchem. *PsAMADH* však betainaldehydy oxidovat nedokáže (Šebela *et al.*, 2000; Weretilnyk a Hanson, 1990). Struktura obou isoformů je znázorněna na Obr. 23. Centrální část obou domén se skládá z pěti  $\beta$ -vláken a čtyř  $\alpha$ -helixů. Oligomerizační doména obsahuje jedno krátké a dvě dlouhá  $\beta$ -vlákna. Vyčnívá na povrch sousedních podjednotek a spojuje tak oba monomery enzymu. Oba isoenzymy mají na C-konci peroxisomální cílovou sekvenci, ačkoliv jejich přesná lokalizace v buňce je dosud neznámá (Tylichová *et al.*, 2010).



Obr. 23 Struktura isoenzymů *PsAMADH*. (a) reprezentuje dimer *PsAMADH1*. Katalytická doména, doména pro vazbu koenzymu a oligomerizační doména jsou zobrazeny ve světle šedé, černé a modré barvě. Koenzym  $\text{NAD}^+$  (v barvách příslušných atomů) a kovový ion (zelený) mají kulový tvar. (b) reprezentuje dimer *PsAMADH2*. Katalytická doména, doména pro vazbu koenzymu a oligomerizační doména jsou zobrazeny v béžové, hnědé a fialové barvě. Peroxisomální signální sekvence na C-konci je značena červeně. (Převzato z Tylichová *et al.* 2010).

Katalytickou funkci u *PsAMADH* zastává residuum Cys294, které je lokalizováno mezi místem vazby koenzymu NAD<sup>+</sup> a místem vazby substrátu. Dále jsou do katalýzy zapojeny Asn162 a Glu260, které se nachází na konci substrátového tunelu. Při porovnání obou isoenzymů se substrátový tunel liší pouze ve třech aminokyselinových residuech, a proto jejich substrátová specifita vykazuje značnou podobnost, taktéž jejich reakční rychlost a afinita ke koenzymu NAD<sup>+</sup> je velmi podobná ( $K_m = 40 \mu\text{M}$  pro *PsAMADH1* a  $K_m = 55 \mu\text{M}$  pro *PsAMADH2*) (Tylichová *et al.*, 2010).

*PsAMADH* je v rozmezí pH 6 – 9,5 stabilní, přičemž maximální aktivita byla naměřena při pH 8,5. Teplotní optimum enzymu je 45 °C a nad 50 °C již aktivitu postupně ztrácí (Šebela *et al.*, 2000).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál a metody

#### 3.1.1 Chemikálie

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

**Fluka (Švýcarsko):** dihydrát disodné soli ethylendiamintetraoctové (EDTA), dithiotreitol (DTT), nitroprussid sodný dihydrát (SNP), pefabloc® SC

**Honeywell (Rumunsko):** diethylether

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

**Messer (ČR):** dusík kapalný

**PENTA (Ing. Petr Švec, ČR):** dihydrogenfosforečnan draselný

**Serva (Německo):** křenová peroxidasa

**Sigma-Aldrich Chemie (Německo):** 1-amino-3,3-diethoxypropan (APAL), anti-AMADH1 králičí protilátka, anti-králičí protilátka značená alkalickou fosfátou, dihydrochlorid putrescinu, glutathion, hovězí sérový albumin (BSA), 2-methoxyfenol (guajakol), *N,N,N,N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED), n-butanol, nikotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ), poly(vinylpyrrolidon) (PVPP), Ponceau S, S-nitroso-N-acetylpenicilamin (SNAP)

**Unilever (ČR):** SAVO

#### 3.1.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); blotovací systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo); chromatografické kolony Micro Bio-Spin (Bio-Rad, USA), destička Take3 Multi-Volume plate (BioTek, USA); detekční zařízení BIO-RAD Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); elektroforetická komůrka (Bio-Rad, USA); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); kolony NAP-5 (GE Healthcare, USA); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový reader PowerWave

XS (BioTek Instruments, USA); mikroskop Olympus BX 50 (OLYMPUS, Japonsko); nitroceluloseová membrána 0,45  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad, USA); termostat (BioSan, Litva); třepačka 3D (BioSan, Litva); vortex (Stuart, UK); zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (Bio-Rad, USA).

### 3.1.3 Rostlinný materiál

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

### 3.1.4 Příprava rostlinného materiálu

Semena hrachu byla vysterilizována 3% (v/v) roztokem SAVO Original po dobu 2 min, poté byla 10x promyta vodou a dána na 1 den bobtnat ve vodě. Následující den byla semena umístěna na filtrační papíry navlhčené vodou a ponechána 3 dny klíčit na světle při 25 °C. Naklíčená semena byla přemístěna do misek v hydroponickém uspořádání s ¼ Hoaglandovým roztokem. Semena byla pěstována 7 dní ve fytotronu za podmínek světelného režimu 12 h světlo/12 h tma a teploty 25 °C. Rostliny byly následně vystaveny působení 1 mmol·l<sup>-1</sup> roztokům SNP, GSNO a GSH v Hoaglandově roztoku (Tab. 1) po dobu ½, 1, 2, 4 a 24 h. U postupně odebíraných rostlin byla oddělena kořenová a nadzemní část, rostlinný materiál byl zamražen.

Tab. 1 Složení Hoaglandova roztoku.

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

\* Roztok doplněn destilovanou vodou na objem 4 l

### 3.1.5 Zpracování rostlinného materiálu

Z odebraných zamražených rostlin (kořenová a nadzemní část) byl připraven směsný vzorek (3-5 rostlin) homogenizací v třecí misce s tekutým dusíkem na jemný prášek, který byl rozdělen do mikrozkušavek na jednotlivé alikvoty a uchován v mrazicím boxu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro další práci. Extrakce vzorků byla prováděna  $0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  K-fosfátovým pufrům pH 7 v poměru 1:2 (1 g rostlinného materiálu: 2 ml extrakčního pufru).

Suspenze byla 20 min při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  pravidelně promíchávána na vortexu. Poté byla provedena centrifugace (20 min, 16000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a odpipetován supernatant do čistých mikrozkušavek. Extrakt byl použit pro spektrofotometrické měření aktivit enzymů, stanovení celkových proteinů a detekci enzymu AMADH metodou Western blot.

Extrakční pufr: 1% PVPP,  $2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  DTT,  $0,5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pefabloc a  $2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA

### 3.1.6 Stanovení proteinů

Koncentrace celkových proteinů byla stanovena metodou Bradforda spektrofotometricky pomocí readeru PowerWave XS. Tato metoda využívá barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250, které se v kyselém prostředí váže na molekulu proteinu za vzniku modrého zbarvení. Intenzita zbarvení je úměrná množství proteinu ve vzorku (Bradford, 1976). Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA), z kterého byla sestavena kalibrační křivka s příslušnou rovnicí lineární regrese. Použité koncentrace BSA byly 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8;  $1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno  $45\text{ }\mu\text{l}$  destilované vody,  $5\text{ }\mu\text{l}$  vzorku/standardu/vody a  $200\text{ }\mu\text{l}$  Bradfordova činidla. Reakční směs byla 5 min inkubována při  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  a poté byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm.

Bradfordovo činidlo (zásobní roztok):  $0,5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  Coomasie Brilliant Blue G-250;  $0,25\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  methanol;  $0,5\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  kyselina fosforečná. Před použitím zředěno destilovanou vodou v poměru 1:4.



### 3.1.7 Stanovení aktivity aminoaldehyddehydrogenasy

Ze 3-aminopropionaldehydu (APAL) v reakci katalyzované aminoaldehyddehydrogenasou (AMADH) vzniká  $\beta$ -alanin za současné redukce  $\text{NAD}^+$  na NADH. K měření aktivity AMADH byl použit Warburgův optický test založený na detekci vzniklého NADH při vlnové délce 340 nm ( $\epsilon = 6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Šebela *et al.*, 2000).

Aktivita byla změřena v mikrodestičkovém readeru PowerWave XS. Do jamky byl dle Tab. 2 pipetován Tris-HCl pufr (pH 9), koenzym  $\text{NAD}^+$ , rostlinný extrakt,  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl a na závěr APAL pro zahájení reakce. Aktivita byla měřena jako nárůst absorbance při 340 nm po dobu 11 min a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Tab. 2 Složky reakční směsi pro stanovení aktivity AMADH.

<i>Použité roztoky</i>	<i>Koncentrace zásobního roztoku</i>	<i>Pipetovaný objem [<math>\mu\text{l}</math>]</i>
Tris-HCl pufr (pH 9)	$150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	155
$\text{NAD}^+$	$20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	10
Rostlinný extrakt	-	15
HCl (v případě blanku)	$0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	10
APAL	$20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl	10

### 3.1.8 Stanovení aktivity diaminoxidasy

Při katabolismu diaminu putrescinu za katalýzy diaminoxidasy (DAO) vzniká APAL a peroxid vodíku, který je využíván pro oxidaci guajakolu peroxidasou za vzniku žlutohnědého produktu 3,3'-dimethoxyfenyl-4,4'-bifenochinonu, který je detekován spektrofotometricky jako nárůst absorbance při vlnové délce 436 nm ( $\epsilon = 4500 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Aktivita byla změřena v mikrodestičkovém readeru PowerWave XS. Do jamky byla dle Tab. 3 pipetována reakční směs složená z 15 ml  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  K-fosfátového pufru (pH 7), 250  $\mu\text{l}$   $35 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  guajakolu a 250  $\mu\text{l}$  0,01% křenové peroxidasy. Dále byl přidán rostlinný extrakt a na závěr putrescin pro zahájení reakce. Aktivita byla měřena jako nárůst absorbance při 436 nm po dobu 5 min a 30 °C.

Tab. 3 Složky reakční směsi pro stanovení aktivity DAO.

<i>Použité roztoky</i>	<i>Koncentrace zásobního roztoku</i>	<i>Pipetovaný objem [<math>\mu\text{l}</math>]</i>
Reakční směs	-	155
Rostlinný extrakt	-	15
Putrescin	$87,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	5

### 3.1.9 Detekce aminoaldehyddehydrogenasy metodou Western blot

Metoda Western blot je imunochemická detekce specifického proteinu ve směsi proteinů. Tato metoda využívá gelovou elektroforézu k separaci proteinů dle jejich molekulové hmotnosti a následně přenesení proteinů z gelu na membránu, na jejímž povrchu je hledaný protein detekován s využitím specifických protilátek.

#### Příprava vzorků:

Jednotlivé extrakty z kořene hrachu setého (kap. 3.1.5) byly smíchány v poměru 3:1 s 4x koncentrovaným Laemmliho vzorkovacím pufrům. Poté proběhla inkubace vzorků v termobloku po dobu 10 min při 95 °C. Takto připravené vzorky byly ochlazeny a následně použity pro nanesení na polyakrylamidový gel, kde bylo do každé jamky pipetováno po 15 µl vzorku.

Laemmliho vzorkovací pufr: 40% glycerol, 240 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 6,8), 8% SDS, 0,04% bromfenolová modř, 5% beta-merkapt ethanol

#### Separace proteinů:

Elektroforetická separace proteinů ze vzorku proběhla v zaostřovacím a následně dělicím polyakrylamidovém gelu připraveném dle Tab. 4. Separace probíhala přibližně 20 min při napětí 120 V a poté bylo napětí zvýšeno na 180-200 V.

Tab. 4 Příprava zaostřovacího a dělicího polyakrylamidového gelu pro skla s mezeričky 0,75 mm. Rozpis je uveden pro 4 gely. AA/BIS akrylamid/bisakrylamid, SDS dodecylsírán sodný, APS persíran amonný, TEMED tetramethylethylendiamin.

Gel	H <sub>2</sub> O [ml]	AA/BIS (T 30%, C 2,67%) [ml]	Pufr * [ml]	10% (w/v) SDS [ml]	TEMED [ml]	APS **[ml]
4% zaostřovací	6,1	1,3	2,5	0,1	0,01	0,1
10% dělicí	8,2	6,6	5	0,2	0,02	0,2

\* Pro zaostřovací gel byl použit 1,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8,8. Pro dělicí gel byl použit 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6,8.

\*\* Příkladkem 10% APS byla zahájena polymerace.

### **Přenos proteinů na membránu:**

Separované proteiny po SDS elektroforéze byly přeneseny z gelu na nitroceluloseovou membránu metodou semi-dry blotting. Membrána a silnější filtrační papíry (8,5 x 7 cm) byly namočený do blotovacího pufru. Na spodní (anoda) a horní kazetu (katoda) byly poskládány vrstvy v pořadí: filtrační papír – membrána – gel – filtrační papír. Po odstranění případných bublin válečkem byl zahájen přenos za konstantního proudu 190 mA po dobu 2 h. Poté byla membrána promyta vodou a obarvena Ponceau S pro ověření správného přenosu proteinů na membránu. Membrána byla přenesena na 1 h do blokovacího roztoku pro AMADH, tj. do 5% sušeného mléka v TTBS pufru. Po blokování byla membrána přenesena do roztoku primární králičí anti-AMADH1 protilátky zředěné 5% sušeným mlékem v TTBS pufru v poměru 1:1500. Inkubace probíhala přes noc za stálého třepání při 4 °C. Druhý den byla membrána 4x promyta po 15 min v TTBS pufru. Následně byla membrána přenesena do roztoku sekundární anti-králičí protilátky značené alkalickou fosfatase a zředěné 5% sušeným mlékem v TTBS pufru v poměru 1:2500. Inkubace probíhala 2 h za stálého třepání při 25 °C. Membrána byla opět 4x promyta po 15 min TTBS pufrém. Pro detekci AMADH byla membrána inkubována v 10 ml barvicího roztoku chromogenního substrátu NBT-BCIP až do vyvinutí tmavě fialových bandů. Následně byla membrána promyta vodou, usušena a vyfocena detekčním zařízením BIO-RAD. Intenzita bandů byla vyhodnocena v programu ImageJ.

### **Použité roztoky:**

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

Blokovací roztok: 5% sušené mléko v TBS pufru

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

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

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

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

AP pufr: 100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 9,5); 5 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 100 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl

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

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

### **3.1.10 Histochemická detekce reaktivních forem dusíku s využitím fluorescenční sondy**

Detekce NO byla provedena pomocí fluorescenční sondy 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetátu (DAF-FM DA). Sonda prochází buněčnou membránou do buňky, kde je vnitrobuněčnými esterasami deacetylována na DAF-FM. DAF-FM reaguje s NO za vzniku vysoce fluorescenčního triazofluoresceinu (DAF-FM T).

Apikální část postranního kořene byla na podložním sklíčku inkubována s  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  DAF-FM DA po dobu 1 min. Po odsátí roztoku byl kořen vždy 3x promyt destilovanou vodou a ponechán v kapce 50% glycerolu. Takto obarvený kořen byl sledován pomocí mikroskopu Olympus BX 50 při zvětšení 100x s využitím vhodných fluorescenčních filtrů ( $\lambda_{\text{exc}}$  - 495 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  - 515 nm pro sondu DAF-FM DA) (Kojima *et al.*, 1999).

