

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Role S-nitrosoglutathionreduktasy v procesu klíčení

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Veronika Kraiczová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Konzultantka:	Mgr. Lucie Kubienová, Ph.D.

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 5. 5. 2014

Veronika Kraiczová

Děkuji své školitelce paní doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za pomoc, odborné vedení, cenné rady, trpělivost, za poskytnutí potřebné literatury a čas věnovaný při zpracování experimentální i teoretické části bakalářské práce.

Dále chci moc poděkovat své konzultantce Mgr. Lucii Kubienové, Ph.D. za obětavou pomoc a trpělivost při vypracování experimentální činnosti. Kolektivu Katedry biochemie děkuji za vytvoření příjemné atmosféry a pomoc při vypracování mé bakalářské práce.

Děkuji kolektivu Katedry Botaniky za poskytnutí rostlinného materiálu a panu prof. Lorenzu Lamattinovi z Argentiny za poskytnutí chitosanu pro mé experimenty.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Veronika Kraiczová
Název práce	Role S-nitrosoglutathionreduktasy v procesu klíčení
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt

Extracelulární adenosintrifosfát (eATP) a oxid dusnatý (NO) se poslední dobou ukazují jako významné signální molekuly ve vývoji rostlin, při klíčení pylu, růstu kořinek, životnosti buněk i buněčné smrti. Průkopníky ve studiu zapojení NO v signálních drahách eATP v rostlinných buňkách byly studie sledující produkci NO vlivem eATP v suspenzní kultuře rajčat, u řas a v etiolovaných semenáčcích *Arabidopsis*. S-nitrosoglutathion (GSNO) představuje relativně stabilní zásobní a transportní formu NO, jejíž hladina je regulována enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR). Studium aktivity a hladiny proteinu GSNOR ukazuje, že je aktivní GSNOR přítomna ve všech orgánech, ale aktivita se liší v závislosti na typu orgánu a vývojové fázi rostliny. V případě *Arabidopsis* byla za fyziologických podmínek nejvyšší exprese GSNOR popsána v kořeni a listech v rané fázi vývoje rostliny, zatímco u rajčete byla nejvyšší exprese i aktivita GSNOR detekována ve stonku a kořeni, nejnižší v listech. Dosud není úloha GSNOR v průběhu růstu semenáčků a vývoje kořenů rostlin plně objasněna. Prezentovaná práce je zaměřena na roli GSNOR v procesu klíčení tří genotypů rajčete *Solanum* spp. lišících se rezistencí k biotrofnímu patogenu padlí rajčatové. Cílem bylo sledovat vliv aplikace eATP (stimuluje produkci NO), GSNO (donor NO), PTIO (lapač NO), inhibitoru GSNOR (N6022) a glutathionu (GSH) (antioxidant, reaguje s NO za vzniku GSNO) na vývoj klíčících rostlin *Solanum* spp., tj. na fyziologické parametry – délka a hmotnost primárního kořene. Po aplikaci eATP, GSNO a sloučeniny N6022 byl pozorován nárůst délky primárních kořenů všech genotypů rajčete, nejintenzivnější růst byl u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. Látky PTIO a GSH růst kořene inhibovaly. Pomocí fluorescenční sondy DAF-FM DA byl fluorescenční mikroskopii zaznamenán nárůst hladiny NO v kořenových špičkách po aplikaci eATP, GSNO a inhibitoru GSNOR, naopak snížená produkce NO byla zaznamenána v přítomnosti lapače NO (PTIO). V rámci pilotních experimentů byla stanovena GSNOR aktivita v kořenech a nadzemní části jednotlivých genotypů.

Klíčová slova	Oxid dusnatý, S-nitrosoglutathionreduktasa, klíčení, eATP, glutathion
Počet stran	76
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Veronika Kraiczová
Title	The role of S-nitrosoglutathione reductase during germination
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2014

Abstract

Extracellular adenosine triphosphate (eATP) and nitric oxide (NO) has been recently shown as important signaling molecule in the development of plants, pollen germination, root growth, cell viability and cell death. Pioneers studies on the involvement of NO in eATP signaling pathways in plant cells have included research on the production of NO triggered by eATP in tomato suspension cultures, algae and in etiolated Arabidopsis seedlings. S-nitrosoglutathione (GSNO) is a relatively stable stock and transport form of NO whose level is regulated by the enzyme S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR). Study of activity and protein levels of GSNOR shows that active GSNOR is present in all organs, but activity varies depending on the type of organ and developmental stage. In the case of Arabidopsis under physiological conditions, the highest GSNOR expression in roots and leaves was described during the early stage of plant development, while in the tomato the highest GSNOR expression and activity was detected in stems and roots and the lowest in the leaves. Actually the role of GSNOR in seedling growth and development of plant roots is not fully elucidated. The present work is focused on the role of GSNOR in the process of germination of three genotypes of tomato, *Solanum* spp. differing in the resistance to tomato powdery mildew. The aim was to investigate the influence of eATP (stimulator of NO production) GSNO (NO donor) PTIO (NO scavenger), substances N6022 (GSNOR inhibitor) and glutathione (GSH, antioxidant, reacts with NO to form GSNO) on the development of seedlings of *Solanum* spp. and their physiological parameters like the length and weight of the primary root. The application of eATP, GSNO and compounds N6022 caused increased length of the primary roots of all tomato genotypes, with the most intense growth in *S. lycopersicum* cv. Amateur. On the other hand, PTIO and GSH inhibited the root growth. Using the fluorescent probe DAF-FM DA an increase in the levels of NO was detected in root tips after the application of eATP, GSNO and GSNOR inhibitor. On the contrary, decreased NO production was recorded in the presence of NO scavenger PTIO. In pilot experiments, GSNOR activity was determined in the roots and aboveground parts of mentioned tomato genotypes.

Keywords	Nitric oxide, eATP, glutathione, S-nitrosoglutathione reductase, germination
Number of pages	76
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	1
1. Úvod	2
2. Současný stav řešené problematiky	3
2.1. Reaktivní formy dusíku v rostlinách	3
2.1.1 Mechanismy vzniku a odbourávání RNS	4
2.1.2 Oxid dusnatý.....	6
2.2 Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku.....	7
2.2.1 Nitrace proteinů	7
2.2.2 S-nitrosylace proteinů.....	8
2.3 S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) jako klíčový enzym regulace S-nitrosylace.....	10
2.3.1 Mechanismus působení a vlastnosti GSNOR.....	10
2.3.1.1 Mechanismus působení GSNOR.....	10
2.3.1.2 Struktura GSNOR.....	11
2.3.1.3 Sekvence GSNOR, molekulová hmotnost a izoelektrický bod	13
2.3.1.4 Substrátová specifita.....	14
2.3.2 Význam a funkce GSNOR u rostlin	14
2.3.2.2 Úloha GSNOR v procesu klíčení a vývoje rostlin	17
2.4 Úloha RNS v procesu klíčení a vývoje rostlin	17
2.5 Základní charakteristika testovaných látek a jejich role v rostlinném organismu.....	23
2.5.1 Extracelulární ATP.....	23
2.5.2 Glutathion	28
2.5.3 S – nitrosoglutathion (GSNO)	29
2.5.4 Syntetický inhibitor GSNOR - N6022	31
2.5.5 cPTIO a PTIO.....	32
2.5.6 Chitosan.....	34
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1 Materiál a přístroje	36
3.1.1 Chemikálie.....	36
3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení	36
3.1.3 Rostlinný materiál	37
3.1.4 Příprava média.....	39
3.1.5 Příprava S-nitrosoglutathionu (GSNO)	39
3.1.6 Vyhodnocení délky kořenů a nadzemní části	39

3.2 Metody	40
3.2.1 Histochemie.....	40
3.2.2 Extrakce.....	40
3.2.3 Stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR)	40
3.2.4 Stanovení proteinů metodou Bradfordové.....	40
3.2.5 SDS-PAGE.....	41
3.2.6 Western blot	42
4. Výsledky a diskuze	44
4.1 Vliv koncentrace sloučeniny N6022 na vývoj kořene a produkci oxidu dusnatého.....	44
4.2 Vliv testovaných látek na vývoj kořene a nadzemní části.....	46
4.3 Vliv testovaných látek na produkci oxidu dusnatého	52
4.4 Vliv testovaných látek na aktivitu GSNOR.....	55
4.5 Detekce GSNOR metodou Western blot.....	58
5. Závěr.....	60
6. Literatura.....	61
7. Seznam použitých zkratk.....	74

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše týkající se problematiky úlohy oxidu dusnatého v procesu klíčení semen a vývoje rostlin se zaměřením na enzym S-nitrosoglutathionreduktasu (GSNOR).

V experimentální části bylo cílem bakalářské práce otestovat vliv aplikace vybraných látek, modulujících hladinu reaktivních forem dusíku, na vývoj klíčících rostlin tří genotypů *Solanum* spp.. Byl stanoven vliv aplikace vybraných sloučenin na:

- fyziologické parametry klíčících rostlin (stanovení délky a váhy kořene a nadzemní části rostlin)
- aktivitu GSNOR, detekce GSNOR metodou Western blot
- produkce ROS a RNS (mikroskopická detekce)

1. Úvod

Klíčení je nejdůležitější proces rostliny, při kterém dochází k obnovení metabolické aktivity semen vedoucí k prodlužování buněk radikuly a hypokotylu embrya. Tento proces je většinou ovlivněn teplotou, vlhkostí, popř. světelným režimem, i když každá rostlina má jiné požadavky na podmínky prostředí. Výzkum semen různých druhů rostlin naznačuje, že právě molekula oxidu dusnatého je složkou signální sítě, která kontroluje dormanci a klíčení semen.

Je známo, že oxid dusnatý se, jako jedna z nejjednodušších biologicky aktivních molekul účastní přenosu extra- a intracelulárních signálů, a vykazuje široké spektrum regulačních funkcí v mnoha fyziologických a patologických procesech v různých typech organismů. Poznatky o funkci oxidu dusnatého u rostlin jsou ve srovnání s živočišnými systémy značně omezené. V roce 1992 byl oxid dusnatý vyhlášený v časopise Science jako „molekula roku“. Díky této ceně a následnému udělení Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu roku 1998 za vyjasnění role oxidu dusnatého jako látky ovlivňující tonus hladkého svalstva, se předmětem intenzivního výzkumu posledních dvaceti let stal metabolismus oxidu dusnatého a dalších reaktivních forem dusíku také v rostlinách.

Z literatury je zřejmé, že oxid dusnatý má významný vliv na vývoj a růst rostliny, klíčení semen, vývoj kořenového systému, regulace růstu pylové láčky, pohybu a otvírání průduchů, senescence, stejně jako v odpovědi na různé formy stresu. Zásobní a transportní formou oxidu dusnatého *in vivo* je nejvýznamnější nízkomolekulární S-nitrosothiol S-nitrosoglutathion. Hladina S-nitrosoglutathionu jako obecně nejrozšířenějšího nízkomolekulárního S-nitrosothiolu je regulována enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR), který tedy hraje roli v regulaci hladiny S-nitrosothiolů a v ochraně buněk před nitrosativním stresem. Studium aktivity a hladiny proteinu GSNOR, který je v několika posledních letech intenzivně studován v řadě výzkumných týmů po celém světě naznačuje, že i když je GSNOR přítomna ve všech orgánech, intenzita se liší v závislosti na orgánu a vývojové fázi dané rostliny. Zatím však nejsou plně objasněny poznatky o úloze GSNOR v průběhu růstu semenáčků a v průběhu vývoje kořene rostlin.

2. Současný stav řešení problematiky

2.1. Reaktivní formy dusíku v rostlinách

Biologicky aktivní od NO odvozené molekuly se označují jako reaktivní formy dusíku (RNS, *reactive nitrogen species*). Volný radikál NO může elektron získat nebo ztratit, za vzniku NO^- nebo NO^+ . K RNS se řadí veškeré oxidy dusíku, dále peroxyinitrit (ONOO^- , vzniká reakcí NO se superoxidem O_2^-) a S-nitrosothioly (RSNOs) (Hill *et al.*, 2010). Reaktivní formy dusíku jsou přehledně uvedeny v tab. 1.