20  $\mu\text{M}$  DAF-FM DA: 4  $\mu\text{l}$  zásobního  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  DAF-FM DA v DMSO, 996  $\mu\text{l}$   $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl pufru (pH 7,4)

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Hlavním cílem bakalářské práce bylo ověření, zda může být aktivita aminoaldehyddehydrogenasy a diaminoxidasy, klíčových enzymů katabolismu polyaminů, regulována posttranslační modifikací - S-nitrosylací. Studie vlivu donorů NO na enzymovou aktivitu byly realizovány s využitím rekombinantních proteinů *PsAMADH1* a *PsAMADH2* a vyizolovaného enzymu z hrachu setého s DAO aktivitou a s extrakty z kořenové a nadzemní části hrachu setého. Vedle testování přímého vlivu NO uvolněného z použitých donorů na aktivitu enzymů AMADH a DAO, byl studován efekt aplikace donorů NO do růstového média 7denních semenáčků hrachu setého. Enzymová aktivita byla stanovena po ½, 1, 2, 4 a 24h aplikaci donorů NO ke kořenovému systému, a to jak v kořenové, tak v nadzemní části rostliny. Ve studii byly použity dva genotypy hrachu setého: *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset lišící se odolností vůči patogenům. Byly testovány 3 typy donorů NO: GSNO, SNP a SNAP.

### 4.1 Predikce možnosti S-nitrosylace

Jako první byla provedena bioinformatická analýza predikce možnosti S-nitrosylace enzymů *PsAMADH1*, *PsAMADH2* a *PsDAO* pomocí 3 různých programů: GPS-SNO1.0 (Xue *et al.*, 2010; Kovacs a Lindermayr, 2013), iSNO-PseAAC a iSNO-AAPair (Xu *et al.*, 2013). V Tab. 5 jsou uvedeny pozice cysteinů ve struktuře *PsAMADH1* a *PsAMADH2* a vygenerované výsledky predikce místa S-nitrosylace. Z publikace Tylichová *et al.* (2010) byly do tabulky doplněny typy domén v rámci struktury *PsAMADH1/2*, ve kterých se nacházejí cysteiny s predikovanou možností S-nitrosylace.

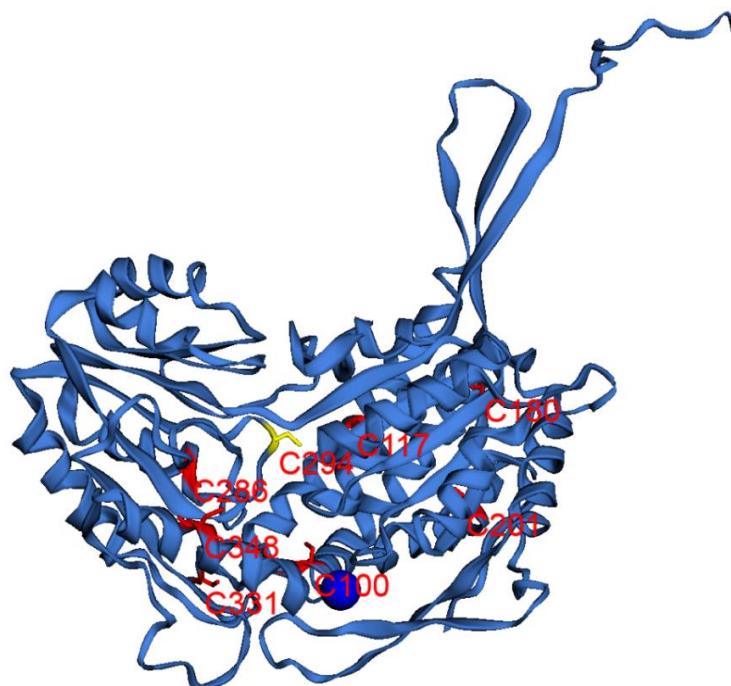
Tab. 5 Predikce možnosti S-nitrosylace hrachové aminoaldehyddehydrogenasy (*PsAMADH*). Pro predikci byly použity příslušné sekvence isoenzymů *PsAMADH1* a *PsAMADH2* uvedené ve FASTA formátu z publikace Tylichová *et al.*, 2010.

<i>PsAMADH1</i>				<i>PsAMADH2</i>				*Typ domény
Cys	GPS-SNO1.0	iSNO-PseAAC	iSNO-AAPair	Cys	GPS-SNO1.0	iSNO-PseAAC	iSNO-AAPair	
100	x	x		100		x	x	vázající koenzym
117			x	117			x	vázající koenzym
180		x	x	180		x	x	vázající koenzym
194				194				vázající koenzym
201			x	201				vázající koenzym
286		x		286		x		katalytická
294			**x	294				katalytická
331			x	331			x	katalytická
348	x	x	x					katalytická
				400		x		katalytická
433				433		x	x	katalytická
449				449				katalytická
				453			x	vázající koenzym

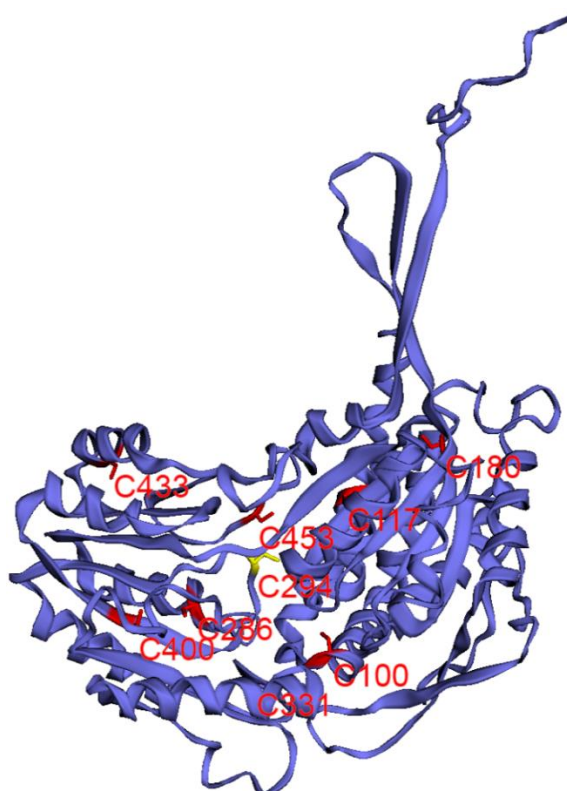
\*Typ domény uveden dle Tylichová *et al.* 2010

\*\*Cys294 se nachází v aktivním místě enzymu (Kopečný *et al.*, 2011)

U isoenzymu *PsAMADH1* byla nalezena predikce S-nitrosylace více než dvěma programy u Cys100, Cys180 a Cys348, u *PsAMADH2* u Cys100, Cys180 a Cys433. U isoenzymu *PsAMADH1* byla dle programu iSNO-AAPair predikována S-nitrosylace Cys294, který je lokalizován v aktivním místě enzymu a jeho případná posttranslační modifikace by mohla hrát důležitou roli v regulaci enzymové aktivity (Kopečný *et al.*, 2011). S využitím programu EzMol byly vyznačeny pozice Cys ve struktuře obou isoenzymů *PsAMADH* (Obr. 24 a 25).



Obr. 24 Struktura podjednotky *PsAMADH1* s vyznačenými přítomnými cysteiny (červená barva). Žlutou barvou je znázorněn C294 v aktivním místě. Vygenerováno v programu EzMol (Reynolds *et al.*, 2018). Krystalová struktura *PsAMADH1* v rozlišení 2,4 Å, pdb3IWK (Tylichová *et al.*, 2010).



Obr. 25 Struktura podjednotky *PsAMADH2* s vyznačenými přítomnými cysteiny (červená barva). Žlutou barvou je znázorněn C294 v aktivním místě. Vygenerováno v programu EzMol (Reynolds *et al.*, 2018). Krystalová struktura *PsAMADH2* v rozlišení 2,4 Å, pdb3IWK (Tylichová *et al.*, 2010).



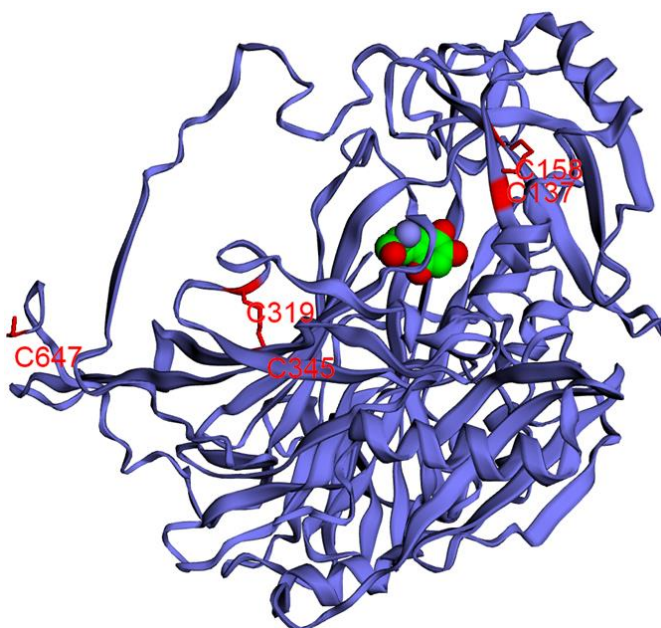
Na základě známé struktury isoenzymů *PsAMADH1* a *PsAMADH2* je zřejmé, že cysteiny v jejich struktuře jsou lokalizovány v katalytické nebo koenzym vázající doméně (Tylichová *et al.*, 2010). Ve struktuře *PsAMADH1* se nachází celkem 11 cysteinů, ve struktuře *PsAMADH2* celkem 12 cysteinů. Vysoká pravděpodobnost S-nitrosylace *PsAMADH1* predikovaná všemi testovanými programy je u cysteinu v poloze 348, který se nachází v katalytické doméně. U tohoto isoenzymu dle programu iSNO-AAPair lze předpokládat rovněž S-nitrosylaci cysteinu v poloze 294 zapojeného do reakčního mechanismu. U isoenzymu *PsAMADH2* je dle programu iSNO-PseAAC a iSNO-AAPair shodně predikována S-nitrosylace u cysteinu v poloze 100 a 180 v doméně vázající koenzym, podobně jako v případě *PsAMADH1*, a dále v katalytické doméně u cysteinu v poloze 433.

Bionformatická analýza byla analogicky provedena také pro *PsDAO* (Kumar *et al.*, 1996). V Tab. 6 jsou uvedeny cysteiny ve struktuře *PsDAO* a vygenerované výsledky predikce místa S-nitrosylace.

Tab. 6 Predikce možnosti S-nitrosylace hrachové diaminoxidasy (*PsDAO*). Pro predikci byla použita sekvence *PsDAO* uvedená ve FASTA formátu z publikace Kumar *et al.*, 1996.

<b><i>PsDAO</i></b>			
<b>Cys</b>	<b>GPS-SNO1.0</b>	<b>iSNO-PseAAC</b>	<b>iSNO-AAPair</b>
137			
158			x
319		x	
345			x
647			x

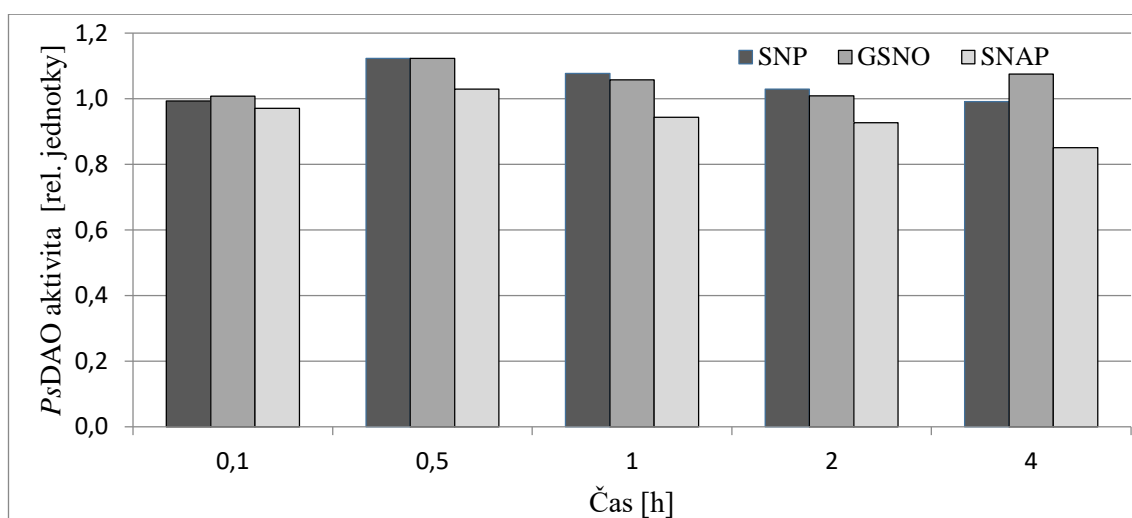
Ve struktuře enzymu *PsDAO* se nachází celkem 5 cysteinů. Pouze dle programu iSNO-AAPair je predikována S-nitrosylace cysteinu v poloze 158, 345 a 647. Dle programu iSNO-PseAAC byla nalezena predikce jen u Cys v poloze 319 a program GPS-SNO1.0 nevygeneroval predikci žádnou. S využitím programu EzMol byly vyznačeny pozice Cys ve struktuře *PsDAO* (Obr. 26). Pozice Cys 137 a 158 případně 319 a 345 ve struktuře *PsDAO* umožňuje tvorbu disulfidických můstků. Cys v poloze 647 se nachází na konci primární struktury a je lokalizován mimo aktivní místo enzymu. Na základě pozice Cys nelze předpokládat regulaci *PsDAO* aktivity S-nitrosylací (Kumar *et al.*, 1996).



Obr. 26 Struktura podjednotky *PsDAO* s vyznačenými přítomnými cysteiny (červená barva). Vygenerováno v programu EzMol. (Reynolds *et al.*, 2018). Krystalová struktura *PsDAO* v rozlišení 2,2 Å, pdb1KSI (Kumar *et al.*, 1996).

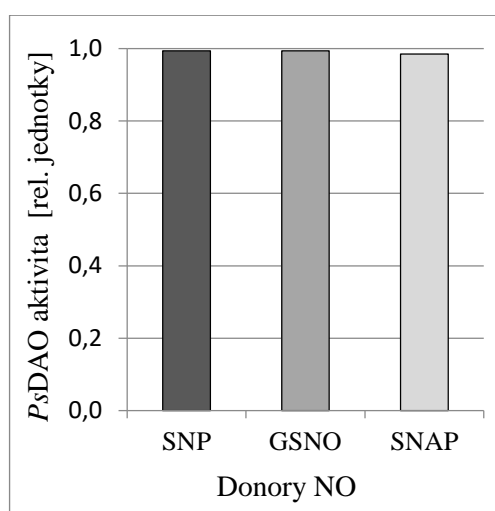
## 4.2 Vliv donorů NO na aktivitu diaminoxidasy

Pro studium vlivu donorů NO na aktivitu diaminoxidasy byl použit enzym *PsDAO* vyizolovaný z hrachu setého doc. M. Petřivalským (specifická aktivita *PsDAO* 11,6 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu). Enzym byl pro následující experimenty 10x zředěn. Aktivita enzymu byla stanovena v časech 0,1; 0,5; 1; 2 a 4 h po aplikaci donoru NO. Inkubace donorů NO s *PsDAO* byla realizována při 4 °C a 25 °C. Jako donor NO byl použit GSNO, SNP a SNAP o 1 mmol·l<sup>-1</sup> koncentraci. Na Obr. 27 je uvedeno grafické znázornění vlivu donorů NO na aktivitu *PsDAO* v průběhu 4 h inkubace enzymu s donory NO při teplotě 4 °C (vztaženo ke kontrolnímu vzorku bez donoru NO).



Obr. 27 Vliv donorů NO na aktivitu *PsDAO* v závislosti na době inkubace enzymu s donory NO při 4 °C. Použity 1 mmol·l<sup>-1</sup> roztoky SNP, GSNO a SNAP. Relativní jednotky - aktivita *PsDAO* po inkubaci enzymu s donory NO vztažena ke kontrolnímu vzorku pro daný časový interval. Specifická aktivita *PsDAO* 11,6 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu. Experiment byl realizován v technickém triplikátu.

Z výsledků na Obr. 27 je zřejmé, že nebyl detekován vliv donorů NO, GSNO a SNP, v průběhu 4 h inkubace při teplotě 4 °C na aktivitu *Ps*DAO. Pouze v případě aplikace SNAP po 4 h inkubaci byla zaznamenána slabá inhibice (cca 15%). Negativní efekt zvýšené koncentrace NO na *Ps*DAO aktivitu byl ověřen realizací experimentu při 1,5h inkubaci enzymu s 1 mmol·l<sup>-1</sup> donory NO (GSNO, SNP, SNAP) při 25 °C (Obr. 28), kdy bylo prokázáno cca 2x intenzivnější uvolnění NO z příslušných donorů ve srovnání s realizací experimentu při 4 °C (nepublikované výsledky dr. J. Sekaninová). Tyto výsledky korelují s předpokládanou velmi nízkou pravděpodobností ovlivnění aktivity *Ps*DAO S-nitrosylací na základě predikčních programů a pozice Cys ve struktuře enzymu (Tab. 6, Obr. 26) (Kumar *et al.*, 1996).

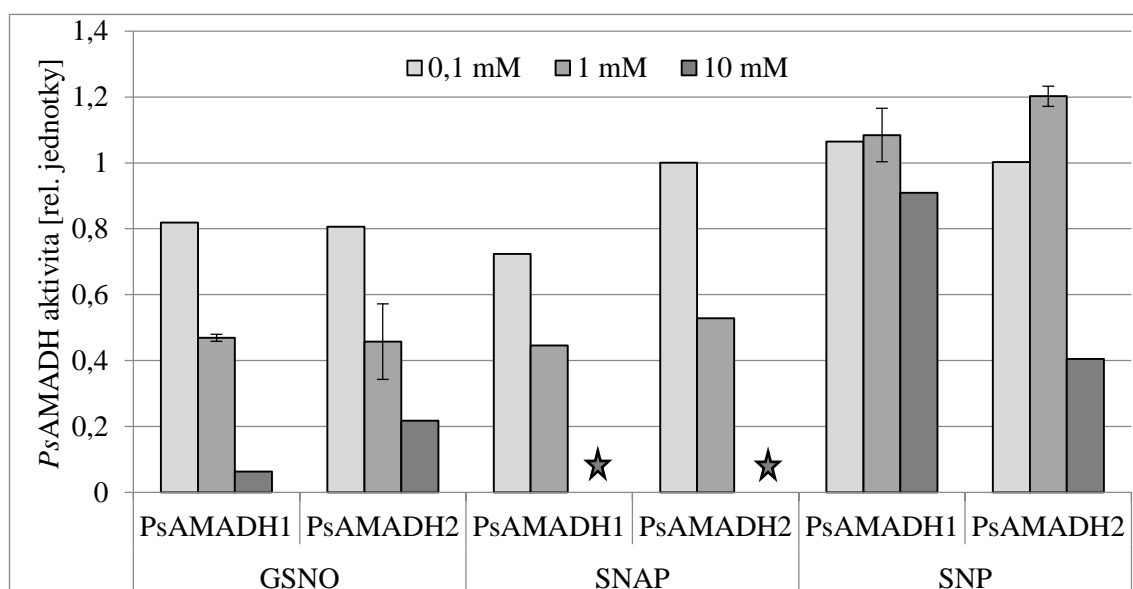


Obr. 28 Vliv donorů NO na aktivitu *Ps*DAO po 1,5h inkubaci při 25 °C. Použity 1 mmol·l<sup>-1</sup> donory SNP, GSNO a SNAP. Relativní jednotky - aktivita *Ps*DAO po inkubaci enzymu s donory NO vztažena ke kontrolnímu vzorku. Specifická aktivita *Ps*DAO 11,6 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu. Experiment realizován v technickém triplikátu.

### 4.3 Vliv donorů NO na aktivitu aminoaldehyddehydrogenasy

#### 4.3.1 Vliv koncentrace donorů NO

Pro studium vlivu donorů NO na aktivitu AMADH byly použity rekombinantní isoenzymy *PsAMADH1* a *PsAMADH2* připravené dr. T. Tichou (specifická aktivita *PsAMADH1* 5,1 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu, *PsAMADH2* 6,0 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu). Pro vlastní experimenty byly enzymy 5x zředěny. Byl testován vliv tří donorů NO, tj. GSNO, SNP a SNAP v koncentraci 0,1; 1 a 10 mmol·l<sup>-1</sup>. Aktivita AMADH byla stanovena po 1,5h inkubaci s donory NO při 25 °C. Na Obr. 29 je uveden vliv donorů NO o různé koncentraci na aktivitu *PsAMADH1* a *PsAMADH2*.



Obr. 29 Vliv koncentrace donorů NO na aktivitu *PsAMADH1* a *PsAMADH2*. Použity 0,1, 1 a 10 mmol·l<sup>-1</sup> roztoky SNP, GSNO a SNAP. Relativní jednotky - aktivita *PsAMADH1* a *PsAMADH2* po 1,5 h inkubaci enzymu s donory NO při 25 °C, která je vztažena ke kontrolnímu vzorku inkubovaného bez donoru NO. Specifická aktivita *PsAMADH1* 5,1 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu, *PsAMADH2* 6,0 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu. Experimenty byly realizovány v technickém triplicátu, pouze v případě koncentrace 1 mmol·l<sup>-1</sup> GSNO a SNP v biologickém triplicátu (uvedeny směrodatné odchylky). Testování 10 mmol·l<sup>-1</sup> koncentrace SNAP nebylo z důvodu nedostatečného množství donoru NO realizováno (★).

Zvýšená koncentrace NO po aplikaci donorů NO k isoenzymům *PsAMADH* měla inhibiční efekt na aktivitu enzymů. V případě *PsAMADH* v porovnání s *PsDAO* byla predikována vyšší pravděpodobnost S-nitrosylace cysteinů ve struktuře enzymů, která může následně ovlivnit aktivitu enzymů (Obr. 24 a 25), což koreluje s výsledky uvedenými v Tab. 5, prokazující jednoznačně inhibiční efekt NO u *PsAMADH1* a *PsAMADH2*. Nejsilnější inhibiční účinek vykazovaly u obou isoenzymů donory NO GSNO a SNAP. SNP měl inhibiční efekt až při aplikaci  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace. Výsledky korelují s prací Floryszak-Wieczorek *et al.* (2006), kde bylo zaznamenáno rychlejší uvolnění NO ze SNAP a GSNO oproti SNP o stejné koncentraci  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 16). U SNP dochází k pomalému uvolňování NO, zatímco u GSNO a SNAP se NO uvolňuje téměř okamžitě, jak je zřejmé také z poločasu rozpadu příslušného donoru NO (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2006). Stejný kinetický efekt je potvrzen také v práci Semchuk *et al.* (2011) (Obr. 18), kde byla detekována po 1 h působení donoru GSNO ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) 5x vyšší schopnost uvolnění NO v porovnání s donorem SNP ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Rozdílná schopnost uvolňovat NO z jednotlivých donorů byla potvrzena i za podmínek experimentů realizovaných v bakalářské práci, tzn. ve  $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris/HCl pufru, pH 9 (nepublikované výsledky dr. J. Sekaninová). Nejintenzivnější uvolnění NO bylo detekováno při použití donoru GSNO, cca 5x nižší intenzita uvolnění NO byla zaznamenána v případě SNAP a cca 10x nižší při použití SNP. Odlišné schopnosti donorů NO uvolňovat NO jsou dány hlavně rozdílnou chemickou strukturou daných látek, což bylo prokázáno v práci Bradley a Steinert (2015) pomocí mikrosenzorů citlivých na NO.

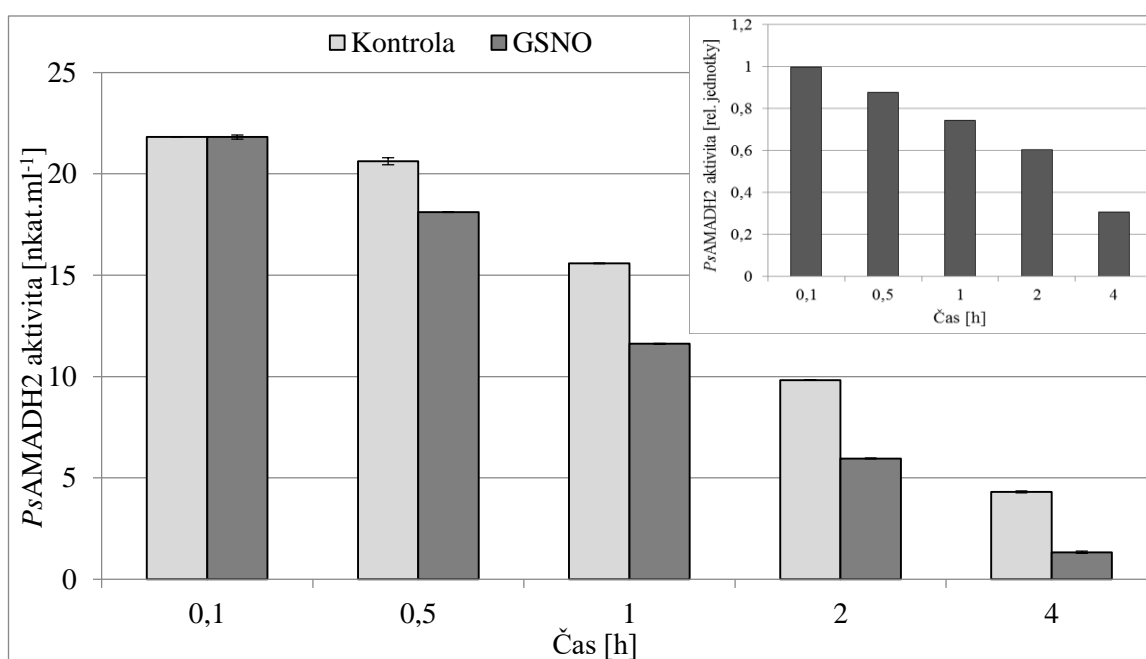
Zvyšující se koncentrace donorů NO (Obr. 29) měla výrazný inhibiční efekt na aktivitu *PsAMADH*. Aplikace  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace GSNO způsobila pouze cca 20% inhibici, aplikace  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace již cca 55% a  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace cca 80-95%.

### **4.3.2 Vliv doby inkubace donorů NO**

Pro testování vlivu doby inkubace s donory NO na aktivitu *PsAMADH* byl zvolen donor GSNO a jeho efekt byl testován na isoenzymu *PsAMADH2* (specifická aktivita  $6,0 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteinu). V souladu s výsledky uvedenými v práci Semchuk *et al.* (2011), kde bylo detekováno v průběhu 16 h postupné uvolňování NO z GSNO, byl

v případě *PsAMADH2* zaznamenan v průběhu 4 h inkubace s  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  GSNO (při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) prohlubující se inhibiční efekt na aktivitu enzymu (Obr. 30). Po 30 min inkubace byla detekována cca 15% inhibice a po 4 h inkubace cca 70% inhibice *PsAMADH2* aktivity.

Enzym *PsAMADH* není příliš teplotně stabilní. V důsledku realizace experimentu při teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  byl detekován pokles aktivity i v kontrolních vzorcích (po 4 h až o 80%). Inhibiční efekt NO byl vztažen vždy k aktivitě AMADH v daném čase. Přítomnost donoru NO významně přispívala k poklesu aktivity s narůstající dobou inkubace (Obr. 30).



Obr. 30 Vliv GSNO na aktivitu *PsAMADH2* v závislosti na době inkubace enzymu s GSNO při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Použit  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok GSNO. Relativní jednotky u vnitřního grafu - aktivita *PsAMADH2* po inkubaci enzymu s GSNO vztažena ke kontrolnímu vzorku pro daný časový interval. Specifická aktivita *PsAMADH2*  $6,0 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteinu. Experiment byl realizován v technickém triplikátu.

### 4.3.3 Vliv aplikace donorů NO na aktivitu

#### aminoaldehyddehydrogenasy v extraktech hrachu setého

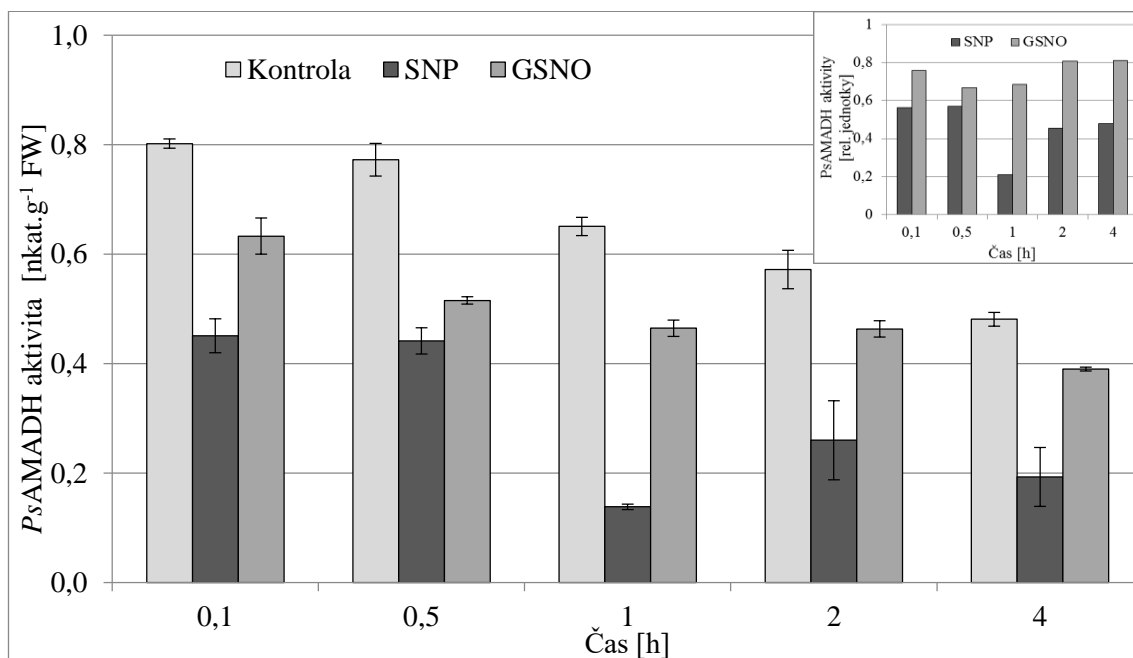
Efekt donorů na aktivitu *PsAMADH* byl testován vedle čistých enzymových preparátů i na reálných vzorcích, tzn. na rostlinných extraktech. Byl studován vliv donorů NO, (GSNO a SNP o 1 mmol·l<sup>-1</sup> koncentraci) na aktivitu *PsAMADH* v extraktech připravených z kořenové a nadzemní části 7denních semenáčků hrachu setého. Vzhledem k teplotní nestabilitě rostlinných extraktů probíhala inkubace s donory vždy při 4 °C. Aktivita AMADH byla měřena v časech 0,1; 0,5; 1; 2; 4 h. Extrakty byly připraveny ze dvou kultivarů hrachu setého, lišících se odolností vůči patogenům, tj. *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Na Obr. 31 jsou porovnány změny aktivity *PsAMADH* v kořenové části studovaných kultivarů v průběhu 4 h po aplikaci GSNO a SNP.