Tab. 1: Přehled reaktivních forem dusíku a jejich zdroje v buňkách (upraveno z Hill *et al.*, 2010)

Název	Vzorec	Poznámky	Intracelulární zdroje
Oxid dusnatý	NO	Nenabitý volný radikál produkovaný NO synthasami	sGC, CcOx, thiolový radikál ($\text{GS}\cdot$)
Nitroxyl	HNO nebo NO^-	Nabitý redukovaný stav, nukleofilní povahy	Přechodné kovy, nukleofily (např. thioly)
Nitrosoniový iont	NO^+	Vznik oxidací NO; neexistuje v neutrálním pH (reaguje s vodou)	Thiolátový aniont
Nitrit	NO_2^-	Produkt reakce NO s O_2 ; redukce na NO při katalýze kovem	Hem
Nitrát	NO_3^-	Nízká reaktivita; produkce oxidací NO	
Oxid dusitý	N_2O_3	Nitrosační činidlo; tvorba reakcí NO s O_2 ; protonace nitritu	Thioly, aminy
Oxid dusný	N_2O	Rajský plyn	
Oxid dusičitý	NO_2 nebo $\cdot\text{NO}_2$	Silné oxidační činidlo; volný radikál; nitrační činidlo	Thioly, fenoly (tyrosin)
Peroxyinitrit	ONOO^- nebo ONOOH	Tvorba reakcí NO se superoxidem; nitrační činidlo	Thioly, přechodné kovy
Peroxyinitrát	O_2NOO^-	Tvorba reakcí NO_2 se superoxidem	?
Nitrosoperoxykarbonát	ONOOCO_2	Tvorba reakcí CO_2 se superoxidem; krátká produkce	Převážně tyrosin
Hydroxylamin	NH_2OH	Produkt reakce nitroxylu	
Amoniak	NH_3	Metabolický odpadní produkt	

Vysvětlivky: sGC – solubilní guanylátcyklasa; CcOx – cytochrom c oxidasa

Pokud je produkce RNS pod buněčnou kontrolou, mohou se podílet tyto sloučeniny na signalizačních procesech. Naopak v případě, že je produkce RNS bez kontroly, dochází k nitrooxidativnímu poškození cílových molekul. Tento proces může být spojen s patologickými projevy (Corpas *et al.*, 2008a; Rubbo a Radi, 2008; White *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2006).

2.1.1 Mechanismy vzniku a odbourávání RNS

Mechanismy vedoucí ke vzniku oxidu dusnatého u živých organismů jsou stále intenzivně studovány. Jednou z možností produkce NO je arginin-dependentní dráha, kdy je NO syntetizován intracelulárně působením enzymu NO synthasy (NOS, EC 1.14.13.39.) (Alderton *et al.*, 2001). Nejlépe je tato reakce popsána na savčích buňkách. NO synthasy jsou hemoproteiny příbuzné s cytochromy P450, katalyzující přeměnu L-argininu za vzniku L-citrulinu a NO. Enzymové reakce se účastní kalmodulin, hem, FAD, FMN a tetrahydrobiopterin. V živočišných buňkách byly identifikovány tři odlišné izoformy. Jedná se o endoteliální NOS (eNOS), neuronální NOS (nNOS) a indukibilní NOS (iNOS) (Kavya *et al.*, 2006; Kone *et al.*, 2003). Existuje řada publikací, ve kterých se vědci snaží prokázat přítomnost enzymu podobného živočišným NOS i v rostlinných buňkách. NOS aktivita byla prokázána v peroxisomech z hrachu a také v mitochondriích z *Arabidopsis* (Barroso *et al.*, 1999; Guo a Crawford, 2005). Ve studii Guo *et al.* (2003) byla popsána NO synthasa v *Arabidopsis thaliana*. V navazujících experimentech bylo zpochybněno, že popsáný protein AtNOS1 má NOS aktivitu (Zemojtel *et al.*, 2006; Guo, 2006) a protein byl přejmenován na AtNOA1 (nitric-oxide associated protein) (Crawford *et al.*, 2006). Další studie naznačují, že produkce NO v rostlinách pomocí NOS je lokalizována zejména v mitochondriích (Gupta *et al.*, 2005; Planchet *et al.*, 2005). Přelom nastal po objevení NOS v zelené řase *Ostroccoccus tauri* z třídy *Prasinophyceae* ve studii Foresi *et al.* (2010).

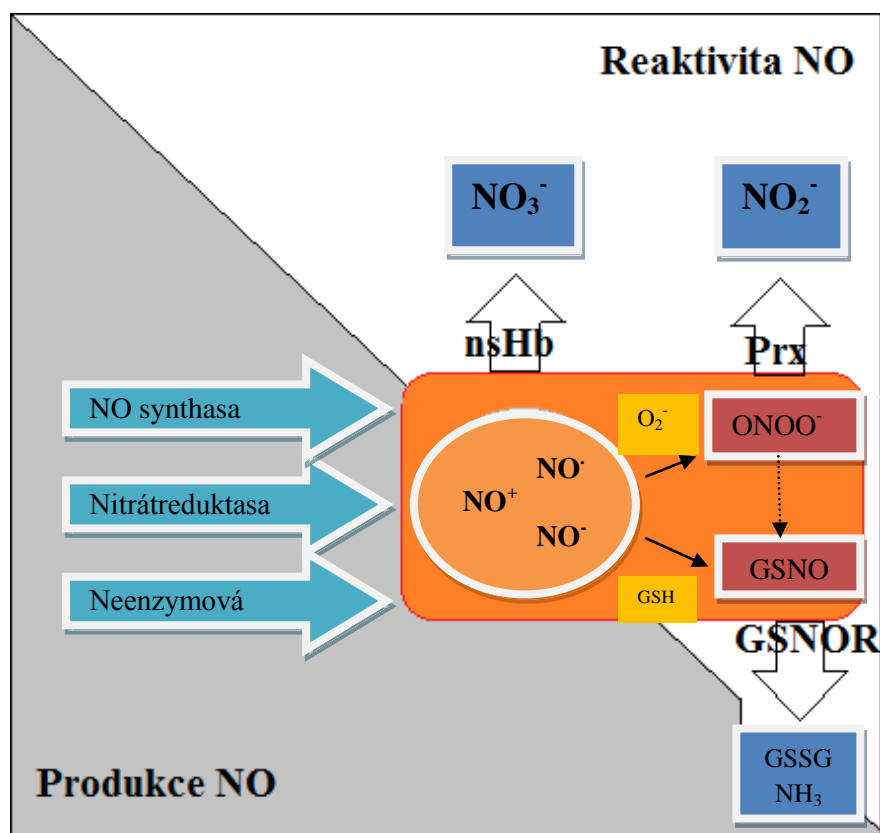
Prvním jednoznačně identifikovaným enzymovým zdrojem NO v rostlinách byl enzym nitrátreduktasa (NR, EC 1.7.1.1). Jedná se o to homodimerní protein s molekulovou hmotností 200-250 kDa v závislosti na rostlinném zdroji. Každý monomer obsahuje tři prostetické skupiny: FAD, hem a molybdenový kofaktor. Hlavní rolí NR v rostlinách je katalýza NAD(P)H-dependentní redukce dusičnanu na dusitan (Yamasaki a Sahikama, 2000). Za určitých podmínek je vzniklý dusitan redukován na NO jedoelektronovou reakcí.

Redukce dusitanu na NO je katalyzována enzymem nitrit:NO reduktasou, který byl lokalizován v plazmatické membráně kořenových buněk tabáku společně s kořenově-specifickou formou nitrátreduktasy (Neill *et al.*, 2008).

U rostlin byly popsány další potenciální enzymové zdroje produkce NO. Křenová peroxidasa katalyzuje tvorbu NO *in vitro* za účasti peroxidu vodíku z *N*-hydroxyargininu nebo hydroxymočoviny (Huang *et al.*, 2004). V živočišných buňkách byla prokázána tvorba NO v reakci katalyzované xanthionoxidasou obsahující molybden (XOD, Zhang *et al.*, 1998). XOD byla prokázána v peroxisomech listů hrachu (Barroso *et al.*, 1999; DeRío *et al.*, 2003).

Za určitých podmínek je možná produkce NO i neenzymovou cestou. K neenzymové redukci dusitanu na NO a dusičnan dochází při nízkém pH v apoplastu (Stohr a Ullrich, 2002). Dusitan může být také chemicky redukován kyselinou askorbovou za fyziologických hodnot pH na NO a kyselinu dehydroaskorbovou (Yamasaki, 2000). Posledním neenzymovým mechanismem je tvorba NO v membránách chloroplastů, kdy je přeměna dusitanu na NO zprostředkována světlem a katalyzovaná karotenoidy (Coosey *et al.*, 1994).

V rostlinách byly prokázány tři základní mechanismy odbourávání NO: 1. pohlcování NO nesymbiotickými hemoglobiny (nsHb) 2. přeměna NO na S-nitrosoglutathion, který je degradován pomocí S-nitrosoglutathionreduktasy, 3. vznik peroxodusitanu (peroxynitrit, ONOO⁻) reakcí NO se superoxidovým radikálem. Peroxynitrit je následně detoxifikován peroxiredoxiny (Prx, Leitner *et al.*, 2009).



Obr. 1: Základní dráhy produkce a přeměny NO (upraveno podle Leitner *et al.*, 2009).

Tab. 2: Lokalizace produkce NO v rostlinné buňce (zpracováno podle Fröhlich a Durner 2011).

Lokalizace	Mechanismy podílející se na produkci (<i>odbourávání</i>) NO
Buněčná stěna	Neenzymová produkce
Plazmatická membrána	Nitrit:NO reduktasa
Endoplazmatické retikulum	Hemoproteiny obsahující molybden jako kofaktor/Fe-S klastry
Mitochondrie	Arginin-dependentní tvorba NO GSNO Eletronový transportní řetězec (cyt <i>c</i> , cyt <i>c</i> oxidasa, komplex III)
Chloroplasty	Arginin-dependentní tvorba NO GSNO
Peroxisomy	Arginin-dependentní tvorba NO GSNO Hemoproteiny obsahující molybden jako kofaktor/Fe-S klastry Katalasa Xanthinoxidasa
Apoplast	Polyaminoxidasa
Cytosol	Nitrátreduktasa (NR) NADPH:NR Hemoproteiny obsahující molybden jako kofaktor/Fe-S klastry

2.1.2 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý je malá, nenabitá téměř polární molekula, která volně difunduje přes membrány z jednoho prostoru do druhého. Z chemického hlediska se jedná o reaktivní volný radikál s nepárovým elektronem. Tento elektron umožňuje, že je molekula oxidu dusnatého paramagnetická (Thomas *et al.*, 2001). Tato molekula s velmi krátkou dobou života je přítomna v rostlinných i živočišných buňkách v podobě plynného radikálu a hraje důležitou roli v řadě fyziologických i patofyziologických procesech ve všech typech organismů (Tuteja *et al.*, 2004).

NO byl charakterizován v poslední době jako důležitá signální molekula, která zprostředkovává řadu vývojových a fyziologických procesů v rostlinách, jako je klíčení semen, růst postranních kořenů, kvetení, uzavírání průduchů a reakce na abiotické stresy (Pagnussat *et al.*, 2002; Simpson, 2005; Libourel *et al.*, 2006; Lombardo *et al.*, 2006; Neill *et al.*, 2008). Podle studií Guo a Crawford (2005) a Zago *et al.* (2006) je NO klíčový regulátor senescence listů a buněčné smrti u vyšších rostlin. Reakcí s reaktivními formami kyslíku (ROS, *reactive oxygen species*) se NO může podílet na ochraně rostlin před oxidativním stresem (Beligni *et al.*, 2002; Guo a Crawford, 2005). Možné funkce NO ve fyziologických

a patofyziologických procesech u rostlin jsou přehledně shrnuty v tab. 3 (Piterková *et al.*, 2008).

Tab. 3: Funkce oxidu dusnatého v rostlinném systému (podle Piterkové *et al.*, 2008)

Funkce	
<i>Fyziologické pochody</i>	růst a vývoj klíčení vývoj kořenové systému pohyb svěřacích buněk průduchů senescence a programovaná buněčná smrt lignifikace buněčné stěny metabolismus buněčných organel
<i>Funkce v buněčných organech</i>	
Chloroplasty	biosyntéza chlorofylu, fotofosforylace
Mitochondrie	regulace cytochromu <i>c</i> oxidasy
Peroxisomy	regulace katalasy a askorbátperoxydasy
Cytosol	regulace akonitasy
<i>Biotický stres</i>	programovaná buněčná smrt hypersenzitivní reakce systémová odezva
<i>Abiotický stres</i>	poranění sanilita vysoká teplota sucho těžké kovy

2.2 Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku

Posttranslační kovalentní modifikace ovlivňují a kontrolují strukturu, aktivitu, funkci, buněčnou lokalizaci, stabilizaci a odbourávání proteinů. Při nitračních a nitrosačních modifikacích dochází k reakci RNS s postranními řetězci proteinových aminokyselin, což vede k jejich nitraci, nitrosylaci a oxidaci. Nitrace tyrosinu za vzniku 3-nitrotyrosinu a nitrosylace thiolových skupin cysteinů na S-nitrosocystein jsou nejvíce prozkoumané *in vivo* reakce.

2.2.1 Nitrace proteinů

Navázáním nitroskupiny na tyrosin nebo na tryptofan za vzniku 3-nitrotyrosinu resp. 6-nitrotryptofanu může docházet ke změně konformace modifikovaných proteinů a tím i ovlivnění jejich biologické aktivity. Tato modifikace výrazně zabraňuje možnosti fosforylace tyrosinu, což může mít za následek ovlivnění rychlosti přenosu informace v řadě signálních drah. Přehled nejvýznamnějších nitračních činidel je v tab. 4 (Hnízdová *et al.*, 2009).