U extraktů z kořenové i nadzemní části obou genotypů hrachu byla zaznamenána inhibice aktivity *PsAMADH* (Obr. 31 a 32). Inhibiční efekt NO uvolněného z donorů byl větší v kořenové části v porovnání s částí nadzemní. Po aplikaci donorů NO k rostlinným extraktům lze pozorovat rozdílný efekt působení GSNO a SNP v porovnání s experimenty s vyizolovanými enzymy, kde donor GSNO měl větší a rychlejší inhibiční účinek v porovnání se SNP (Obr. 29). U extraktů z kořenů byla zaznamenána přibližně 40% resp. 50% inhibice AMADH aktivity již krátce po inkubaci (0,1 h) se SNP u *P. sativum* cv. Kudrnáč, resp. *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 31 (a, b)). Při použití donoru GSNO po 0,1 h inkubaci byla zaznamenána pouze 20-30% inhibice AMADH aktivity. Inhibiční účinek SNP se s prodlužováním doby inkubace zvyšoval. Po 4 h inkubace rostlinných extraktů se SNP byla pozorována 60-80% inhibice AMADH aktivity. V případě aplikace GSNO se inhibiční účinek významně neměnil (20-30% inhibice).

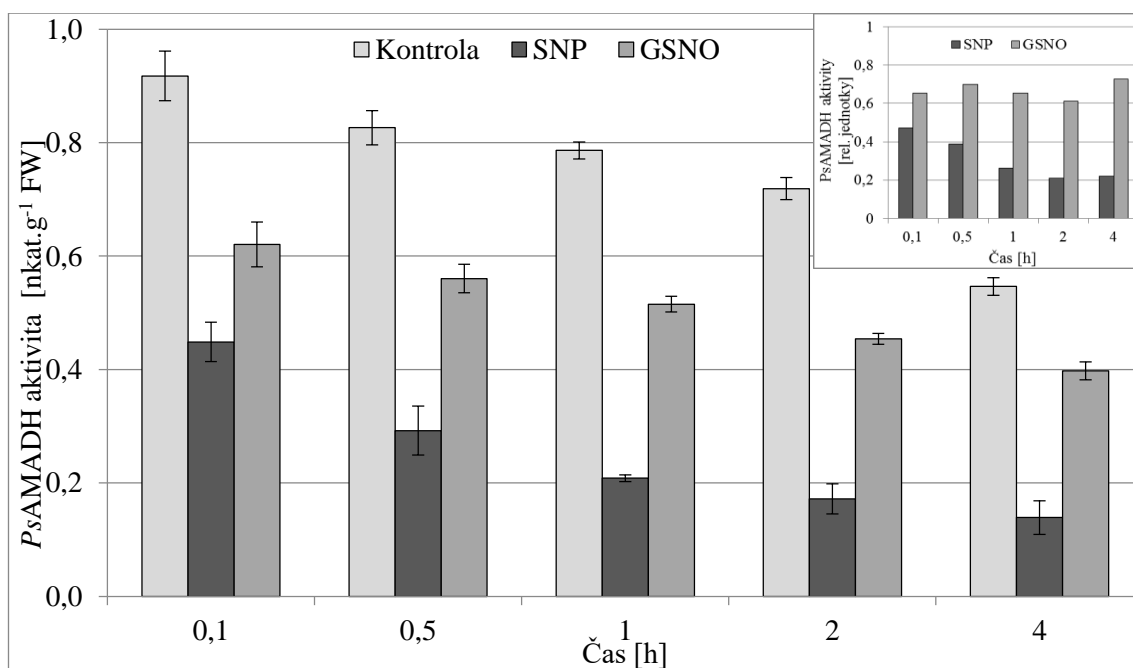
U extraktů z nadzemní části byla po 0,1h inkubaci se SNP zaznamenána přibližně 35% inhibice aktivity AMADH u obou kultivarů, zatímco inkubace s GSNO způsobila pouze cca 10-15% inhibici (Obr. 32). Po 4 h inkubace se SNP byla u *P. sativum* cv. Kudrnáč pozorována cca 48% inhibice AMADH aktivity, zatímco u *P. sativum* cv. Twinset byl detekován nižší inhibiční účinek (cca 20 %) (Obr. 32 (a, b)). Delší doba inkubace GSNO s extrakty neměla vliv na inhibiční efekt tohoto donoru a po 4h inkubaci GSNO s rostlinnými extrakty byl inhibiční efekt stále 10-15%.



a)

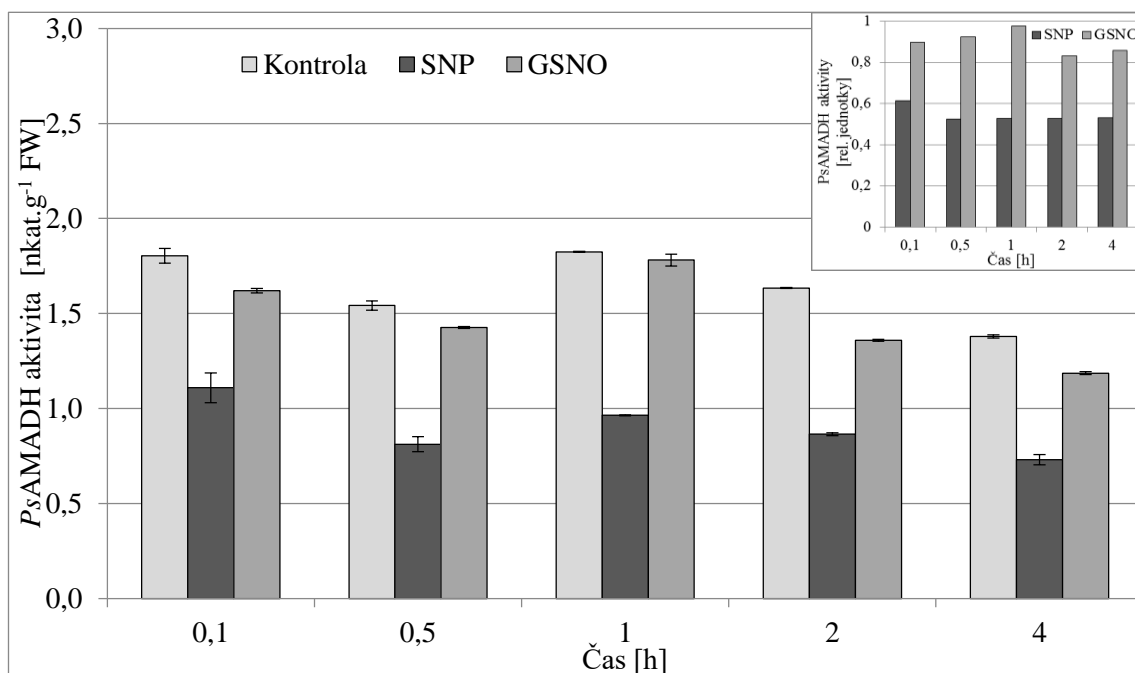


b)

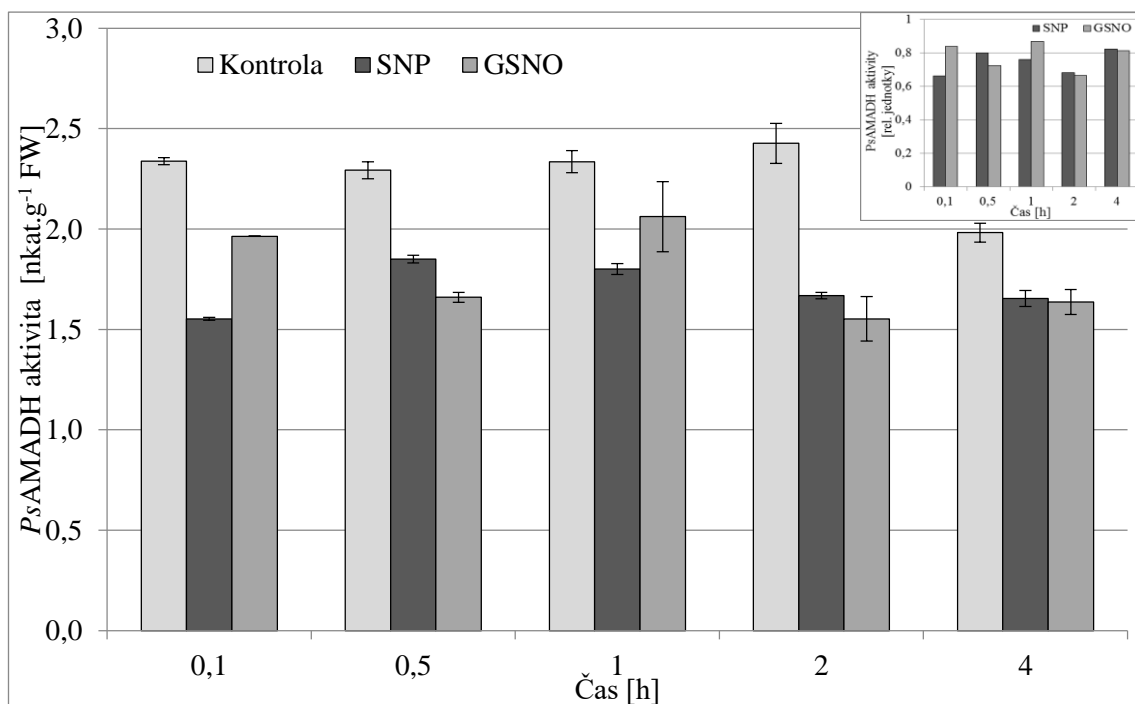


Obr. 31 Vliv GSNO a SNP na aktivitu AMADH v extraktech z kořenové části (a) *P. sativum* cv. Kudrnáč, (b) *P. sativum* cv. Twinset v průběhu 4 h po aplikaci GSNO a SNP při 4 °C. Použity 1 mmol·l<sup>-1</sup> roztoky GSNO a SNP. Relativní jednotky u vnitřního grafu - aktivita AMADH po inkubaci enzymu s GSNO/SNP vztažena ke kontrolnímu vzorku pro daný časový interval. Specifická aktivita AMADH *P. sativum* cv. Kudrnáč 0,32 nkat.mg<sup>-1</sup> proteinu, *P. sativum* cv. Twinset 0,35 nkat.mg<sup>-1</sup> proteinu. Experiment byl realizován v technickém triplicátu.

a)



b)



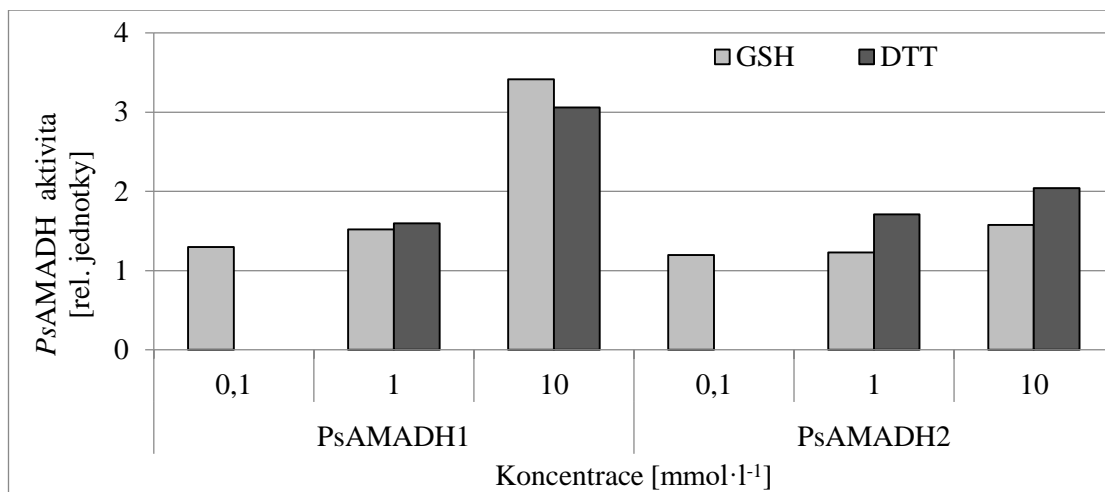
Obr. 32 Vliv GSNO a SNP na aktivitu AMADH v extraktech z nadzemní části (a) *P. sativum* cv. Kudrnáč, (b) *P. sativum* cv. Twinset v průběhu 4 h po aplikaci GSNO a SNP při 4 °C. Použity 1 mmol·l<sup>-1</sup> roztoky GSNO a SNP. Relativní jednotky u vnitřního grafu - aktivita AMADH po inkubaci enzymu s GSNO/SNP vztažena ke kontrolnímu vzorku pro daný časový interval. Specifická aktivita AMADH *P. sativum* cv. Kudrnáč 0,20 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu, *P. sativum* cv. Twinset 0,24 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu. Experiment byl realizován v technickém triplicátu.

Při porovnání vlivu NO na aktivitu AMADH v extraktech studovaných dvou kultivarů hrachu setého byl detekován větší inhibiční účinek GSNO i SNP v extraktech připravených z kořenové části *P.sativum* cv. Twinset. Je zajímavé, že naopak větší inhibiční efekt byl detekován po aplikaci SNP k extraktům z nadzemní části *P.sativum* cv. Kudrnáč. Pouze v případě aplikace SNP byl detekován zvyšující se inhibiční účinek s dobou inkubace donoru NO s extrakty. Závěrem lze konstatovat, že podobně jako v experimentech s připravenými čistými enzymy je i aktivita AMADH v rostlinných extraktech významně inhibována v důsledku uvolnění NO po aplikaci donorů GSNO a SNP. Rozdílný efekt GSNO a SNP může být ovlivněn složením extraktů, a to např. přítomností redukujících sloučenin, řady dalších proteinů, které mohou interagovat s NO apod. a rovněž rozdílnou schopností (intenzita a dynamika) uvolňovat NO (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2006, Semchuk *et al.*, 2011).