Tab. 4: Přehled nejvýznamnějších nitračních činidel *in vivo* (podle Hnízdová *et al.*, 2009)

Název	Vzorec	Mechanismus nitrace tyrosinu	Příklad nitrovaného proteinu
Oxid dusnatý	NO	Radikálový	prostaglandinsynthasa
Oxid dusičitý	NO ₂	Radikálový	sérový albumin
Peroxyinitrit	ONOO ⁻	Radikálový elektrofilní substituce	cytochrom c
Kyselina dusitá	HNO ₂	Radikálový	sérový albumin
Nitrylchlorid	NO ₂ Cl	Radikálový	sérový albumin

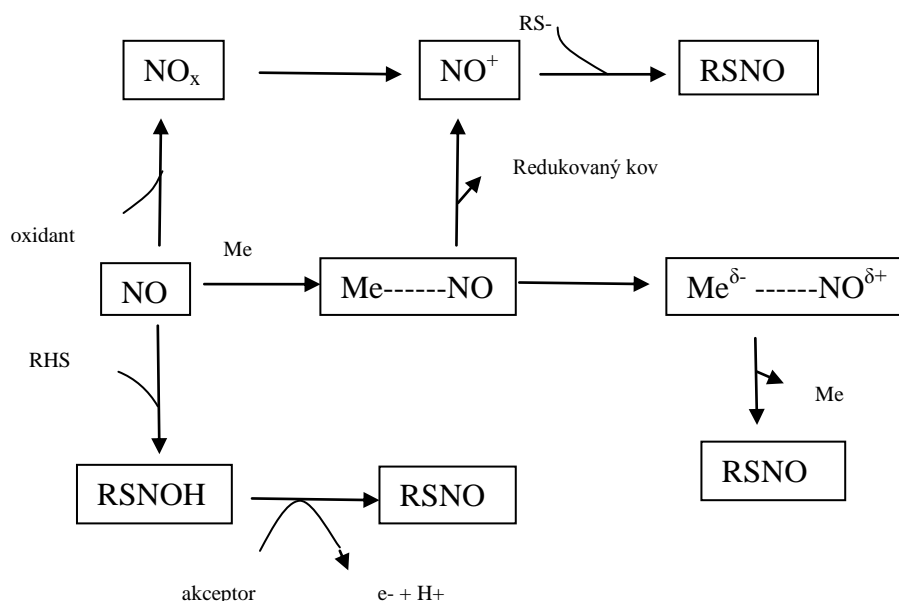
Nejčastější a nejpravděpodobnější způsob průběhu nitrace proteinů je působení peroxyinitritu a hemové peroxidasy, které společně umožňují vznik vysoce reaktivního nitračního činidla NO₂. Dalšími mechanismy vzniku těchto činidel jsou např. rozklad dusitanů hemoproteiny s pseudoperoxidasovou aktivitou nebo přímá reakce radikálu NO s tyrosylovými radikály (Souza *et al.*, 2008; Frein *et al.*, 2005). Stav, kdy dochází k vzájemné reakci ROS a RNS vedoucí ke vzniku silných nitračních činidel, se označuje pojmem „nitrosační stres“ (Souza *et al.*, 2008).

Nejvýznamnějším nitračním činidlem *in vivo* je peroxyinitritový anion ONOO⁻, který vzniká reakcí radikálu NO se superoxidovým aniontem nebo také reakcí nitrosylového aniontu s molekulárním kyslíkem. Je známo, že nitrace proteinů patří mezi selektivní modifikace. Hlavními třemi faktory ovlivňujícími selektivitu jsou: 1. vzdálenost proteinů od místa tvorby nitračních činidel, 2. množství proteinu a tyrosinových residuí, 3. primární sekvence v okolí tyrosinu (Ischiropoulos, 2003).

2.2.2 S-nitrosylace proteinů

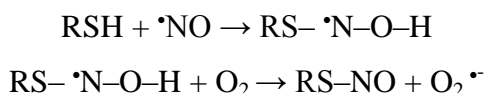
S-nitrosylace je definována jako kovalentní připojení jednoho ekvivalentu oxidu dusnatého (NO[•]) na thiolový postranní řetězec cysteinu (Stamler *et al.*, 1992). Podobně jako fosforylace je tato modifikace místně specifická, ale je labilnější ve srovnání s fosforylací (Hess a Stamler, 2011). Poprvé byl tento proces popsán ve studii Stamler *et al.* (1992) u sérového albuminu a od té doby byla v biologických systémech objevena řada proteinů podléhajících S-nitrosylaci. S-nitrosylace představuje důležitý mechanismus regulace funkce proteinů působením RNS nezávisle na cGMP (cyklický guanosinmonofosfát), tato reakce probíhá bez enzymové katalýzy. Vedle S-nitrosylovaných proteinů vznikají v živém organismu i nízkomolekulární S-nitrosothioly, jako je např. S-nitrosoglutathion, které jsou relativně stabilnější a mají delší poločas života než NO. *In vivo* slouží GSNO jako zásobní a transportní forma NO (Carver *et al.*, 2005).

Je známa řada mechanismů S-nitrosylace proteinů, dosud je však předmětem studie, který z nich převládá *in vivo* (obr. 2).



Obr. 2: Mechanismy vzniku S-nitrosothiolů: Reakce NO s oxidanty (O₂, O₂⁻) vedou k vyšším oxidům dusíku, které reagují s redukovanými thioley (RSH) za vzniku radikálového meziproduktu RSNOH na S-nitrosothioly (RSNO). Přechodné kovy (Me) mohou působit jako katalyzátory S-nitrosylace nebo vést k tvorbě nitrosylačního činidla NO⁺ (upraveno podle Gow *et al.*, 2004).

Předpokládá se, že S-nitrosylace probíhá prostřednictvím např. N₂O₃ a N₂O₄ (dimer NO₂). Reakce nitrosoniového kationtu (NO⁺) s thiolem představuje další možný vznik RSNO. K tvorbě RSNO *in vivo* dochází rovněž reakcí thiolu s peroxynitritem. Mechanismus, kdy NO přímo reaguje s thioley za vzniku radikálového meziproduktu a může být v přítomnosti akceptoru elektronů přeměněn na RSNO, byl popsán ve studii Gow *et al.* (1997). Popsaný mechanismus tvorby RSNO probíhá i v anaerobních podmínkách za účasti např. NAD⁺.



2.3 S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) jako klíčový enzym regulace

S-nitrosylace

S-nitrosoglutathionreduktasa patří z hlediska enzymové klasifikace do rodiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3; EC 1.1.1.1, S-(hydroxymethyl) glutathion:NAD⁺ oxidoreduktasa), které se vyznačují vyšší afinitou k alkoholům s delším řetězcem. V dřívějších publikacích byla ADH3 označována jako glutathiondependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH, EC 1.2.1.1), vzhledem ke své schopnosti katalyzovat NAD⁺ a glutathion-dependentní oxidaci formaldehydu. Později bylo zjištěno, že se enzym podílí na oxidaci hydroxylové skupiny S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGS), spontánního aduktu formaldehydu a glutathionu (GSH), za vzniku S-formylglutathionu a enzym byl přejmenován na S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasu (ES 1.1.1.284). Tento enzym je také schopen katalyzovat NADH-dependentní redukci S-nitrosoglutathionu (GSNO), která vede ke vzniku oxidovaného glutathionu (GSSG) a amoniaku (Jensen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001).

Nejčastěji používaným názvem enzymu v současné vědecké literatuře je tedy S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR), tento název však zatím nebyl názvoslovnou komisí IUBMB schválen.

2.3.1 Mechanismus působení a vlastnosti GSNOR

2.3.1.1 Mechanismus působení GSNOR

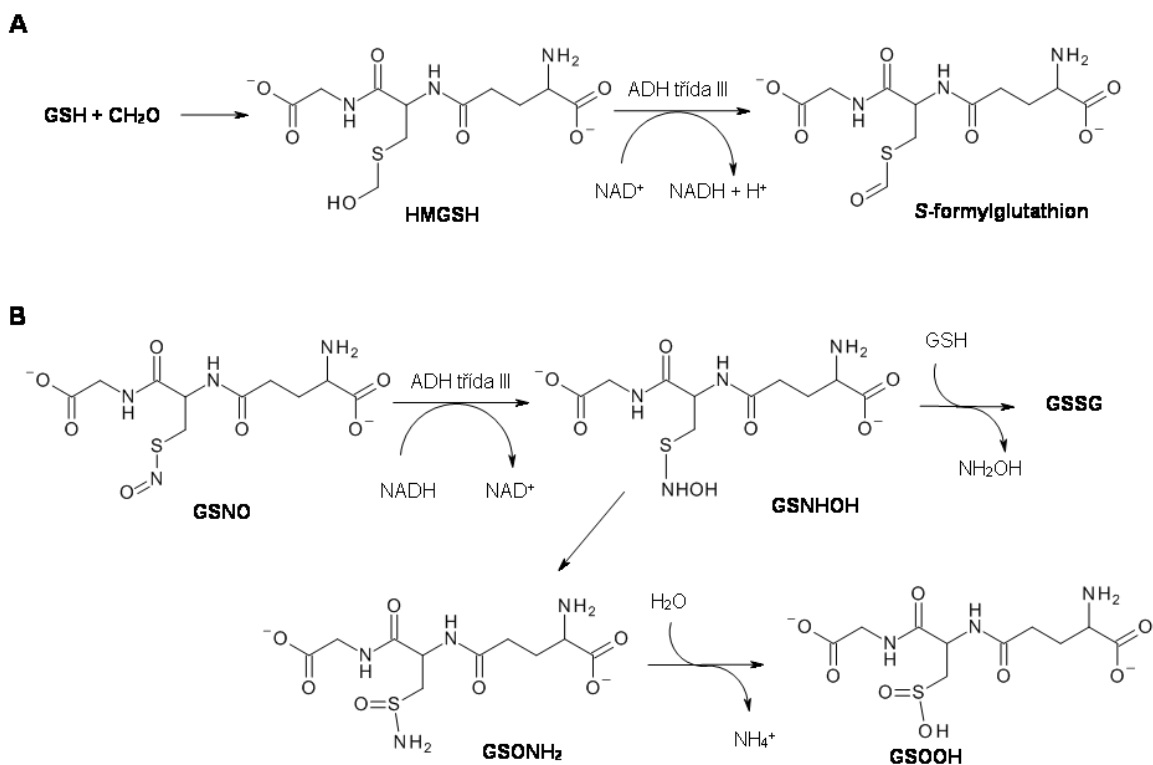
S-nitrosoglutathionreduktasa má klíčovou funkci v regulaci intracelulární hladiny S-nitrosoglutathionu (GSNO) a S-nitrosothiolů, následně tak má důležitou roli v celkovém metabolismu NO a RNS (Benhar *et al.*, 2009). Na obr. 3 je uvedené schéma reakcí katalyzovaných GSNOR.

Důležitým faktorem regulující redukci GSNO je buněčný redoxní potenciál. Redukcí GSNO dochází ke vzniku nestabilního N-hydroxysulfinamidu (GSNHOH). V závislosti na koncentraci GSH vzniká konečný produkt. Pokud je v buňce nadbytek GSH dochází k uvolnění hydroxylaminu (NH₂OH) a glutathiondisulfidu (GSSG). Při nízké hladině GSH spontánním přeskupením GSNHOH vzniká GSONH₂, který je v kyselém prostředí hydrolyzován na glutathionsulfinovou kyselinu (GSO₂H) a amoniak (Jensen *et al.*, 1998).

Dalším důležitým faktorem regulace hladiny GSNO je buněčná dostupnost NADH, koenzymu GSNOR. Poměr NAD⁺/NADH v cytoplazmě je vysoký, naopak poměr pro koenzym NADP⁺/NADPH je nízký. Nízký poměr NADP⁺/NADPH umožňuje redukované

formě vystupovat jako reduktant v biosyntetických drahách. NADPH nemůže být ve významné míře využit jako koenzym GSNOR.

Další reakcí katalyzovanou GSNOR je NAD⁺-dependentní oxidace S-(hydroxymethyl) glutathionu, který vzniká reverzibilní reakcí formaldehydu a glutathionu. Tato reakce představuje důležitý krok při detoxifikaci exogenního i endogenního formaldehydu. Oxidací HMGSH vzniká S-formylglutathion, který je dále hydrolyzován S-formylglutathionhydrolasou (EC 3.1.2.12) (Espunya *et al.*, 2006).



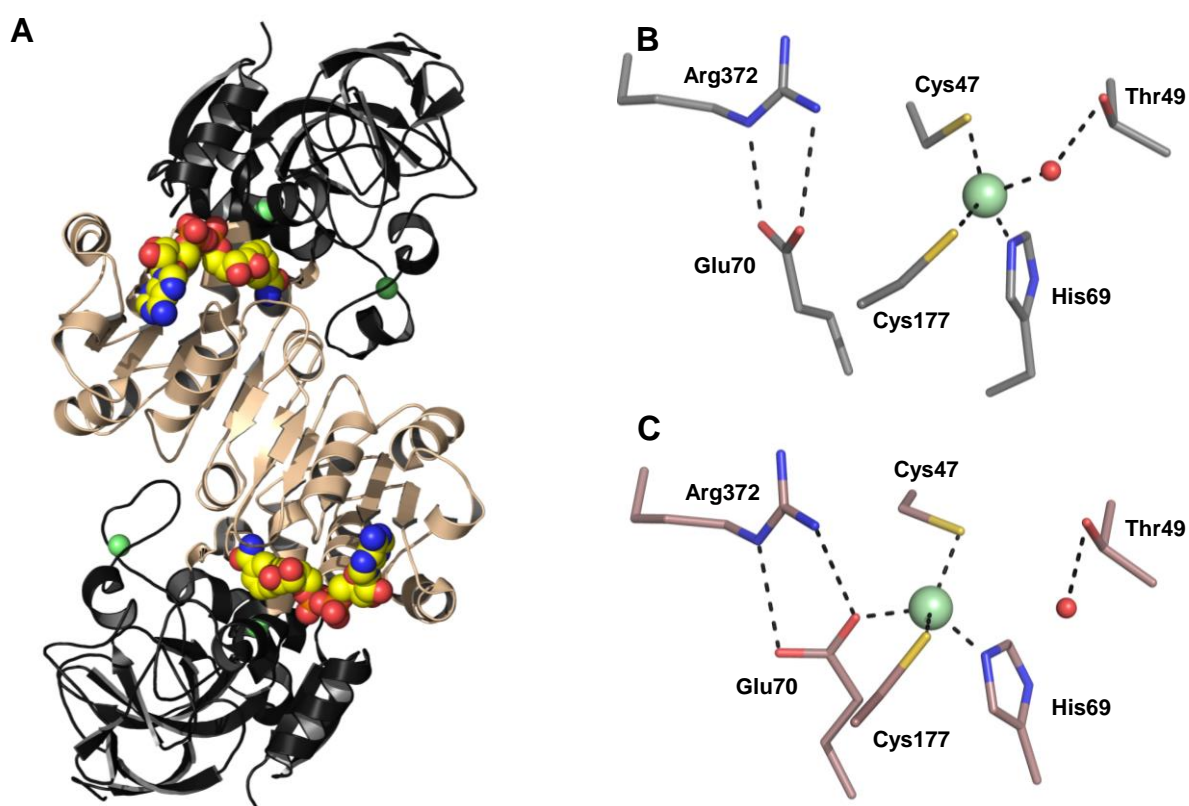
Obr. 3: Reakce katalyzované S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR) (převzato z Kubienová *et al.*, 2013a). A) dehydrogenasová reakce, B) reduktasová reakce. Konečný produkt závisí na koncentraci GSH (Jensen *et al.*, 1998; Hedberg *et al.*, 2003).

2.3.1.2 Struktura GSNOR

S-nitrosoglutathionreduktasa má homodimerní strukturu, která obsahuje dva atomy zinku. Monomer (40 kDa) je tvořen velkou katalytickou doménou a menší doménou s vazebným místem pro koenzym (Engeland *et al.*, 1993; Sanghani *et al.*, 2003a). První publikovanou rostlinnou strukturou GSNOR je krystalová struktura enzymu ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur (SIGSNOR). SIGSNOR je homodimer s 81 085 Da (Kubienová *et al.*, 2013a) (obr. 4). Každá podjednotka se skládá z velké katalytické domény obsahující dva atomy zinku a z domény vázající koenzym. Aktivní místo je vysoce konzervativní mezi SIGSNOR

a hGSNOR a je lokalizováno ve velké štěrbině mezi katalytickou a koenzym vázající doménou.

Pouze jeden atom zinku na monomeru je zapojen v katalýze, zatímco druhý má strukturální úlohu. Katalytický ion zinku, který funguje jako Lewisova kyselina, je vázán na Cys177, Cys47, His69 a buď Glu70 nebo na molekulu vody (např. hydroxid anion) a aktivuje alkoholy nebo jiné substráty v průběhu katalýzy. Strukturální zinek je vázán na čtyři cysteiny, a to Cys99, Cys102, Cys105 a Cys113. Ve třídě ADH I jsou atomy katalytického a strukturálního zinku obvykle vázány podobným způsobem jako u ADH třídy III. Hlavním rozdílem je, že Glu70 neinteraguje s katalytickým atomem zinku v ADHI (obr. 4) (Kubienová *et al.*, 2013a).



Obr. 4: Krystalová struktura rostlinné GSNOR *Solanum lycopersicum* cv. Amateur (Kubienová *et al.*, 2013a). A) Struktura SIGSNOR v přítomnosti koenzymu NAD^+ . Katalytické domény a koenzym vázající domény jsou zobrazeny v černé a světle hnědé. Koenzym NAD^+ (Atomy uhlíku – žlutá; atomy dusíku – modrá; atomy kyslíku – červená) a atomy zinku (zeleně) jsou zobrazeny jako kuličky.

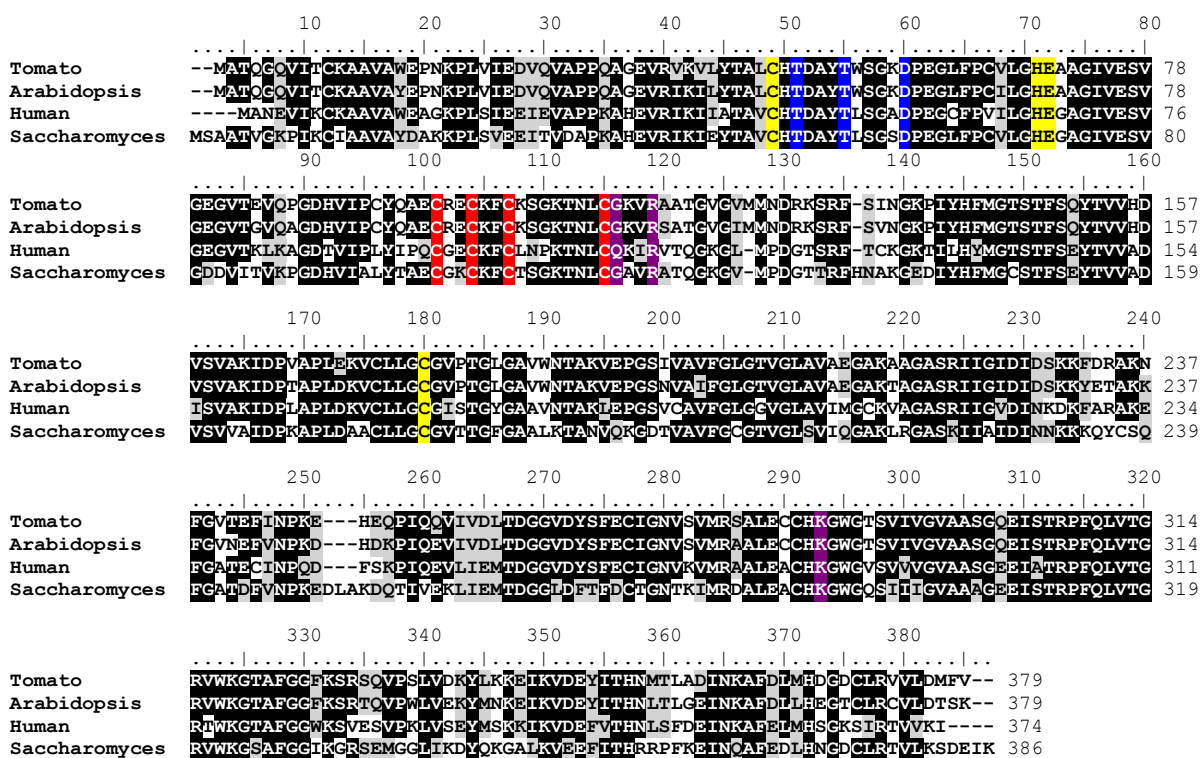
B) Koordinace katalického atomu zinku (zeleně) ve struktuře apoenzymu a C) v binárním komplexu s koenzymem NAD^+ . Aktivní místo vody je zobrazeno jako červená kulička.

2.3.1.3 Sekvence GSNOR, molekulová hmotnost a izoelektrický bod

U vyšších rostlin byla poprvé GSNOR studována u *A. thaliana*. Gen AtGSNOR (*At5g43940*) kóduje glutation-dependentní formaldehyddehydrogenasu, která vykazuje schopnost snižovat hladinu GSNO (Letterier *et al.*, 2011). Podle Kubienová *et al.* (2013a) bylo zjištěno, že sekvence GSNOR pro *S. chmielewskii* se liší od dalších dvou studovaných genotypů *Solanum* spp. (*S. habrochaites* a *S. lycopersicum cv. Amateur*) sekvencí v šesti bázích, ale bez jakékoli změny na úrovni aminokyselin. SIGSNOR vykazuje 90% identitu v sekvenci s rostlinnou GSNOR z *A. thaliana* a *Zea mays*. Dále byla popsána vysoká homologie s lidskou GSNOR (67%) a GSNOR ze *Saccharomyces cerevisiae* (61%) (obr. 5).

Molekulová hmotnost podjednotky GSNOR izolované z *A. thaliana* stanovená na základě metody SDS-PAGE je 44,6-45 kDa (Martinez *et al.*, 1996; Achkor *et al.*, 2003). Metodou MALDI-TOF byla u GSNOR z rajčete stanovena molekulová hmotnost 42,5 kDa (Kubienová *et al.*, 2013a).

Metodou isoelektrické fokusace v pH gradientu 3-9 byly stanoveny isoelektrické body dvou vizualizovaných bandů: 5,3 a 5,6 u *A. thaliana* (Martinez *et al.*, 1996).



Obr. 5: Srovnání aminokyselinových sekvencí GSNOR z rajčete (GU296438), *Arabidopsis* (CAA57973), lidské (M30471) a ze *S. cerevisiae* (NM_001180228) v programu MUSCLE v 3.8 (převzato z Kubienová *et al.*, 2013a). Identické aminokyseliny jsou zvýrazněny černě, podobné (60% shoda) šedě. Čtyři cysteiny vázající katalytický atom zinku jsou zvýrazněny

žlutě. Residua vázající substrát HMGS_H jsou zvýrazněna modře. Residua tvořící tzv. anion-vazebnou kapsu jsou zvýrazněny fialově.

2.3.1.4 Substrátová specifita

Struktura aktivního místa GSNOR (patří mezi alkoholdehydrogenasy třídy III) je výrazně odlišná oproti klasické alkoholdehydrogenase třídy I. Residua 53-59 a 113-120 jsou lokalizovaná dále od aktivního místa, které se tím podstatně zvětší a vytváří se rozšířený vstup pro substrát do vazebné domény. Toto zvětšené aktivní místo je uzpůsobeno pro vazbu větších substrátů jako je GSNO, HMGS_H a alkoholy s delším řetězcem a ω -hydroxymáselné kyseliny. Tyto strukturní změny jsou základem odlišné substrátové specifity ADH3.

GSNOR přednostně oxiduje HMGS_H, následuje geraniol, cinnamylalkohol, ω -hydroxymáselná kyselina a alifatické alkoholy s dlouhým řetězcem (nonanol a oktanol). Alkoholy s krátkými řetězci (etanol a propanol) nejsou a nemohou být substráty GSNOR. Pro vazbu HSGS_H a GSNO hraje klíčovou roli zejména Arg114, jehož kladný náboj ve vazebném místě usnadňuje vazbu a správnou orientaci negativně nabitých substrátů (Staab *et al.*, 2009; Sanghani *et al.*, 2003b). Nejvýznamnějším substrátem enzymu GSNOR je S-nitrosoglutathion.

2.3.2 Význam a funkce GSNOR u rostlin

ADH3 je vysoce konzervativní a všudypřítomný enzym přítomen u prokaryot i eukaryot. Jak už bylo zmíněno je tento enzym schopen katalyzovat NADH-dependentní redukci GSNO na GSSH a NH₃ (Jensen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001). Tato reakce je klíčová pro regulaci intracelulární hladiny GSNO a S-nitrosothiolů a následně ovlivňuje metabolismus NO v buňkách. Tímto může být změněna transnitrosativní rovnováha mezi GSNO a S-nitrosylovanými proteiny a v důsledku toho se enzym GSNOR aktivně podílí na udržení buněčné homeostázy NO. Bylo také pozorováno, že reakce katalyzovaná GSNOR má vliv na rovnováhu GSH a NADH, a tím je enzym nepřímo zapojen do regulace buněčného redoxního stavu. V nedávné době bylo prokázáno zapojení GSNOR v regulaci buněčné smrti rostlin v rámci procesu S-nitrosylace (Chen *et al.*, 2009).