Aktivita enzymu může být ovlivněna nejen S-nitrosylací, ale i dalšími modifikacemi thiolové skupiny (Obr. 8), (Hancock a Neill, 2019). Může dojít k oxidaci, glutathionylaci, S-persulfidaci či vzniku disulfidu reakcí s jinými thioly. Jelikož se v buňce tvoří mimo NO také ROS, může dojít k jejich interakci za vzniku ONOO<sup>-</sup>, který způsobuje nitraci tyrosinu v enzymové struktuře. Tato modifikace je ireverzibilní oproti S-nitrosylaci. Zda modifikace thiolové skupiny cysteinu AMADH, např. S-nitrosylací nebo oxidací, ovlivní aktivitu enzymu, lze ověřit experimenty s redukujícími sloučeninami jako je dithiotreitol (DTT) nebo glutathion (GSH).

#### **4.3.3.1 Porovnání vlivu glutathionu a dithiotreitolu na aktivitu aminoaldehyddehydrogenasy**

Vliv redukčních činidel GSH a DTT byl testován na isoenzimech *PsAMADH1* a *PsAMADH2*. Inkubace s roztokem GSH o koncentraci 0,1; 1 a 10 mmol·l<sup>-1</sup> probíhala 1,5 h při 25 °C. S roztokem DTT o koncentraci 1 a 10 mmol·l<sup>-1</sup> probíhala inkubace 10 min při 25 °C. Na Obr. 33 je porovnán vliv GSH a DTT na aktivitu isoenzymů v závislosti na jejich koncentraci.



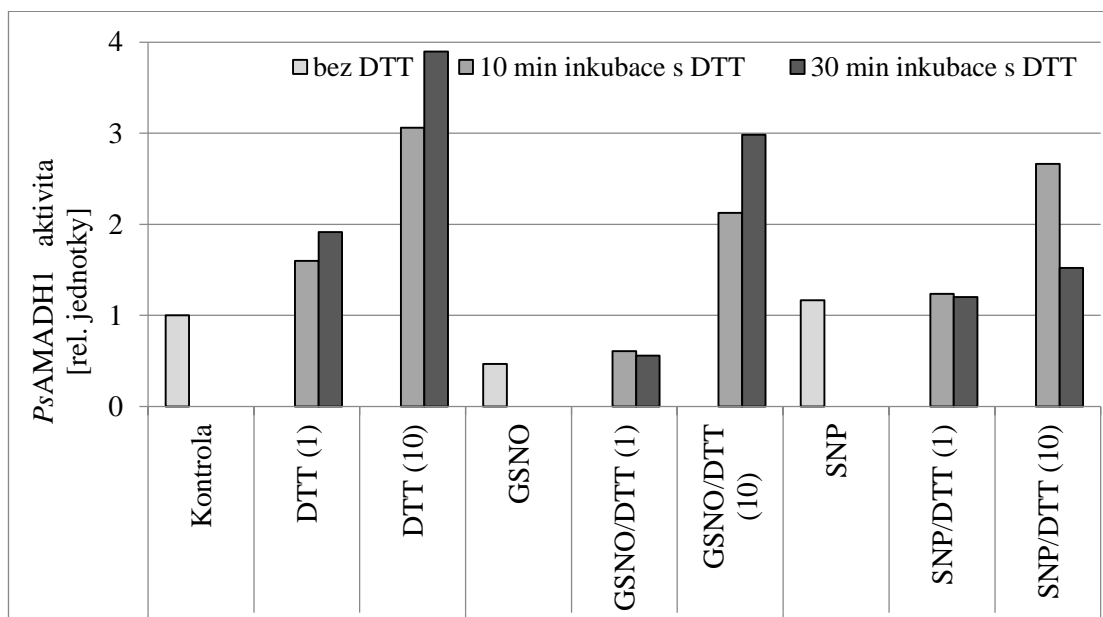
Obr. 33 Vliv GSH a DTT na aktivitu *PsAMADH1* (vlevo) a *PsAMADH2* (vpravo). Použit 0,1, 1 a 10 mmol·l<sup>-1</sup> roztok GSH nebo 1 a 10 mmol·l<sup>-1</sup> roztok DTT. Relativní jednotky - aktivita *PsAMADH1* a *PsAMADH2* po 1,5 h inkubaci enzymu s GSH a 10 min s DTT při 25 °C vztažena ke kontrolnímu vzorku. Specifická aktivita *PsAMADH1* 5,1 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu, *PsAMADH2* 6,0 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu. Experiment byl realizován v technickém triplicátu.

Z Obr. 33 je zřejmé, že byla detekována zvýšená aktivita *PsAMADH* po inkubaci enzymu s DTT či GSH. Aktivita obou isoenzymů se výrazně zvyšovala s rostoucí koncentrací GSH nebo DTT. Významný rozdíl mezi isoenzymy pozorujeme při použití 10 mmol·l<sup>-1</sup> koncentrace GSH nebo DTT, kdy došlo až k trojnásobnému zvýšení aktivity *PsAMADH1* oproti kontrolnímu vzorku. U *PsAMADH2* byl nárůst aktivity maximálně dvojnásobný. Tyto výsledky poukazují na skutečnost, že klíčové –SH skupiny cysteinů ve struktuře AMADH mohou být u připravených isoenzymů *PsAMADH1* a *PsAMADH2* částečně oxidovány. V důsledku významně zvýšené aktivity po aplikaci 10 mmol·l<sup>-1</sup> DTT i GSH u *PsAMADH1*, lze předpokládat vyšší intenzitu oxidace –SH skupin cysteinů tohoto isoenzymu v porovnání s *PsAMADH2*.

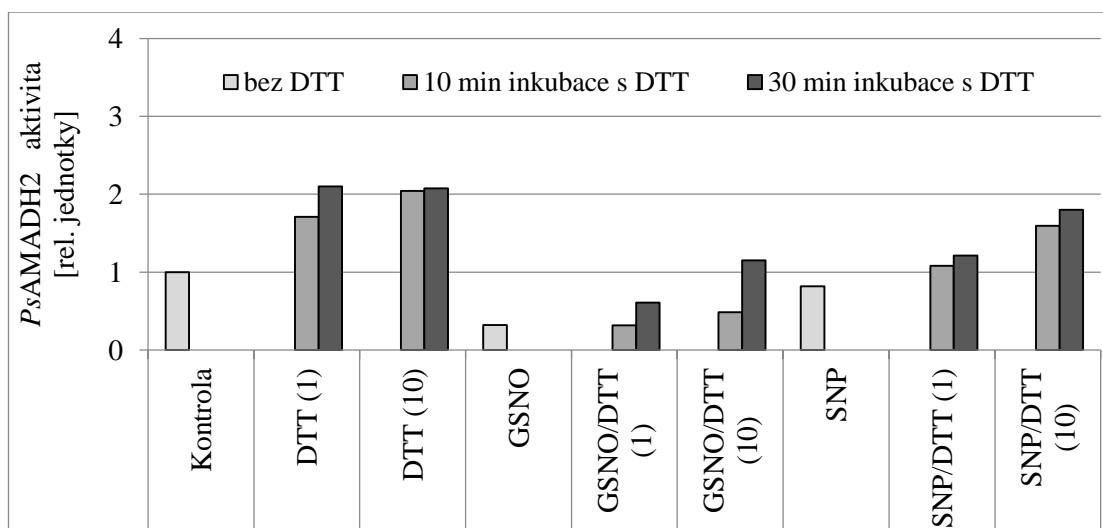
#### 4.3.3.2 Vliv dithiotreitolu na aktivitu aminoaldehyddehydrogenasy

Pro studium vlivu DTT na aktivitu AMADH byly použity isoenzymy *PsAMADH1* a *PsAMADH2*. Byl testován vliv roztoku DTT o 1 a 10 mmol·l<sup>-1</sup> koncentraci na aktivitu enzymu bez donoru NO a enzymu inkubovaného s donorem NO po dobu 10 a 30 min. Jako donor NO byly použity 1 mmol·l<sup>-1</sup> roztoky GSNO a SNP. Doba inkubace enzymu s donorem byla 1,5 h při 25 °C (Obr. 34).

a)



b)

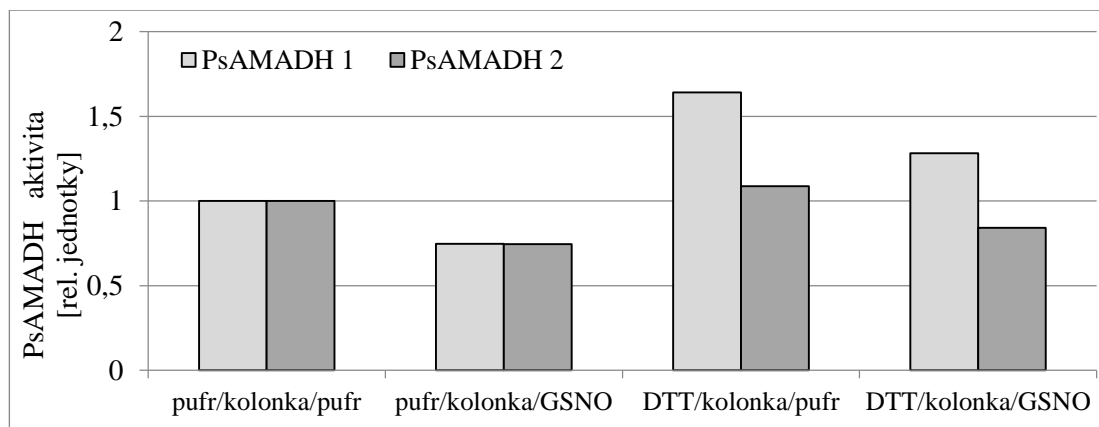


Obr. 34 Vliv DTT na aktivitu isoenzymů (a) *PsAMADH1*, (b) *PsAMADH2* po 1,5 h inkubace s donorem či bez donoru NO při 25 °C. Byla použita 1 a 10 mmol·l<sup>-1</sup> koncentrace roztoku DTT, inkubace probíhala 10 a 30 min při 25 °C. Byl použit 1 mmol·l<sup>-1</sup> roztok donoru GSNO/SNP. Relativní jednotky - aktivita *PsAMADH1* a *PsAMADH2* po 1,5h inkubaci enzymu s donory NO a 10/30 min s DTT při 25 °C vztažena ke kontrolnímu vzorku. Specifická aktivita *PsAMADH1* 5,1 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu, *PsAMADH2* 6,0 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu. Experiment byl realizován v technickém triplikátu.

Porovnání efektu doby inkubace isoenzymů *PsAMADH* s DTT o 1 a 10 mmol·l<sup>-1</sup> koncentraci na jejich aktivitu (Obr. 34), potvrzuje již výše zmíněnou rozdílnou intenzitu oxidace -SH skupin cysteinu u jednotlivých isoenzymů. U *PsAMADH2* bylo dosaženo zdvojnásobení aktivity po 30 min inkubace s 1 mmol·l<sup>-1</sup> DTT (Obr. 34 (b)), avšak zvýšení koncentrace DTT a doba jeho aplikace neměla již zvyšující se efekt na aktivitu. Naopak, v případě *PsAMADH1* po prodloužení doby působení 10 mmol·l<sup>-1</sup> DTT, došlo k dalšímu navýšení enzymové aktivity (Obr. 34 (a)). V důsledku významně zvýšené aktivity po aplikaci 10 mmol·l<sup>-1</sup> DTT i GSH u *PsAMADH1* lze předpokládat vyšší intenzitu oxidace -SH skupin cysteinů.

Po aplikaci DTT k enzymu po 1,5h inkubaci s GSNO bylo detekováno zvýšení AMADH aktivity. V případě aplikace SNP jako donoru NO byl detekován inhibiční efekt za daných podmínek pouze u *PsAMADH2* (Obr. 34 (b)). U obou isoenzymů, po následné aplikaci DTT k enzymu po inkubaci se SNP, nebylo dosaženo stejného zvýšení aktivity AMADH, jako u enzymu bez inkubace se SNP. Koncentrace DTT a doba inkubace byly zřejmě nedostatečné pro plnou redukci oxidovaných a S-nitrosylovaných -SH skupin cysteinů ve struktuře *PsAMADH*.

Pro ověření inhibičního efektu GSNO byl realizován experiment s DTT v modifikovaném uspořádání. Isoenzymy *PsAMADH* byly vystaveny 30 min působení DTT, poté byly nízkomolekulární látky (včetně nadbytku DTT) odstraněny gelovou chromatografií na komerčních kolonkách Micro Bio-Spin (Bio-Rad). Takto ošetřený enzym byl inkubován 1,5 h s GSNO. Paralelně byly provedeny kontrolní experimenty, kdy místo DTT bylo přidáno k enzymovému roztoku odpovídající množství pufru (Obr. 35).



Obr. 35 Vliv DTT na aktivitu isoenzymu *PsAMADH1* a *PsAMADH2* po 30min inkubaci s DTT, chromatografii na kolonkách Micro Bio-Spin a 1,5h inkubaci s GSNO při 25 °C. Byl použit 1 mmol·l<sup>-1</sup> roztok donoru GSNO. Relativní jednotky - aktivita *PsAMADH1* a *PsAMADH2* po 30min inkubaci s DTT a po 1,5h inkubaci enzymu s donory NO vztažena ke kontrolnímu vzorku. Specifická aktivita *PsAMADH1* 4,3 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu, *PsAMADH2* 4,9 nkat·mg<sup>-1</sup> proteinu. Experiment byl realizován v technickém triplicátu.

Ve výše popsaném experimentu byl opět potvrzen inhibiční účinek GSNO, kdy u obou isoenzymů byla snížena aktivita AMADH o cca 25 % (Obr. 35). Po aplikaci DTT byla významně zvýšena aktivita *PsAMADH1* v porovnání s *PsAMADH2*, což potvrzuje již prokázaný vyšší stupeň oxidace –SH skupin cysteinu u *PsAMADH1*. U obou enzymů byla opět po aplikaci GSNO k enzymu po ošetření s DTT detekována cca 25% inhibice (Obr. 35).