GSNOR se nachází zejména v cytosolu, ale byla potvrzena také jaderná a peroxisomální lokalizace. Jaderná GSNOR se může podílet na regulaci lokální hladiny GSNO a tak chránit genetický materiál před NO-indukovaným poškozením (Staab *et al.*, 2008a, b).

GSNOR hraje důležitou roli v obranné reakci rostlin vystavených působení biotických a abiotických stresových faktorů, a také v odolnosti proti onemocnění (Engeland *et al.*, 1993; Sanghani *et al.*, 2003a; Sanghani *et al.*, 2002; Sanghani *et al.*, 2003b). Byla prokázána významná role GSNOR při ochraně buněk před nitrosativním stresem u kvasinek, rostlin i savců (Piterková *et al.*, 2008; Širová *et al.*, 2011; Weitzberg *et al.*, 2010).

2.3.2.2 Úloha GSNOR v reakci rostliny na působení stresových faktorů

Podmínky vnějšího prostředí jsou velmi proměnlivé a ovlivňují rostliny v průběhu celého života. Mohou zpomalovat životní funkce, poškozovat jednotlivé orgány a v nejzazším případě způsobit smrt rostliny. Stres je pojem vyjadřující stav rostliny, která je vystavena nepříznivým vlivům vnějšího prostředí (stresové faktory, stresory). Stresové faktory můžeme rozdělit na abiotické a biotické faktory. Abiotické faktory se dále rozdělují na fyzikální a chemické. Fyzikálními faktory jsou mechanické účinky větru, nadměrné záření (UV, viditelné) či extrémní teploty jako horko, chlad nebo mráz. Nedostatek vody, kyslíku (hypoxie, anoxie) a živin v půdě, nadbytek iontů solí a vodíku, přítomnost toxických kovů v půdě a plynů ve vzduchu se označují jako chemické faktory. Mezi biotické faktory patří působení herbivorních živočichů (spásání, poranění), patogenních mikroorganismů (viry, mikroby, houby) a vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitismus).

Stresová reakce má několik fází. Po působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a funkci buňky a tento proces se nazývá poplachová fáze. Následuje restituční fáze, kdy dochází k aktivaci obranných mechanismů. V rámci této fáze nepřekročí intenzita stresu letální úroveň. Fází rezistence se mívá stav, kdy rostlin zvyšuje svou odolnost vůči působícím faktorům. Poslední fází je vyčerpání, které nastává po dlouhodobém a intenzivním působením stresoru (Procházka *et al.*, 1998).

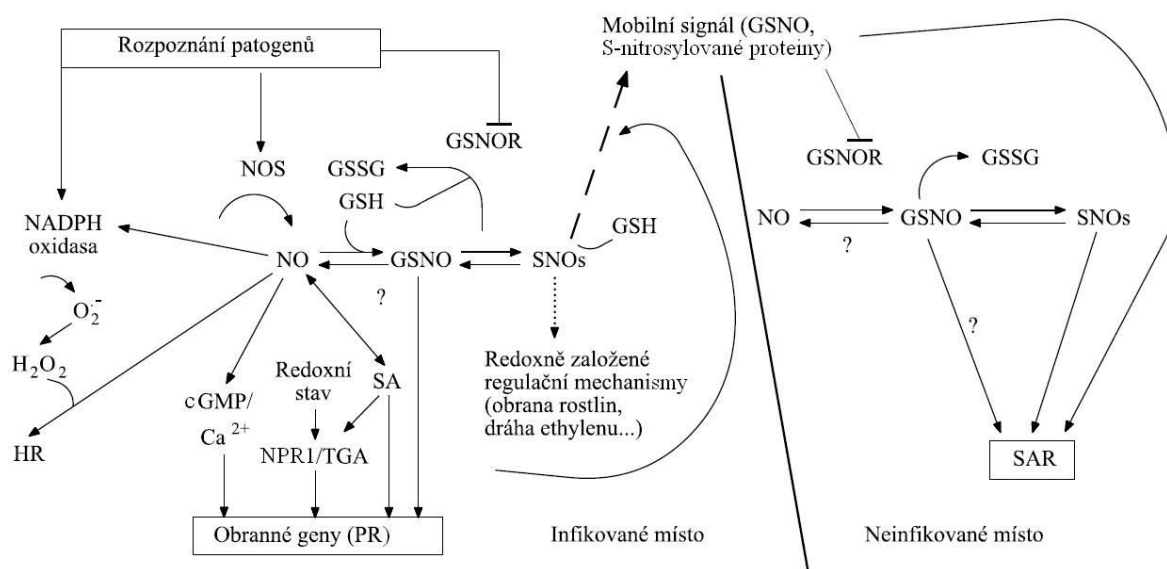
U genu *AtGSNOR* v případě mechanického poranění dochází k represi, zatímco při působení kyseliny salicylové (mediátoru biotického stresu) je gen aktivován. Podobný účinek byl pozorován u rostlin tabáku, kdy po aplikaci kyseliny jasmonové poklesla hladina i aktivita GSNOR, naproti tomu při ošetření salicylátem došlo k nárůstu aktivity (Díaz *et al.*, 2003). Významný pokles aktivity a exprese GSNOR byl zaznamenán u mechanicky poškozených rostlin slunečnice (Chaki *et al.*, 2011).

Aktivita GSNOR je nezbytně nutná pro aklimatizace rostlin *A. thaliana* na vysoké teploty a bylo prokázáno její zapojení v mechanismu termotolerance (Lee *et al.*, 2008). Rostliny s defektním genem *GSNOR* (hot5mutant) mají sníženou odolnost na stres zvýšenou teplotou v důsledku narušené homeostázy buněčných S-nitrosothiolů a signálních drah RNS.

Při působení chladu jako stresoru byl u hrachu (*Pisum sativum*) pozorován nárůst aktivity GSNOR společně s indukcí aktivity NO synthasy, výrazný nárůste hladiny celkových RSNOs a nitrovaných proteinů (markery nitrosativního stresu) (Corpas *et al.*, 2008b). U papriky byl detekován pouze mírné zvýšení aktivity GSNOR jako odezva na chladový stres (Airaki *et al.*, 2012).

Dalším možným stresorem je toxický účinek těžkých kovů (kadmium), který způsobuje narušení antioxidantní obrany a indukcí oxidačního stresu projevující se inhibicí růstu, snížením transpirace, rychlosti fotosyntézy a obsahu chlorofylu u rostlin. U listů hrachu bylo po ošetření 50 μM kadmíem zaznamenáno snížení aktivity a exprese GSNOR o 30% (Barroso *et al.*, 2006). Podle studie Letterier *et al.* (2012) byl podobný trend detekován po aplikaci 0,5 mM arseničnanu u semenáčků *A. thaliana*.

Oxid dusnatý a S-nitrosothioly jsou signální molekuly, které se účastní regulace imunitních odpovědí u rostlin i živočichů. Podobně jako u živočichů vedou i u rostlin změny hladiny RSNOs *in vivo* vlivem změn katabolismu GSNO kontrolovaného GSNOR k modulaci obranných reakcí na patogeny (Malik *et al.*, 2011). NO a GSNO jsou předpokládanými pozitivními regulátory rezistence rostlin, hypersenzitivní odpovědi a aktivace obranných genů, kde imunita rostlin je zvyšována snížením hladiny GSNOR se současným zvyšováním intracelulární hladin RSNOs. Možné zapojení GSNOR v obranné reakci je znázorněno na obr. 6.



Obr. 6: Hypotetický model úlohy GSNOR v obranné reakci rostlin v místě infekce patogenem a v rámci systémově získané rezistence (SAR) ve vzdálených částech rostliny (upraveno podle Rustecci *et al.*, 2007). Rozpoznání patogenů vede ke zvýšené produkci NO, reaktivních forem kyslíku (H_2O_2 , O_2^-) a rostlinného hormonu kyseliny salicylové (SA), které působí

synergicky na spuštění hypersenzitivní odpovědi (HR) a dalších obranných odpovědí na úrovni genové exprese. Aktivita GSNOR je klíčovým regulátorem intracelulární hladiny GSNO a *S*-nitrosothiolů. Snížením aktivity GSNOR dojde ke zvýšení intracelulární hladiny *S*-nitrosothiolů a tím k posílení rostlinné imunity na lokální i systémové úrovni.

2.3.2.2 Úloha GSNOR v procesu klíčení a vývoje rostlin

Jak již bylo zmíněno, GSNOR katalyzuje redukci GSNO, který je zásobárnou NO. Činnost GSNOR je nezbytná pro normální vývoj a plodnost za optimálních růstových podmínek (Lee *et al.*, 2008).

V *Arabidopsis* je protein GSNOR kódován jedním genem (*At5g43940*). Tento gen je přítomen ve velkém množství ve všech orgánech rostliny, s výjimkou zralého pylu. Analýzou proteinu GSNOR a jeho aktivity v *Arabidopsis* pomocí metod imunolokalizace a histochemie bylo zjištěno, že tento protein je rozdílně exprimován v různých částech rostliny. Nejvyšší exprese je v kořenech a listech v prvních fázích vývoje (klíčení). GSNOR se dále může podílet na regulaci redoxního stavu (Espunya *et al.*, 2006). Analýza proteinové sekvence na subcelulární úrovni v *Arabidopsis* naznačuje, že tento protein se nachází v cytosolu. Další experimenty prokázaly také možnou přítomnost GSNOR v peroxisomech (Reumann *et al.*, 2007).

Ve studii zaměřené na lokalizaci a úlohu GSNOR ve vývoji rostlin byla detekována vyšší exprese genu v děložních lístcích z SIGSNOR v porovnání s kořeny v raném stádiu vývoje (10-ti denní semenáčky). U rostlin v pozdější fázi vývoje (30-ti denní rostliny) byla exprese v kořenech vyšší ve srovnání s listy. Tyto údaje se shodují také s měřením aktivity GSNOR v rajčatových kořenech, výhoncích a listech, kdy nejnižší aktivita byla detekována v listech. Byla prokázána vysoká exprese SIGSNOR v pohlavních orgánech (pestík a tyčinky) a také během vývoje a zrání ovoce (Kubienová *et al.*, 2013a).

2.4 Úloha RNS v procesu klíčení a vývoje rostlin

Klíčení je proces obnovení metabolické aktivity semen vedoucí k prodloužení buněk radikuly a hypokotylu embrya. Semena v endogenní dormanci mohou klíčit až po jejím odeznění. Semenům bez endogenní dormance postačí ke klíčení zbobtnání ve vodě, jsou-li přitom splněny další vnější podmínky (teplota, obsah kyslíku a u někdy i intenzita světla). Příjmem vody do koloidního systému semen během bobtnání je narušen klid semen (dormance) související s odvodněním cytoplazmy. Klíčení začíná vždy růstem kořínku. Ten po určitou

dobu nejprve brzdí růst nadzemní části klíčící rostliny (plumuly). U dvouděložných rostlin je klíčení buď nadzemní (epigeické), nebo podzemní (hypogeické). V prvním případě jsou dělohy vyneseny rostoucím hypokotylem nad povrch půdy a představují první asimilační orgány (např. tykev, buk). Ve druhém případě zůstávají dělohy pod zemí a představují zásobárnu živin pro začátek růstu klíčících rostlin (hrách, dub) (Procházka *et al.*, 1998).

Je známo několik klíčových vývojových procesů uvnitř životního cyklu rostliny, v jejichž regulaci jsou RNS včetně NO zapojeny. Jedná se např. o klíčení semen, gravitropickou odpověď nebo růst kořenů. Zapojení NO jako regulátoru růstu a obranných reakcí u rostlin je stále intenzivně studováno (Fernández-Marcos *et al.*, 2012).

V živočišných buňkách umožňuje absence dusičnanových redukčních drah využít pro detekci produkce NO metody založené na stanovení koncentrace dusitanů a dusičnanů. U rostlin je tato metoda vyloučena z důvodu existence asimilační dráhy dusičnanů zodpovědné za většinu produkce dusitanů. Z toho důvodu se využívají při studiu úlohy RNS u rostlin metody jako je detekce RNS pomocí fluorescenčních sond, EPR spektrometrie, elektrochemie, chemiluminiscence nebo také hmotnostní spektrometrie. Pro detekci produkce NO lze využít fluorescenční sondy. Mezi nejznámější patří 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM), diaminorhodoamin (DAR-4M). Ve formě diacetátu (např. DAF-2 DA, DAF-FM DA) nebo ve formě acetoxymethylesteru (např. DAR-4M AM) jsou sondy propustné přes buněčnou membránu (Kojima *et al.*, 1998, 2000). Tyto sondy jsou citlivé, ale nejsou dostatečně specifické. Nereagují přímo s NO, ale s jeho hlavním oxidačním produktem N_2O_3 . To znamená, že intenzita fluorescence také závisí na rychlosti oxidace NO. Detekce NO s využitím fluorescenční sondy DAF-FM bylo úspěšně použito např. v práci Liu *et al.* (2009) zaměřené na studium úlohy NO v procesu klíčení semen *Arabidopsis*.

Pro tvorbu kořenů a kořenového systému jsou důležité fytohormony-auxiny. Značný počet experimentů dokazuje, že nejen auxiny ale také NO má významný vliv a morfologii kořenů. Kořen rostliny roste ve špičce, kde jsou přítomny proliferující meristematické buňky. Dále od špičky kořene jsou přítomny neproliferující buňky, které jsou schopny rediferenciace a iniciovat boční meristémy. Ten následně proniká do vnější vrstvy kořenové buňky a tvoří boční

Účinek NO je třeba interpretovat v závislosti na jeho koncentraci. Při exogenní aplikaci vysoké hladiny NO dochází k inhibici růstu kořenu, naopak při použití nízkých hladin NO dochází k podpoře růstu (Gouvea *et al.*, 1997; Pagnussat *et al.*, 2002). V práci Gouvea *et al.* (1997) byl prokázán stimulační vliv NO na růst kořene *Zea mays* v závislosti na koncentraci

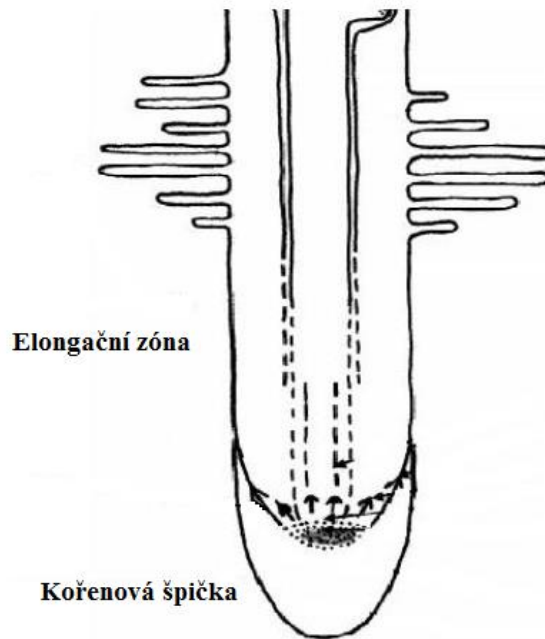
nitroprussidu sodného (SNP) - donoru NO. Optimální koncentrace SNP byla 0,1 nM, ale stimulační účinek přetrvával až do koncentrace 1 μM. Ve studii Pagnussat *et al.* (2002) byl vliv SNP na růst kořene potvrzen u *Cucumis sativus*. Při aplikaci vysokých koncentrací SNP (1000 μM) byl inhibován růst postranních kořenů. Optimální koncentrací pro podporu růstu postranních kořenů byla 10 μM SNP.

Ve studii Correa-Aragunde *et al.* (2004) bylo zjištěno, že při aplikaci SNP při vyšších koncentracích než 50 μM dochází k významné inhibici primárního kořene a zároveň je stimulována tvorba bočních kořenů. V kontrolním experimentu lapač NO cPTIO anuloval účinek SNP. Pokud byl aplikován pouze cPTIO, došlo ke snížení počtu postranních kořenů oproti kontrole.

Ve studii Fernández-Marcos *et al.* (2013) byl sledován účinek NO na růst primárního kořene u *A. thaliana*. Bylo prokázáno, že při aplikaci S-nitroso-N-acetyl-DL-penicilaminu (SNAP) jako donoru NO dochází při koncentraci vyšší než 0,1 mM v mediu k inhibici růstu primárního kořene v závislosti na koncentraci NO. Jako donor NO byl také použit nitroprussid sodný (SNP) nebo S-nitrosoglutathion (GSNO) se stejným účinkem jako SNAP. Inhibiční vliv vysoké koncentrace NO byl potvrzen v experimentu, ve kterém aplikace lapače NO (cPTIO; 2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5 tetramethylimidazolin-1-oxy-3-oxid) současně se SNAP, výrazně snížila inhibiční vliv SNAP na růst kořene.

Za fyziologický donor NO je považován GSNO. Často se ve studiích používají dva typy donoru NO např. GSNO a SNP (Liu *et al.*, 2007; Zandonadi *et al.*, 2010; Semchuk *et al.*, 2011).

Velmi zajímavým poznatkem bylo zjištění, že oxid dusnatý společně s cGMP zprostředkovává odpovědi na gravitropické reakce v primárních kořenech sóji. Bylo prokázáno, že akumulace NO je asymetrická a většina NO je produkována ve spodní části kořene (kořenová špička) (obr. 7). Odstraněním NO pomocí lapačů NO nebo inhibicí syntézy NO byla detekována snížená hladina NO a zpomalení gravitropického ohýbání (Hu *et al.*, 2005).



Obr. 7: Popis primárního kořene

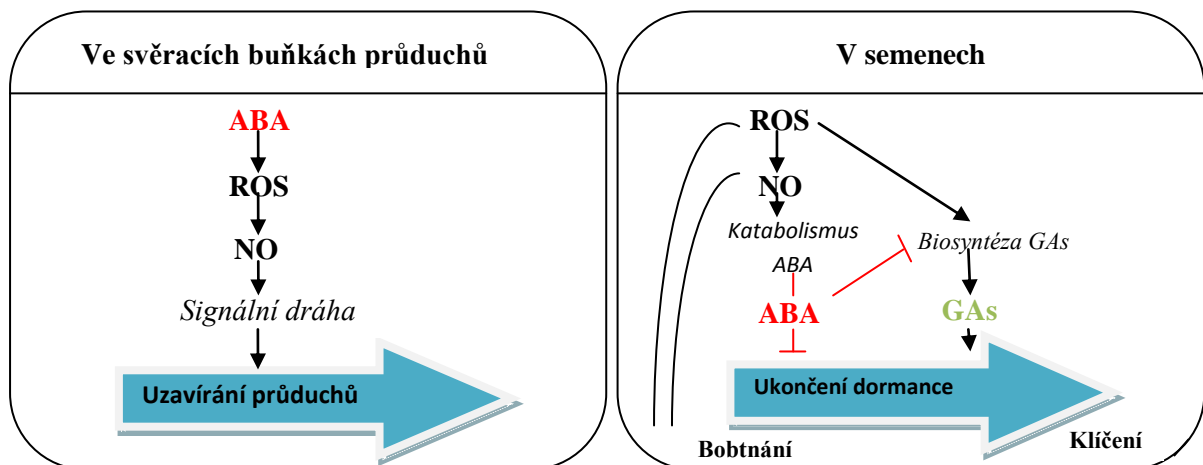
(<http://www.botanika.upol.cz/atlas/anatomie/anatomieCR23.pdf>; 26. 4. 2014)

Adventivní (nahodilé, náhradní) kořeny jsou podobně jako postranní kořeny tvořené neproliferujícími buňkami schopnými rediferenciace. Postranní kořeny jsou tvořeny na primárním (hlavním) kořenu, kořeny adventivní se nachází např. na části hypokotylu, který spojuje kořeny a výhonky. V několika studiích byla prokázána úloha NO při tvorbě adventivních kořenů (Pagnussat *et al.*, 2002, 2003, Lanteri *et al.*, 2008). Ve studii Lanteri *et al.* (2008) po odstranění primárního kořene ze sazenice *C. sativum* a následném přidavku SNP bylo pozorováno po 5 dnech vytvoření adventivních kořenů. Tento efekt byl eliminován současnou aplikací lapače NO cPTIO (Pagnussat *et al.*, 2003).

Za hlavní zdroj dusíku pro většinu rostlin je považován dusičnan (nitrát, NO_3^-). Redukce dusičnanů na dusitany je katalyzována pomocí nitrátreduktasy (NR). Byla prokázána úloha dusičnanů v regulaci metabolismu a vývojových procesů u rostlin (Krouk *et al.*, 2010). Jedná se například o vliv na potlačení dormance semen a jejich následné klíčení. Hlavním produktem asimilace dusičnanů jsou dusitany, které se rovněž podílejí na zmírnění dormanci semen a podporují klíčení semen (Libourel *et al.*, 2006). Ve studiích Hilhorst a Karseen (1988) a Batak *et al.* (2002) byl potvrzen pozitivní vliv aplikace dusičnanů na klíčení semen *Arabidopsis*. K exponenciálnímu snížení růstu primárního kořene *Zea mays* došlo při aplikaci dusičnanů se zvyšující se koncentrací (0,01-10 mM) v médiu (Zhang *et al.*, 2007).

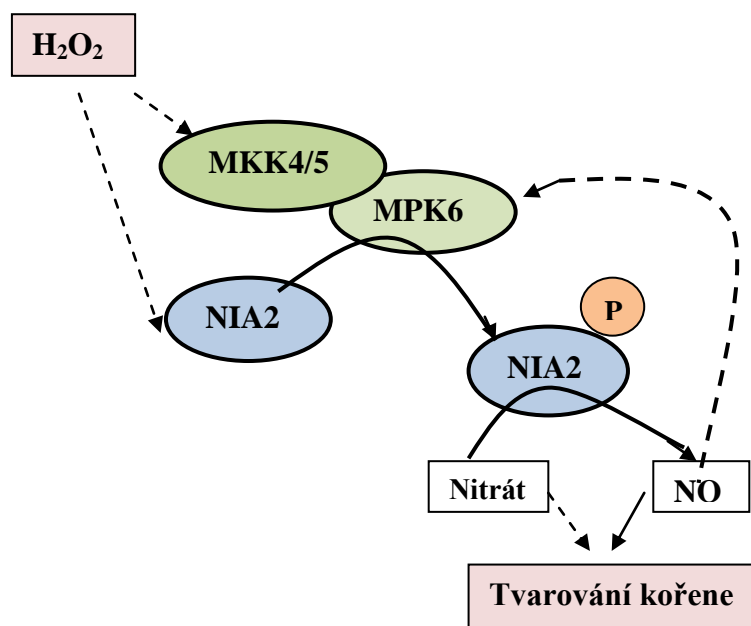
Tento výsledek je v kontrastu s předchozí studií, ve které růst primárních kořenů *Arabidopsis* nebyl závislý na vnější koncentraci dusičnanů v rozmezí 0,01-100 mM (Zhang a Forde, 1999). Podle Linkohr *et al.* (2002) nenarůstala délka primárního kořene se zvyšující se koncentrací dusičnanů v pěstebním substrátu. Naproti tomu růst bočních kořenů byl pozitivně ovlivněn přidavkem dusičnanů.

NO a ROS mají klíčovou roli v řízení dormance semen a procesu klíčení (Bailly, 2004; Bailly *et al.*, 2008). V buňkách jsou ROS tvořeny pomocí specifických enzymových reakcí nebo jako vedlejší produkty metabolismu. V závislosti na jejich koncentraci mohou mít pozitivní signální účinky např. ukončení dormance semen a aktivace klíčení nebo může docházet k oxidativnímu poškození buňky (Liu *et al.*, 2010; Leymarie *et al.*, 2012; Bailly *et al.*, 2008). Exogenní peroxid vodíku podporuje zvýšení katabolismu kyseliny abscisové (ABA) a syntézu giberelinů (GA) po nabobtnání semen. *In vivo* se H₂O₂ a NO rychle hromadí po nabobtnání semene a jeho akumulace předchází indukci katabolismu ABA a biosyntéze GA (Liu *et al.*, 2010) (obr 8).



Obr. 8: Kontrastní modely ukazující signální dráhy ROS, NO a ABA ve stomatech, ochranných buňkách a semenech (Arc *et al.*, 2013).

Ve studii Wang *et al.*, 2010 bylo zjištěno, že peroxid vodíku vyvolává rychlou aktivaci MPK6 (mitogen-aktivovaná proteinkinasa 6), následně dochází ke zvýšení aktivity NR a produkci NO. Při nárůstu intracelulární hladiny peroxidu vodíku je aktivována MPK6, což vede k fosforylaci NIA2 (izofорма NR) na Ser-627. Tato fosforylace výrazně zvyšuje aktivitu enzymu a produkci NO vedoucí k morfologickým změnám v kořenovém systému (obr. 9).