#### 4.4 Vliv donorů NO na aktivitu aminoaldehyddehydrogenasy po aplikaci do růstového media

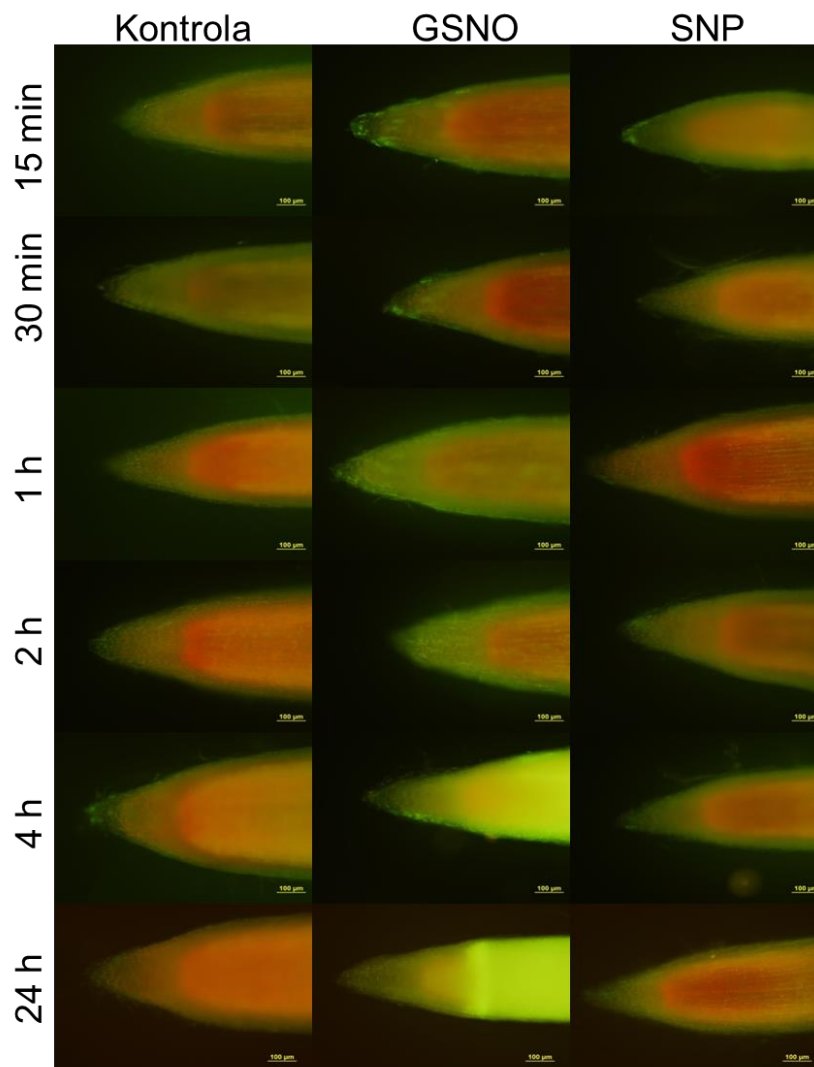
V rámci této studie byl testován vliv donorů NO na aktivitu AMADH po jejich aplikaci přímo do růstového média (Hoaglandova roztoku) 7denních semenáčků hrachu *P.sativum* cv. Kudrnáč a *P.sativum* cv. Twinset (*in vivo* experiment). Inkubace probíhala v časových intervalech 0,5; 1; 2; 4 a 24 h v roztocích GSNO a SNP o koncentraci 1 mmol·l<sup>-1</sup> při 25 °C.

##### 4.4.1 Produkce NO

Pro studium produkce NO byly použity apikální části postranních kořenů 7denních semenáčků hrachu *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset, které byly ošetřeny 1 mmol·l<sup>-1</sup> roztoky GSNO a SNP v časových intervalech ¼, ½, 1, 2, 4 a 24 h při 25°C.

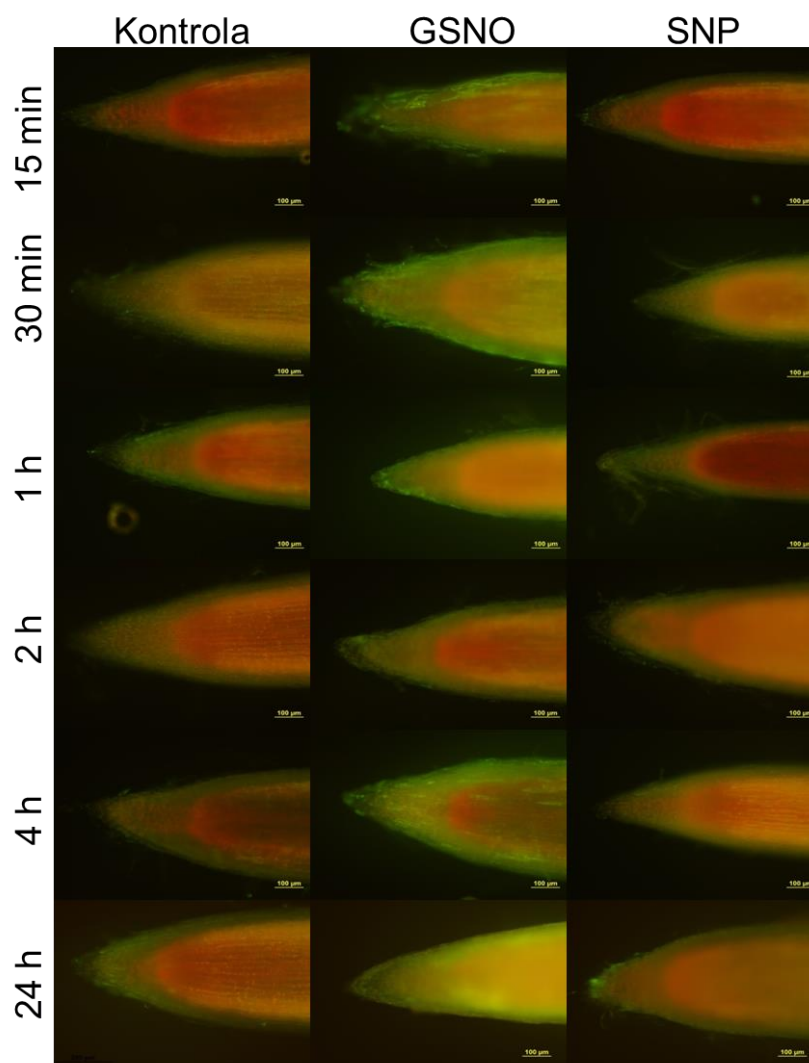
Intenzita produkce NO byla detekována s využitím fluorescenční sondy DAF-FM DA (Obr. 36).

a)





b)



Obr. 36 Histochemická detekce NO pomocí fluorescenční sondy DAF-FM DA v kořenových špičkách (a) *P.sativum* cv. Kudrnáč, (b) *P.sativum* cv. Twinset. Rostliny byly inkubovány v  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  roztocích GSNO a SNP. V časových intervalech  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 4 a 24 h při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  byly odebrány apikální části postranních kořenů. Zvětšení mikroskopu 100x. Experiment byl proveden v biologickém triplikátu.

Intenzita fluorescenčního signálu, detekující přítomnost NO, byla zaznamenána nejznatelněji u kořenů ošetřených donorem GSNO. U *P.sativum* cv. Kudrnáč se produkce NO s časem zvyšovala (Obr. 36 (a)). Po 1 h od aplikace GSNO do růstového média byla detekována významně zvýšená hladina NO, po 4 a 24 h inkubace s GSNO byl detekován nejintenzivnější fluorescenční signál (Obr. 36 (a)). U *P.sativum* cv. Twinset byla detekována intenzivnější fluorescence dříve, než u *P.sativum* cv. Kudrnáč, a to již po 30 min inkubace rostlin s GSNO ((Obr. 36 (b)). Po 2 h byl zaznamenán pokles fluorescence a po 4 h opět zvýšení. Největší intenzita

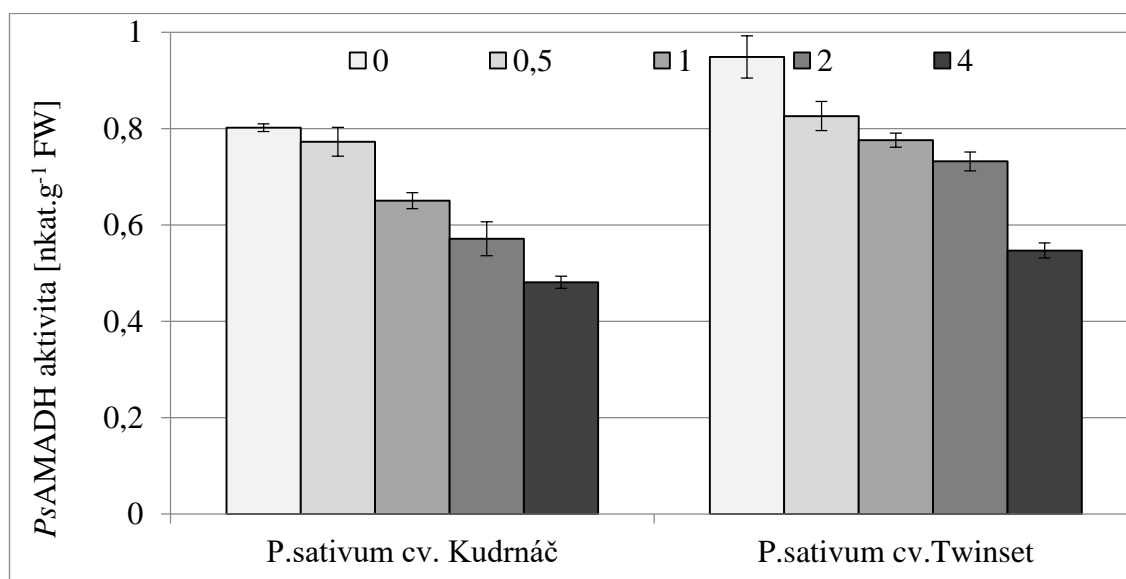
fluorescence byla však detekována po 24 h inkubace s GSNO. V případě donoru SNP nebyly rozdíly ve fluorescenčním signálu příliš znatelné (Obr. 36 (b)).

Vysoká hladina NO detekovaná v kořenech hrachu setého 24 h po aplikaci donorů NO bude zřejmě souviset s aktivací obranných mechanismů spojené s aktivací produkce NO rostlinou (Semchuk *et al.*, 2011, Seabra a Oliveira, 2016).

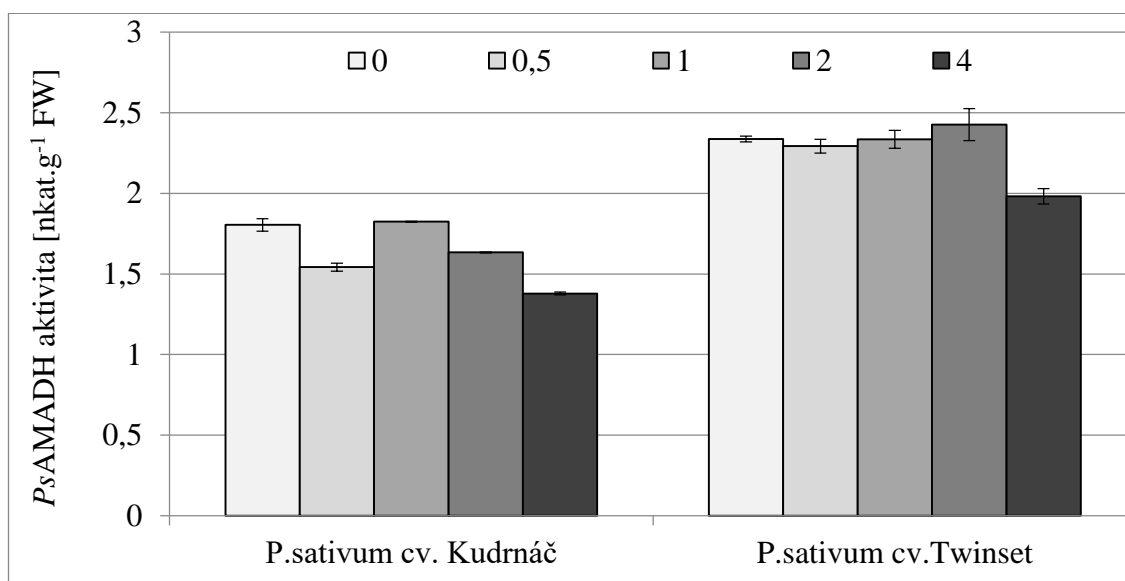
#### 4.4.2 Vliv donorů NO na aktivitu aminoaldehyddehydrogenasy po aplikaci do růstového média

Ke kořenovému systému 7denních semenáčků hrachu, *P.sativum* cv. Kudrnáč a *P.sativum* cv. Twinset, byly aplikovány do Hoaglandova roztoku donory NO (GSNO, SNP) a GSH o koncentraci  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to v časových intervalech 0,5; 1; 2 a 4 h při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Aktivita AMADH byla stanovena v extraktech z kořenové a nadzemní části. Na Obr. 37 jsou uvedeny aktivity AMADH stanovené v daných časových intervalech u kontrolních rostlin nevystavených působení donorů NO.

a)



b)

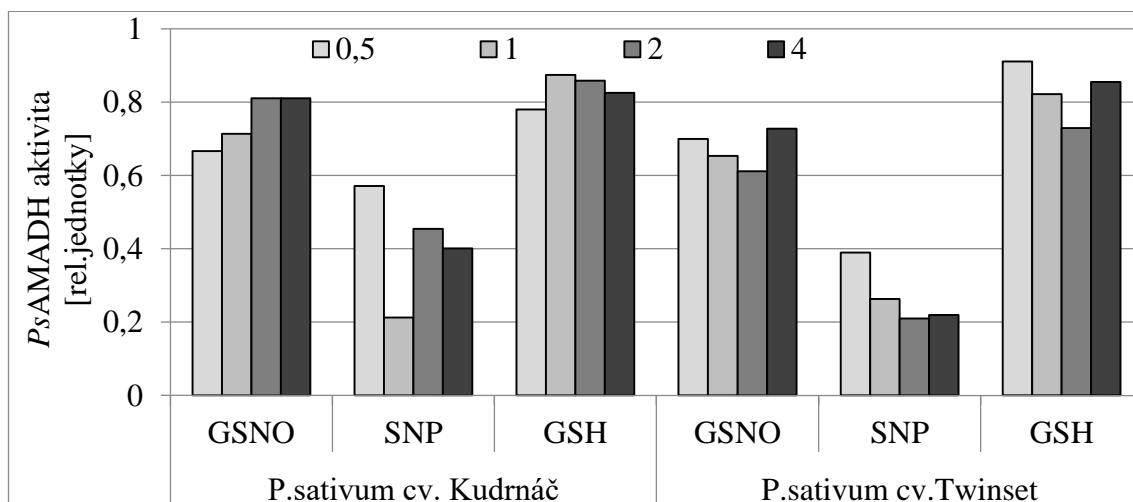


Obr. 37 Stanovení aktivity AMADH v kontrolních vzorcích (a) kořenové, (b) nadzemní části 7denních semenáčků *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Vzorky rostlin byly odebírány v časových intervalech 0; 0,5; 1; 2 a 4 h inkubace v růstovém médiu. Experiment byl realizován v technickém triplikátu.