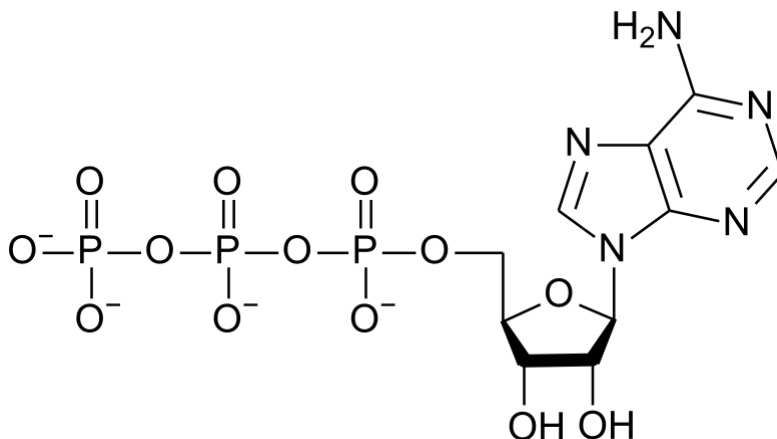
Obr. 9: Model dráhy biosyntézy NO a transdukce signálu zprostředkované H₂O₂ aktivované MPK6 u *Arabidopsis* (upraveno podle Wang *et al.*, 2010).

Peroxynitrit (ONOO⁻) patřící mezi RNS je velmi rozporuplnou sloučeninou z pohledu k jeho možným reakcím v živých organismech. Tato molekula je známá jako mediátor poškození buněk v mnoha biologických systémech. Bylo prokázáno, že v živočišných buňkách hraje důležitou roli v procesu (mechanismu) patogeneze u řady lidských onemocnění. Úloha peroxynitritu v rostlinách není stále plně prokázána (Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2011). Ze studií realizovaných *in vitro* podmínkách lze peroxynitrit považovat nejen za cytotoxickou látku (Altug *et al.*, 1999), ale může působit i jako silný modulátor redoxní regulace v různých signálních drahách v buňce (Liaudet *et al.*, 2009).

2.5 Základní charakteristika testovaných látek a jejich role v rostlinném organismu

2.5.1 Extracelulární ATP

Adenosintrifosfát (ATP) je důležitý nukleotid, který se skládá z pěti uhlíkatého cukru ribosy, adeninu napojeného na 1'uhlík ribosy a tří fosfátů napojených fosfodiesterovou vazbou na 5'uhlík ribosy. Fosfáty jsou mezi sebou vázány anhydridovými vazbami. Při rozkladu ATP na ADP a fosfát je uvolňována energie, která se uplatňuje ve většině buněčných pochodů.

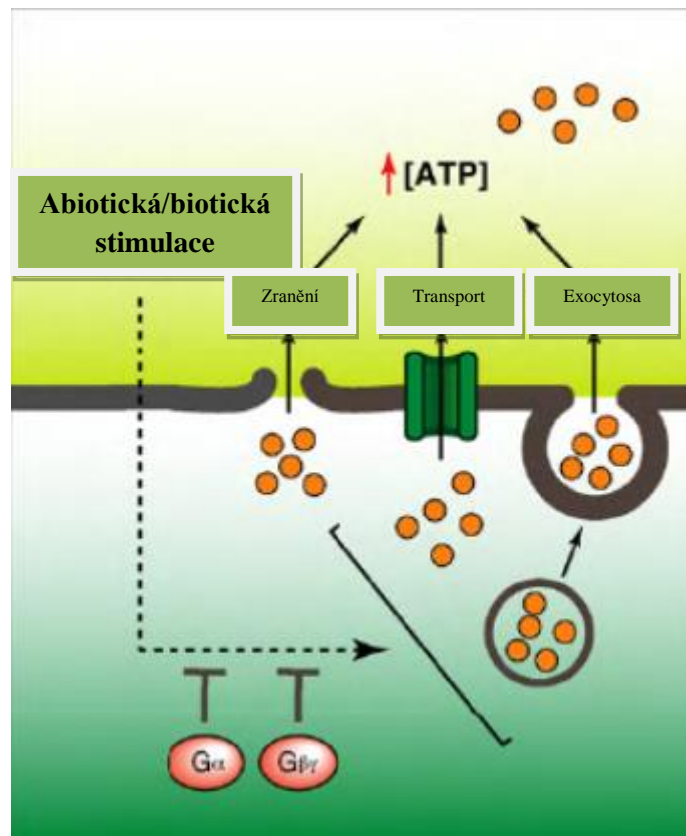


Obr. 10: Strukturální vzorec adenosintrifosfátu (ATP, http://cs.wikipedia.org/wiki/Adenosintrifosfát#mediaviewer/Soubor:ATP_structure.svg; 26. 4. 2014)

Zájem o extracelulární ATP (eATP) stoupl poté, co byl v roce 1990 naklonován a charakterizován purinoreceptor z mozkové tkáně myši (Lustig *et al.*, 1993).

Jednoduchým pasivním mechanismem uvolňování ATP do extracelulárního prostoru je lýze buněk při poranění. Hladina eATP se může zvyšovat také přímou sekrecí v závislosti na různých podnětech, jako je např. působení patogenních elicitorů (Jeter *et al.*, 2004; Weerasinghe *et al.*, 2009), abiotického stresu (Jeter *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009) a odezva na dotek (Jeter *et al.*, 2004; Weerasinghe *et al.*, 2009).

V savcích buňkách je uvolňování ATP a dalších nukleotidů do extracelulárního prostoru zprostředkováno pomocí aniontových kanálků, gap-spojovacích hemikanálků, ATP vázaných kazetových transportérů (ABC transportéry) či exocytosou (Bodin a Burnstock, 2001; Dutta *et al.*, 2002; Lazarowski *et al.*, 2003) (obr.11). V rostlinách byla prokázána cesta uvolňování ATP pouze přes ABC transportéry a exocytosou. Další systémy, jako jsou aniontové kanály a hemikanály, jsou v případě rostlinných buněk stále předmětem intenzivního studia (Kim *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2000).



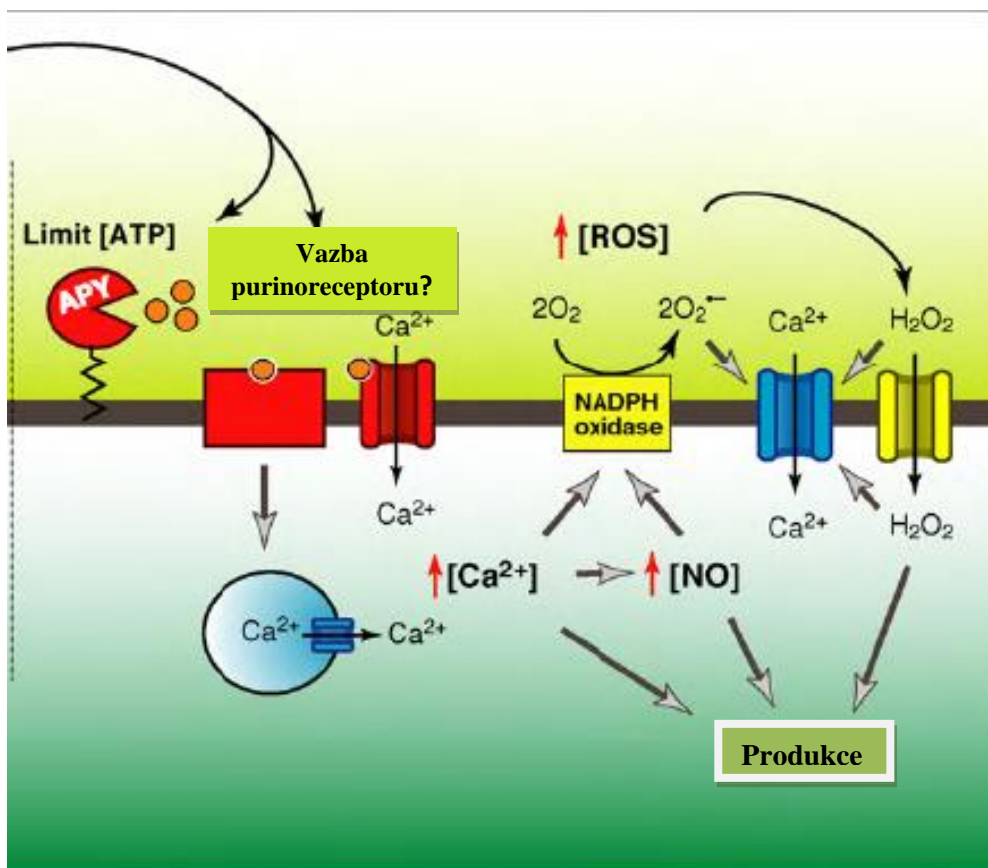
Obr. 11: Uvolnění ATP do extracelulárního prostoru (Tanaka *et al.*, 2011)

Významná úloha eATP v regulaci růstu a vývoje rostlin byla potvrzena studii ekto-apyras (EC 3.6.1.5, ATP difosfohydrolasy). Tyto enzymy hydrolyzují di- a trinukleotidy na monofostáty a podílí se na regulaci extracelulární koncentrace ATP (Riewe *et al.*, 2008; Clark a Roux, 2009).

Byl prokázán vliv eATP a eADP na zvýšení volné hladiny Ca^{2+} v cytosolu $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Jeter *et al.*, 2004; Demidchik *et al.*, 2003; Demidchik *et al.*, 2009). eATP indukuje produkci ROS přes NADPH oxidasu (EC 1.6.3.1) (Kim *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008a; Demidchik *et al.*, 2009) a dále stimuluje produkci NO (Foresi *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008b; Tonon *et al.*, 2010) (Obr. 12). Bylo prokázáno, že zvýšení koncentrace NO indukované eATP bylo zprostředkováno přes kalmoduliny. Modulace koncentrace Ca^{2+} , ROS a NO extracelulární ATP je spojena s drahami rostlinné signalizace. Bylo prokázáno, že zatímco zvýšená hladina NO indukovaná ATP může stimulovat produkci ROS, tvorba ROS indukovaná ATP nemůže aktivovat produkci NO (Wu *et al.*, 2008b). V některých případech NO a ROS stimulují zvýšení koncentrace Ca^{2+} . Souběžná a vyvážená produkce Ca^{2+} ,

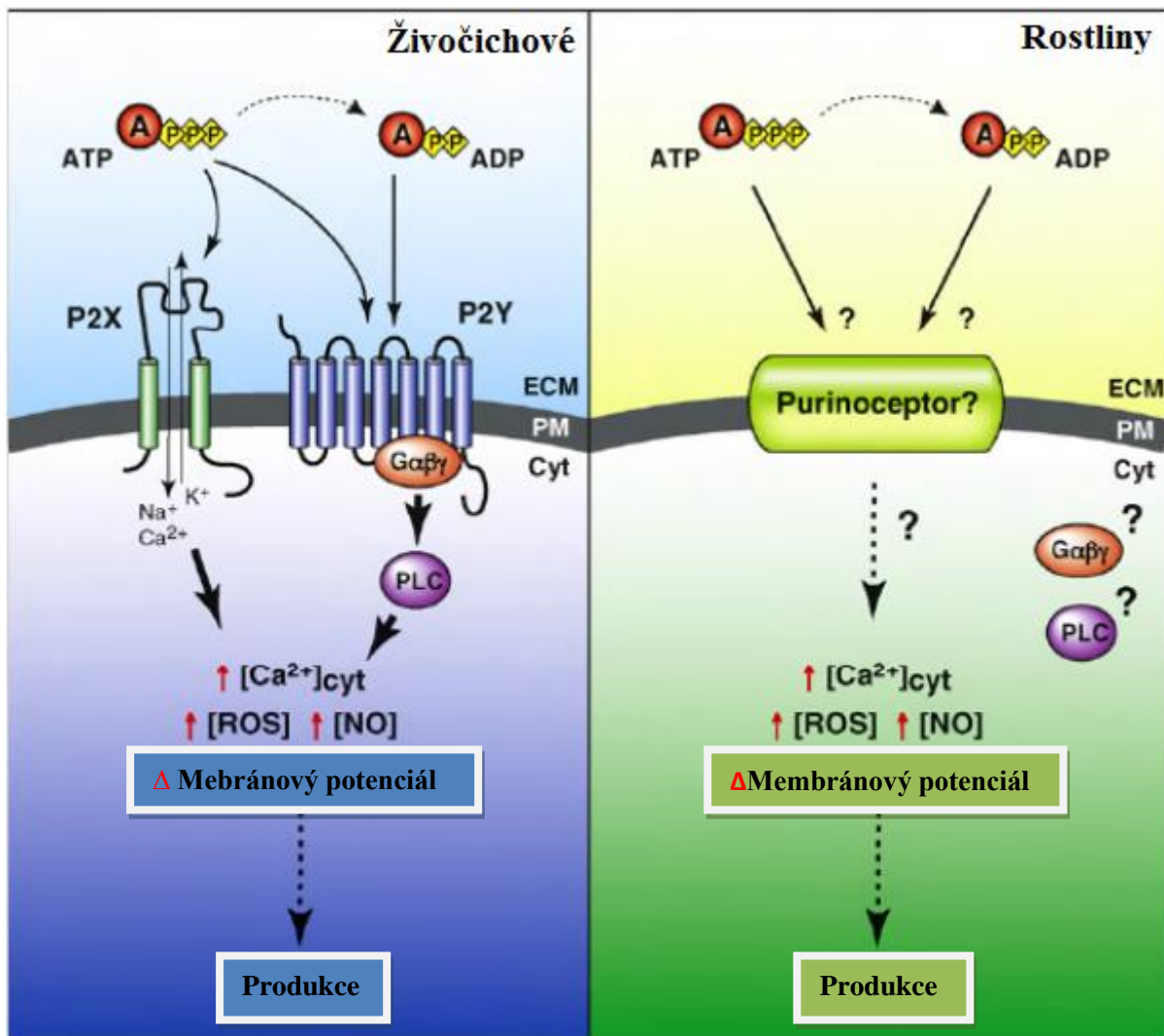
ROS a NO hraje roli v regulaci růstu a vývoji rostlin a v obraných reakcích proti patogenu (Bright *et al.*, 2006; Zaninotto *et al.*, 2006).