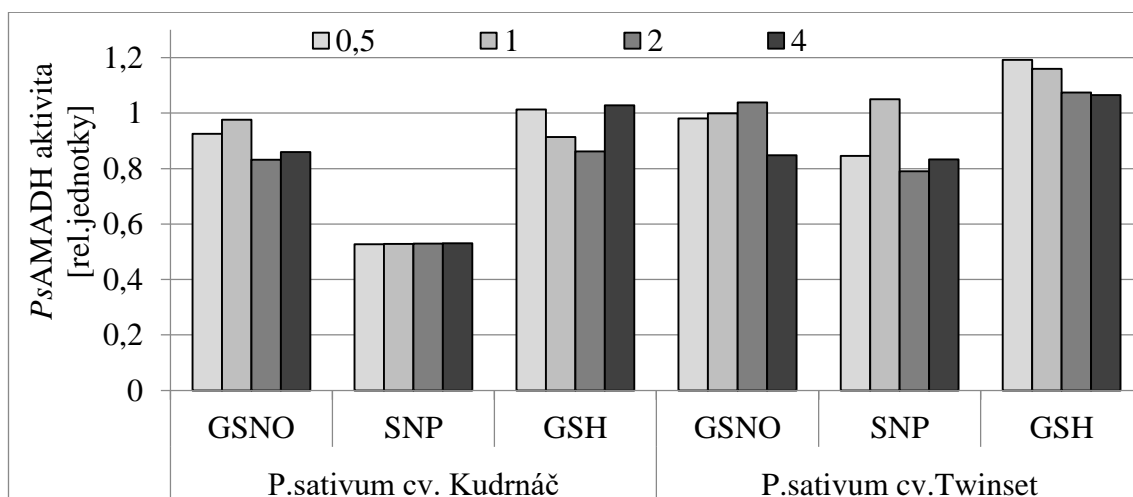
Aktivita AMADH se v kořenové části kontrolních rostlin hrachu setého u obou kultivarů v průběhu experimentu významně snížila (Obr. 37 (a)). Po 4 h inkubace v růstovém médiu bylo zaznamenáno 30% snížení aktivity AMADH a po 24 h 40% pokles v porovnání s aktivitou AMADH stanovenou v extraktech kořenů při zahájení experimentu. V nadzemní části bylo detekováno 15-20% snížení aktivity AMADH až po 24 h (Obr. 37 (b)). Otázkou je, zda pokles aktivit AMADH je fyziologický v rámci vývoje rostliny nebo zda se projevil vliv změny prostředí v důsledku přenosu rostlin z fytotronu do laboratoře, ve které byl realizován vlastní experiment.

Na Obr. 38 jsou znázorněny změny aktivity AMADH po aplikaci donorů NO (GSNO, SNP) a GSH do růstového média po vztahení k aktivitám AMADH v kontrolních rostlinách.

a)



b)



Obr. 38 Orientační stanovení vlivu aplikace GSNO, SNP a GSH do růstového média na aktivitu AMADH v (a) kořenové, (b) nadzemní části 7denních semenáčků *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset. Byly použity roztoky GSNO, SNP a GSH o  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci. Vzorky rostlin byly odebírány v časových intervalech 0,5; 1; 2 a 4 h po aplikaci testovaných látek do růstového média. Relativní jednotky - aktivita *PsAMADH* vztažena ke kontrolnímu vzorku v daném časovém intervalu (rostliny pěstované pouze v růstovém médiu). Experiment byl realizován v technickém triplikátu.

Realizace experimentu, kdy donory NO byly aplikovány k růstovému médiu, ve kterém byly pěstovány 7denní semenáčky, potvrdily inhibiční efekt donorů NO na aktivitu AMADH (Obr. 38). Lze konstatovat, že inhibiční efekt NO na aktivitu AMADH byl významně vyšší v kořenové části v porovnání s nadzemní částí, a to u obou kultivarů hrachu setého. Byl detekován větší inhibiční účinek na aktivitu enzymu při aplikaci donoru SNP v porovnání s GSNO, podobně jako v experimentu, kdy byly aplikovány donory NO k již připraveným extraktům z hrachu setého, což je opačný efekt oproti působení donorů na čistý enzym *PsAMADH1* a 2 (Obr. 29).

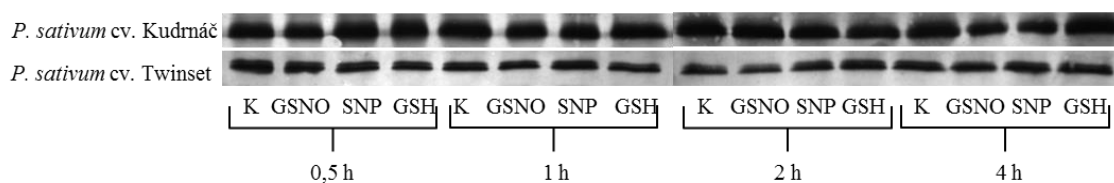
U kořenů *P.sativum* cv. Kudrnáč byla zaznamenána 35% inhibice aktivity AMADH již po 0,5 h inkubace s GSNO (Obr. 38 (a)). Poté se inhibiční efekt snižoval a po 4 h byl pouze 20 %. Inkubace se SNP postupně prohlubovala inhibiční efekt. Po 0,5 h byla detekována 40% a po 4 h 60% inhibice aktivity AMADH. U kořenů *P.sativum* cv. Twinset byla zaznamenána 30% inhibice aktivity AMADH s postupným prohlubováním inhibice na 40 % po 2 h. Poté, podobně jako u kultivaru Kudrnáč, byl detekován snížený inhibiční efekt GSNO, pouze 25% inhibice AMADH. Inkubace se SNP způsobila u kořenů *P.sativum* cv. Twinset po 0,5 h 60% inhibici, která byla po 4 h prohloubena až na 80 %. U kořenových částí obou genotypů byla detekována inhibice aktivity AMADH po aplikaci GSH, a to v rozmezí 10 – 25 %.

Aktivita AMADH v nadzemních částech hrachu byla inhibována zejména po inkubaci s donorem SNP (Obr. 38 (b)). U *P.sativum* cv. Kudrnáč byla zaznamenána konstantní 50% inhibice aktivity AMADH. U *P.sativum* cv. Twinset došlo k 20% inhibici aktivity AMADH. Při inkubaci s donorem GSNO byl zaznamenán u obou genotypů minimální vliv donoru na aktivitu AMADH. Po 0,5 h působení GSH na nadzemní část *P.sativum* cv. Twinset došlo k 20% zvýšení aktivity AMADH.

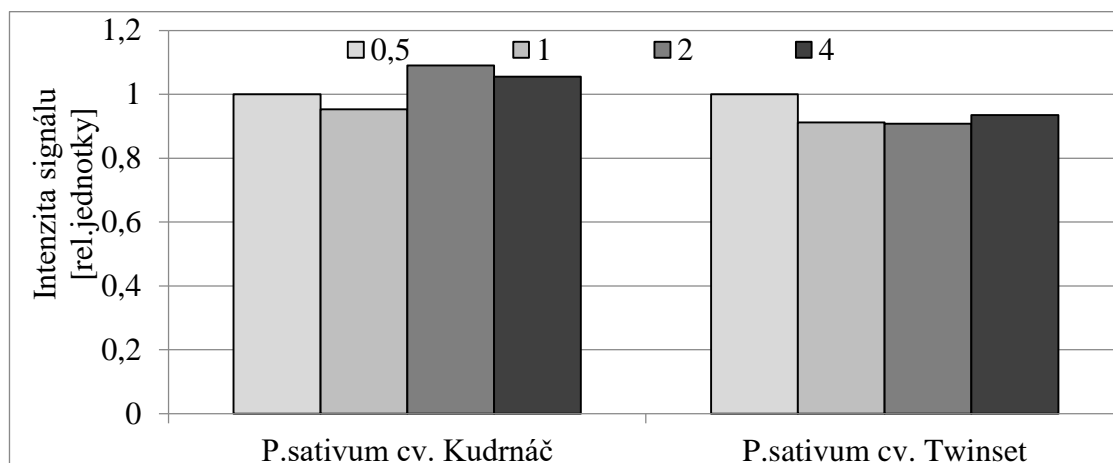
#### 4.4.3 Western blot

AMADH byla detekována metodou Western blot dle metodiky Lindermayr *et al.* (2005). Kořenové části 7denních semenáčků hrachu setého (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset) byly odebírány z kontrolních rostlin a rostlin vystavených působení 1 mmol·l<sup>-1</sup> roztoků GSNO, SNP a GSH po dobu ½, 1, 2 a 4 h při 25 °C. Na Obr. 39 jsou denzitometricky vyhodnocené intenzity bandů odpovídajících proteinům AMADH v kořenech hrachu setého.

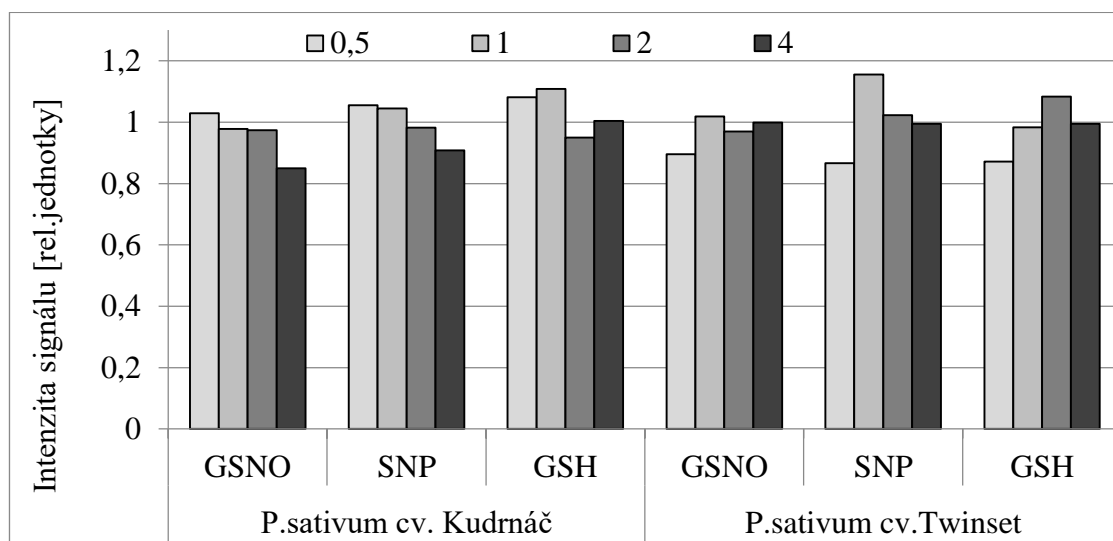
a)



b)



c)



Obr. 39 Detekce AMADH metodou Western blot. Kořeny hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč, *Pisum sativum* cv. Twinset) byly inkubovány s roztoky  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  GSNO, SNP a GSH. Vzorky byly odebrány v časových intervalech  $\frac{1}{2}$ , 1, 2 a 4 h po zahájení experimentu. a) imunochemická detekce PsAMADH na membráně, b) kontrolní vzorky - intenzity bandů vztaženy k hodnotě detekované v čase 0,5 h – relativní jednotky, c) aplikace GSNO, SNP, GSH (intenzity bandů byly vztaženy ke kontrolním vzorkům v daném čase odběru – relativní jednotky). K – kontrola. Jednotlivé bandy AMADH byly denzitometricky vyhodnoceny pomocí programu ImageJ. Experiment byl realizován v jednom opakování.

Minimální změny v hladinách proteinů AMADH u kontrolních rostlin v průběhu realizace experimentu byly detekovány na základě denzitometrického vyhodnocení bandů. (Obr. 39 (b)). Protože se jedná pouze o orientační experiment, který nebyl opakován, lze usuzovat, že ani po aplikaci donorů NO nebo GSH nebyly zaznamenány významné změny v obsahu proteinů AMADH v kořenové části rostlin. Změny intenzity bandů byly pouze v rozsahu 10-15 % (Obr. 39 (c)).

Uvolněný NO má v závislosti na koncentraci použitého donoru NO ochranný účinek ( $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace NO) nebo toxický účinek ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace NO) (Sami *et al.*, 2018). Nadměrná akumulace NO vyvolává v rostlinných buňkách nitrosační stres. Inhibice enzymu AMADH má za následek snížení produkce kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné (GABA), jejíž hlavní rolí je kontrolovat rostlinné odpovědi na stres zahrnující i regulaci produkce NO. GABA vzniká rozkladem polyaminů, které jsou katabolizovány enzymy AMADH a DAO, či z Glu za katalýzy glutamátdekarboxylasy (EC 4.1.1.15). Při stresových odpovědích hraje důležitou roli také signalizace fytohormonů prostřednictvím změn v metabolismu Glu, která je regulována produkcí NO a ROS (Podlešáková *et al.*, 2019).

Regulace aktivity S-nitrosylací byla již detekována u řady enzymů zapojených v obranných reakcích rostlin, jako je např. NADPH oxidasa, APX, nebo GSNOR (Yun *et al.*, 2011, Begara-Morales *et al.*, 2014, Guerra *et al.*, 2016). Ve studii Ortega-Galisteo *et al.* (2012) byla u hrachu setého prokázána regulace S-nitrosylací u klíčových peroxisomálních enzymů zajišťující metabolismus  $\text{H}_2\text{O}_2$  – katalasy a glykolát oxidasy. V bakalářské práci se podařilo prokázat inhibiční efekt donorů NO na aktivitu AMADH. Na základě nepřímých důkazů lze předpokládat, že se jedná o regulaci S-nitrosylací. V současné době jsou v návaznosti na výsledky bakalářské práce realizovány experimenty, umožňující potvrdit tento způsob regulace aktivity AMADH a přímo detekovat pozice Cys, které jsou S-nitrosylovány. Jedná se o metodu biotin-switch v kombinaci s hmotnostní spektrometrií.

## 5 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše zaměřená na reaktivní formy kyslíku a dusíku a jejich role v regulaci aktivity proteinů posttranslačními modifikacemi. Dále byly charakterizovány enzymy metabolismu polyaminů (tj. aminoaldehyddehydrogenasy a diaminoxidasy) a jejich zapojení v mechanismu obranných reakcí rostlin.

V experimentální části bakalářské práce byl studován vliv donorů NO na aktivitu enzymů katabolismu polyaminů – aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) a diaminoxidasy (DAO) realizovaný na rekombinantních enzymech *PsAMADH1* a *PsAMADH2*, vyizolovaném enzymu *PsDAO* a extraktech z kořenové a nadzemní části hrachu setého *Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset lišící se odolností vůči patogenům.

Z provedených experimentů lze vyvodit následující závěry:

1. V případě DAO nebyl prokázán vliv donorů NO na aktivitu enzymu.
2. V korelaci s predikční studií byl prokázán vliv donorů NO na aktivitu *PsAMADH*, a to jak u rekombinantních enzymů, tak v reálných vzorcích (extrakty rostlin). Jedná se o inhibiční efekt.
3. Donor GSNO měl na aktivitu rekombinantních enzymů *PsAMADH1* a *PsAMADH2* větší a rychlejší inhibiční účinek než SNP. V případě reálných vzorků (extrakty rostlin) byl pozorován opačný efekt.
4. Aktivační efekt DTT a GSH poukazuje na oxidaci -SH skupiny Cys v aktivním místě rekombinantních proteinů *PsAMADH*.
5. Experimenty s DTT nepřímo potvrzují reverzibilní interakci NO s -SH skupinami Cys *PsAMADH*.
6. Byl prokázán inhibiční efekt aplikace donorů NO k růstovému médiu na aktivitu *PsAMADH* u 7denních rostlin hrachu setého.



## 6 LITERATURA

- Ahmad P., Latef A.A.A., Hashem A., Abd Allah E.F., Gucel S., Tran L.S.P. (2016): Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in Chickpea. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Alcázar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcio A. F. (2010): Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* **231**, 1237–1249.
- Allen B.W., Liu J., Piantadosi C.A. (2005): Electrochemical detection of nitric oxide in biological fluids. *Nitric Oxide, PT E* **396**, 68-77.
- Anjum N.A., Hasanuzzaman M., Hossein M.A., Thangavel P., Roychoudhury A., Gill S.S., Rodrigo M.A.M., Adam V., Fujita M., Kizek R., Duarte A.C., Pereira E., Ahmed I. (2015): Jacks of metal/metalloid chelation trade in plants-an overview. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Arnold W.P., Longnecker D.E., Epstein R.M. (1984): Photodegradation of sodium-nitroprusside – biologic activity and cyanide release. *Anesthesiology* **61**, 254-260.
- Astier J., Rasul S., Koen E., Manzoor H., Besson-Bard A., Lamotte O., Jeandroz S., Durner J., Lindermayr C., Wendehenne D. (2011): S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Science* **181**, 527-533.
- Astier J., Lindermayr C. (2012): Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: An update. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 15193-15208.
- Bauer G. (2015): Increasing the endogenous NO level causes catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis signaling specifically intumor cells. *Redox Biology* **6**, 353-371.
- Begara-Morales J.C., Sanchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Perez C., Lopez-Jaramillo J., Padilla M.N., Carreras A., Corpas F.J., Barroso J.B. (2014): Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Biology* **65**, 527-538.
- Begara-Morales J.C., Chaki M., Valderrama R., Sanchez-Calvo B., Mata-Perez C., Padilla M.N., Corpas F.J., Barroso J.B. (2018): Nitric oxide buffering and conditional nitric oxide release in stress response. *Journal of Experimental Botany* **69**, 3425-3438.
- Benhar M. (2015): Nitric oxide and the thioredoxin system: a complex interplay in redox regulation. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1850**, 2476-2484.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Bradley S.A., Steinert J.R. (2015): Characterisation and comparison of temporal release profiles of nitric oxide generating donors. *Journal of Neuroscience Methods* **245**, 116-124.
- Brauner F., Šebela M., Snégaroff J., Peč P., Meunier J.-C. (2003): Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 1-10.
- Cai W., Liu W., Wang W.S., Fu Z.W., Han T.T., Lu Y.T. (2015): Overexpression of Rat Neurons Nitric Oxide Synthase in Rice Enhances Drought and Salt Tolerance. *Plos One* **10** (6).
- Cechin I., Cardoso G.S., Fumis T.D., Corniani N. (2015): Nitric oxide reduces oxidative damage induced by water stress in sunflower plants. *Bragantia* **74**, 200-206.
- Corpas F.J., Barroso J.B. (2013): Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New phytologist* **199**, 633-635.
- Corpas F.J., Barroso J.B. (2015): Nitric oxide from a „green“ perspective. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **45**, 15-19.
- Diers A.R., Keszler A., Hogg N. (2014): Detection of S-nitrosothiols. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1840**, 892-900.
- Di Giacomo G., Rizza S., Montagna C., Filomeni G. (2012): Established principles and emerging concepts on the interplay between mitochondrial physiology and S -(de)nitrosylation: Implications in cancer and neurodegeneration. *International Journal of Cell Biology* **2012**, 1-20.

- Domingos P., Prado A.M., Wong A., Gehring C., Feijo J.A. (2015): Nitric Oxide: A Multitasked signaling gas in plants. *Molecular Plant* **8**, 506-520.
- Emamverdian A., Ding Y., Mokhberdorran F., Xie Y. (2015): Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The ScientificWorld Journal* **2015**, 1-18.
- Espunya M.C., Diaz M., Moreno-Romero J., Martinez M.C. (2006): Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell and Environment* **29**, 1002-1011.
- Fancy N.N., Bahlmann A.K., Loake G.J. (2017): Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant Cell and Environment* **40**, 462-472.
- Farnese F.S., Menezes-Silva P.E., Gusman G.S., Oliveira J.A. (2016): When bad guys become good ones: The key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant response to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Fatma M., Masood A., Per T.S., Rasheed F., Khan N.A. (2016): Interplay between nitric oxide and sulfur assimilation in salt tolerance in plants. *Crop Journal* **4**, 153-161.
- Floryszak-Wieczorek J., Milczarek G., Arasimowicz M., Ciszewski A. (2006): Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* **224**, 1363-1372.
- Forrester M.T., Thompson J.W., Foster M.W., Nogueira L., Moseley M.A., Stamler J.S. (2009): Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture. *Nature Biotechnology* **27**, 557-559.
- Gow A., Doctor A., Mannick J., Gaston B. (2007): S-nitrosothiol measurements in biological systems. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science* **851**, 140-151.
- Guerra D., Ballard K., Truebridge I., Vierling E. (2016): S-Nitrosation of Conserved Cysteines Modulates Activity and Stability of S-Nitrosogluthathione Reductase (GSNOR). *Biochemistry* **55**, 2452-2464.
- Halliwell B. (2007): Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical society transactions* **35**, 1147-1150.
- Hancock J.T., Craig T., Whiteman M. (2017): Competition of reactive signals and thiol modifications of proteins. *Journal of Cell Signaling* **2** (4).
- Hancock J.T., Neill S.J. (2019): Nitric oxide: Its generation and interactions with other reactive signaling compounds. *Plant-Basel* **8** (2).
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M.M., Roychowdhury R., Fujita M. (2013): Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 9643-9684.
- He H.Y., He L.F., Gu M.H. (2014): The diversity of nitric oxide function in plant responses to metal stress. *Biometals* **27**, 219-228.
- Hess D.T., Stamler J.S. (2012): Regulation by S-nitrosylation of protein posttranslational modification. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 4411-4418.
- Hetrick E.M., Schoenfisch M.H. (2009): Analytical chemistry of nitric oxide. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2**, 409-433.
- Hogg N. (2010): Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Free Radical Biology and Medicine* **49**, 122-129.
- Holmgren A. (1985): Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry* **54**, 237-271.
- Holmgren A., Lu J. (2010): Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **396**, 120-124.
- Holzmeister C., Gaupels F., Geerlof A., Sarioglu H., Sattler M., Durner J., Lindermayr C. (2015): Differential inhibition of Arabidopsis superoxide dismutases by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Journal of Experimental Botany* **66**, 989-999.
- 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**, 193-197.

- Jensen D.E., Belka G.K., Du Bois G.C. (1998): S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemical Journal* **331**, 659-668.
- Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T. (1999): Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angewandte Chemie-International Edition* **38**, 3209-3212.
- Kopečný D., Tylichová M., Snegaroff J., Popelková H., Šebela M. (2011): Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of omega-aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *Febs Journal* **278**, 3130-3139.
- Kostka P., Park J.K.J. (1999): Fluorometric detection of S-nitrosothiols. *Nitric Oxide, PT C* **301**, 227-235.
- Kovacs I., Lindermayr C. (2013): Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Kumar V., Dooley D.M., Freeman H.C., Guss J.M., Harvey I., McGuirl M.A., Wilce M.C.J., Zubak V.M. (1996): Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 angstrom resolution. *Structure* **4**, 943-955.
- Lancaster J.R. (1997): A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **1**, 18-30.
- Lillig C.H., Holmgren A. (2007): Thioredoxin and related molecules - From biology to health and disease. *Antioxidant & Redox Signaling* **9**, 25-47.
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J. (2005): Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology* **137**, 921-930.
- Lindermayr C., Durner J. (2009): S-nitrosylation in plants: Pattern and function. *Journal of Proteomics* **73**, 1-9.
- Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2004): S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovascular Research* **62**, 43-52.
- Meyer Y., Siala W., Bashandy T., Riondet C., Vignols F., Reichheld J.P. (2008): Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1783**, 589-600.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. (2010): Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment* **33**, 453-467.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.
- Mioto P.T., Rodriguez-Ruiz M., Mot A.C., Zuccarelli R., Corpas F.J., Freschi L., Mercier H. (2017): Alternative fluorimetric-based method to detect and compare total S-nitrosothiols in plants. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **68**, 7-13.
- Molassiotis A., Job D., Ziogas V., Tanou G. (2016): A model system for unlocking the secrets of NO and ROS-inspired priming against salinity and drought. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Mur L.A.J., Mandon J., Persijn S., Cristescu S.M., Moshkov I.E., Novikova G.V., Hall M.A., Harrem F.J.M., Hebelstrup K.H., Gupta K.J. (2013): Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants* **5**, pls052.
- Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C.H. (2012): Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell and Environment* **35**, 454-484.
- Ortega-Galisteo A.P., Rodriguez-Serrano M., Pazmino D.M., Gupta D.K., Sandalio L.M., Romero-Puertas M.C. (2012): S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2089-2103.
- Podlešáková K., Ugena L., Spíchal L., Doležal K., De Diego N. (2019): Phytohormones and polyamines regulate plant stress responses by altering GABA pathway. *New Biotechnology* **48**, 53-65.
- Privat C., Lantoine F., Bedioui F., van Brussel E.M., Devynck J., Devynck M.A. (1997): Nitric oxide production by endothelial cells: Comparison of three methods of quantification. *Life Sciences* **61**, 1193-1202.

- Radi R. (2004): Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4003-4008.
- Reynolds C.R., Islam S.A., Sternberg M.J.E. (2018): EzMol: A Web Server Wizard for the Rapid Visualization and Image Production of Protein and Nucleic Acid Structures. *Journal of Molecular Biology* **430**, 2244-2248.
- Ruiz-May E., Segura-Cabrera A., Elizalde-Contreras J.M., Shannon L.M., Loyola-Vargas V.M. (2019): A recent advance in the intracellular and extracellular redox post-translational modification of proteins in plants. *Journal of Molecular Recognition* **32**.
- Sahay S., Gupta M. (2017): An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress. *Nitric Oxide* **67**, 39-52.
- Sami F., Faizan M., Faraz A., Siddiqui H., Yusuf M., Hayat S. (2018): Nitric oxide-mediated integrative alterations in plant metabolism to confer abiotic stress tolerance, NO crosstalk with phytohormones and NO-mediated post translational modifications in modulating diverse plant stress. *Nitric Oxide* **73**, 22-38.
- Sanghani P.C., Robinson H., Bennett-Lovsey R., Hurley T.D., Bosron W.F. (2003): Structure-function relationships in human Class III alcohol dehydrogenase (formaldehyde dehydrogenase). *Chemico-Biological Interactions* **143**, 195-200.
- Saville B. (1958): A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* **83**, 670-672.
- Schurmann P., Buchanan B.B. (2008): The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxidant & Redox Signaling* **10**, 1235-1273.
- Seabra A.B., Oliveira H.C. (2016): How nitric oxide donors can protect plants in a changing environment: What we know so far and perspectives. *Aims Molecular Science* **3**, 692-718.
- Semchuk N.M., Vasylyk Y.V., Kubrak O.I., Lushchak V.I. (2011): Effect of sodium nitroprusside and S-nitrosoglutathione on pigment content and antioxidant system of tocopherol-deficient plants of *Arabidopsis thaliana*. *The Ukrainian Biochemical Journal* **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.
- Simontacchi M., Galatro A., Ramos-Artuso F., Santa-Maria G.E. (2015): Plant survival in a changing environment: The role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Slocum R.D., Kaursehney R., Galston A.W. (1984): The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **235**, 283-303.
- Staab C.A., Alander J., Brandt M., Lengqvist J., Morgenstern R., Grafstrom R.C., Hoog J.O. (2008a): Reduction of S-nitrosoglutathione by alcohol dehydrogenase 3 is facilitated by substrate alcohols via direct cofactor recycling and leads to GSH-controlled formation of glutathione transferase inhibitors. *Biochemical Journal* **413**, 493-504.
- Staab C.A., Hellgren M., Hoog J.O. (2008b): Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3950-3960.
- Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000): Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1480**, 329-341.
- Šebela M., Radova A., Angelini R., Tavladoraki P., Frébort I., Peč P. (2001): FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Science* **160**, 197-207.
- Tharmalingam S., Alhasawi A., Appanna V.P., Lemire J., Appanna V.D. (2017): Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications. *Biological Chemistry* **398**, 1193-1208.
- Theocharis A., Clement C., Barka E.A. (2012): Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta* **235**, 1091-1105.
- Tylichová M., Kopečný D., Morera S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010): Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum*

- sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. *Journal of Molecular Biology* **396**, 870-882.
- Weretilnyk E.A., Hanson A.D. (1990): Molecular-cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaption to salinity and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**, 2745-2749.
- Williams D.L.H. (1999): The chemistry of S-nitrosothiols. *Accounts of Chemical Research* **32**, 869-876.
- Wink D.A., Miranda K.M., Espey M.G., Pluta R.M., Hewett S.J., Colton C., Vitek M., Feelisch M., Grisham M.B. (2001): Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxidants & Redox Signaling* **3**, 203-213.
- Wymore T., Hempel J., Cho S. S., Mackerell A. D. Jr, Nicholas H. B. Jr, Deerfield D. W. li (2004): Molecular recognition of aldehydes by aldehyde dehydrogenase and mechanism of nucleophile activation. *Proteins* **57**, 758-771.
- 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. *Ploese One* **8** (2).
- Xue Y., Liu Z.X., Gao X.J., Jin C.J., Wen L.P., Yao X.B., Ren J.A. (2010): GPS-SNO: Computational Prediction of Protein S-Nitrosylation Sites with a Modified GPS Algorithm. *Plos One* **5** (6).
- Yu M., Lamattina L., Spoel S. H., Loake G. J. (2014): Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist* **202**, 1142-1156.
- Yun B.W., Feechan A., Yin M.H., Saidi N.B.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.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABAL	3-aminobutanal
ALDH	Alkoholdehydrogenasy
AMADH	Aminoaldehyddehydrogenasa
AO	Aminoxidasa
APAL	3-aminopropanal
APX	Askorbátperoxidasa
BST	Metoda značení pomocí biotinového přepínače
CAT	Katalasa
cv.	Kultivar
DAF-2 DA	4,5-diaminofluorescein diacetát
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát
DAF-FM T	Triazofluorescein
DAO	Diaminoxidasa
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
EPR	Elektronová paramagnetická rezonance
GABA	Kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GBAL	4-guanidinobutyraldehyd
GPX	Guajakolperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	Glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSSG	Redukovaný stav glutathionu
GST	Glutathion-S-transferasa

H <sub>2</sub> DCF DA	2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát
Kad	kadaverin
NOS	NO-synthasa
NR	nitrátreduktasa
PA	Polyaminy
PAO	Polyaminoxidasa
<i>Ps</i> AMADH	Aminoaldehyddehydrogenasa z hrachu setého ( <i>Pisum sativum</i> )
PTM-NO	Posttranslační modifikace způsobená oxidem dusnatým
Put	putrescin
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RSNO	S-nitrosothiol
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicilamin
SNP	Nitroprussid sodný
SOD	superoxiddismutasa
TrxR	Thioredoxinreduktasa
XOD	xanthinoxidoreduktasa