Je známo, že NO aktivuje guanylátcyklázu, která přeměňuje GTP na cGMP. cGMP působí jako druhý posel, který aktivuje specifické buněčné odpovědi.



Obr. 12: Stručný přehled signalizace extracelulárního ATP (Tanaka *et al.*, 2011).

Mechanismus rozpoznání eATP vedoucí k aktivaci signálních drah přes Ca^{2+} , ROS a NO je znám u živočišných buněk, kde byly nalezeny dva typy purinergních receptorů interagujících s eATP – P2X iontový kanál a P2Y transmembránový protein spojený s G-proteinem (Khakh a Burnstock, 2009), na signalizaci se podílí fosfolipasa C (PLC) (Obr. 13). U rostlin není dosud zřejmé, jak je ATP přesně rozpoznán (Obr. 12). Přítomnost potencionálních receptorů u rostlin je intenzivně studována. Na rozdíl od živočichů není známo, zda je přenos signálu u rostlin umožněn přes G-protein (Weeransinghe *et al.*, 2009).

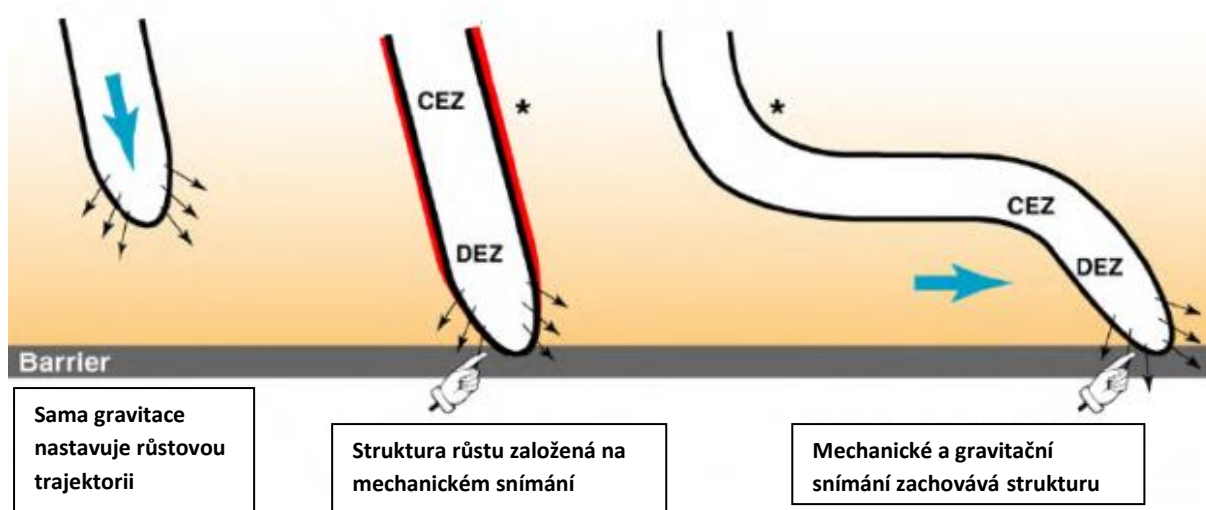


Obr. 13: Srovnání známých purinergních signálních drah zvířat s hypotetickými cestami v rostlinách (Tanaka *et al.*, 2011).

Novější studie prokázaly, že extracelulární ATP se účastní řady fyziologických procesů v rámci růstu a vývoje rostlin, jedná se např. o růst kořenového vlášení (Lew a Dearnaley, 2000; Kim, *et al.*, 2006), růst pylové láčky (Reichler *et al.*, 2009), biotický a abiotický stres (Chivasa *et al.*, 2009; Jeter *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008a), gravitropismus (Tang *et al.*, 2003), životaschopnost buněk (Chivasa *et al.*, 2005) a tigmotropismus (Weerasinghe *et al.*, 2009).

Jak v živočišných buňkách, tak i v rostlinných buňkách hraje extracelulární ATP důležitou roli v životaschopnosti buněk. Odstranění ATP z apoplastu spouští buněčnou smrt (Chivasa *et al.*, 2005). eATP je důležitou signální molekulou při poškození herbivory či lýze buněk indukované patogenem (Di Virgilio, 2007). Uvolňováním ATP do extracelulárního prostoru je u rostlin spojeno také s mechanickým poškozením. Byla prokázána úloha eATP při změně

směru růstu kořene v případě mechanické překážky (Weerasinghe *et al.*, 2009). Pokud byla mechanická stimulace na vrcholu nebo prodloužené zóně kořene bylo přechodně pozorováno uvolnění ATP v místě doteku (obr. 14). Zvýšení eATP (nižší koncentrace v porovnání s místem mechanické stimulace) bylo pozorováno i na opačné straně kořene, ale uvolnění ATP po dotyku vyvolává asymetrické rozložení kinetiky a prostorové dynamiky (Weerasinghe *et al.*, 2009). Ve studii Wu *et al.* (2008b) bylo prokázáno, že ATP se konstitutivně uvolňuje do růstového média, kdy během prvních 15 minut stoupla jeho koncentrace až 6x při růstu pylové láčky. Podobné poznatky byly nalezeny i při růstu kořenů (Weerasinghe *et al.*, 2009) a kořenových vlásků (Kim *et al.*, 2006).



Obr. 14: Model pro signalizaci zprostředkovanou ATP v dotykovém snímání při reakci na překážku (Tanaka *et al.*, 2011).

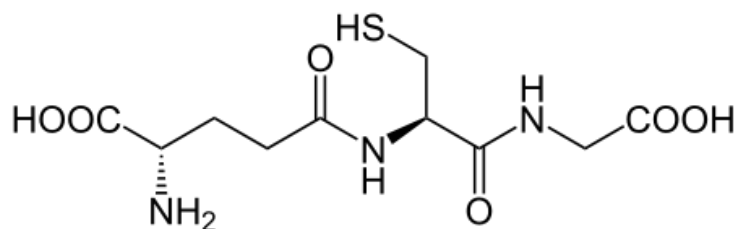
Méně známo je o roli extracelulárního ATP v odpovědi rostliny na patogen. Song *et al.* (2006) ve své studii navrhl model, ve kterém extracelulární ATP pozitivně reguluje reakce vyvolané patogeny. eATP rychle aktivuje produkci ROS a transkripční aktivaci genů kódujících enzymy biosyntézy kyseliny jasmonové a etylenu. Oba hormony mají významnou roli v obranném mechanismu rostlin a vysoká produkce ROS je klíčová pro aktivaci obranné signalizace (Lamb a Dixon, 1997). Naproti tomu studie od Chivasa *et al.* (2009) ukázala, že dlouhotrvající akumulace eATP má negativní efekt na odpověď rostlin na patogenní infekci. Akumulace ATP více než dva dny potlačila produkci dalšího významného hormonu zapojeného v mechanismu obranných reakcí rostlin, kyseliny salicylové. Výsledky studií

naznačují, že dlouhodobé změny v hladině eATP jsou negativními regulátory obraných drah u rostlin při patogenezi, a proto musí být koncentrace eATP přísně kontrolována.

2.5.2 Glutathion

Všechny rostliny obsahují glutathion (GSH, obr. 15) nebo aspoň jeho homology, kde je C-terminální aminokyselina glycin nahrazena jinou aminokyselinou jako je β -alanin, serin či glutamát.

GSH je syntetizován ve dvou krocích. Nejdříve pomocí ATP-dependentní reakce je vytvořen γ -glutamyl-cystein. Tato reakce je katalyzována enzymem glutamátcysteinligasou, který je také známý pod názvem γ -glutamyl-cysteinsyntetasa (EC 6.3.2.2.). Glutathionsyntetasa (EC 6.3.2.3.) následně katalyzuje vazbu glycinu na γ -glutamyl-cystein (Noctor *et al.*, 2012).



Obr. 15: Strukturní vzorec glutathionu (<http://cs.wikipedia.org/wiki/Glutathion#mediaviewer/Soubor:Glutathion.svg>; 26. 4. 2014)

K syntéze GSH může docházet v cytosolu, chloroplastech a mitochondriích (Zechmann a Müller, 2010). V rostlinách, které nepodléhají žádnému stresu, se GSH vyskytuje zejména v redukované formě, zatímco v průběhu oxidačního stresu dochází k oxidaci glutathionu (GSSG). Výskyt vysoké koncentrace GSSG souvisí se sníženým růstem rostliny, poruchou dormance a následnou buněčnou smrtí (Kranner *et al.*, 2002; Kranner *et al.*, 2006; Queval *et al.*, 2007).

Glutathion jako antioxidant je zapojen do detoxikace ROS, redoxní signalizace, modulace genové exprese a regulace enzymatických aktivit (Foyer a Noctor, 2009). Glutathion má významnou roli v procesu vývoje a růstu rostlin, klíčení pylu, je zapojen v obranném mechanismu rostlin vystavených působení abiotických a biotických stresových faktorů (Foyer a Noctor, 2009; Zechmann *et al.*, 2011). GSH se dále podílí na detoxikaci xenobiotik, herbicidů (Edwards *et al.*, 2005; DeRidder a Goldsbrough, 2006), těžkých kovů (Zawoznik *et al.*, 2007; Ammar *et al.*, 2008; Dalcorsio *et al.*, 2008; Nocito *et al.*, 2008) a chrání proteiny před oxidací pomocí procesu glutathionylace (Dixon *et al.*, 2005; Hurd *et al.*, 2005a,b).

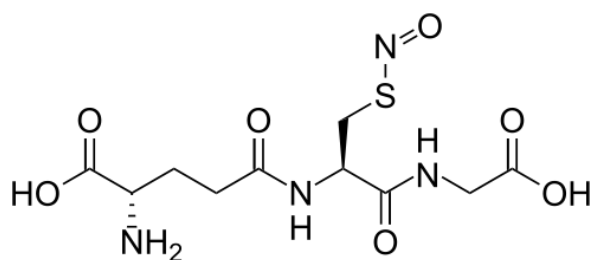
Účinek GSH jako redukčního činidla byl studován na etiolovaných semenáčcích *A. thaliana*, kdy byla pozorována inhibice růstu hypokotylu a změna v délce primárního kořene, počtu kořenových vlásků a gravitropickém růstu (Tonon *et al.*, 2010). Poměr GSH/GSSG je za normálních podmínek 20:1, v důsledku působení ROS dochází k posunu směrem k GSSG (Szarka *et al.*, 2012). Dochází k aktivaci signálních drah, které vedou k programované buněčné smrti, což je jeden z významných mechanismů obranné reakce při patogenesi (Kranner *et al.*, 2010).

Významným homologem GSH je homogluthathion (hGSH), který je charakteristický pro luštěniny, ve kterých je C-koncový glycin nahrazen β -alaninem a obecně má stejné funkce jako GSH (Noctor *et al.*, 2012). hGSH je považován za důležitý regulátor tvorby kořenového hlízky, symbiotických interakcí a fixace dusíku (El Msehli *et al.*, 2011). hGSH zastává rovněž úlohu při snižování hladiny síry v rostlině a vykazuje antioxidační aktivitu podobně jako GSH.

2.5.3 S – nitrosogluthathion (GSNO)

S-nitrosogluthathion (GSNO), derivát glutathionu (GSH: tripeptid γ -Glu-Cys-Gly), je nejrozšířenějším nízkomolekulárním S-nitrosothiolem, jehož sumární vzorec je $C_{10}H_{16}N_4O_7S$ a systematický název 2S-2-amino-5-[[2R-1-(karboxymethylamino)-3-nitrososulfanyl-1-oxopropan-2-yl]amino]-5-oxopentanová kyselina (obr. 16).

Mezi nízkomolekulární S-nitrosothioly patří další molekuly, jako je S-nitrosocystein (CySNO) a S-nitrosocysteinylglycin (GlyCySNO) (Corpas *et al.*, 2013).

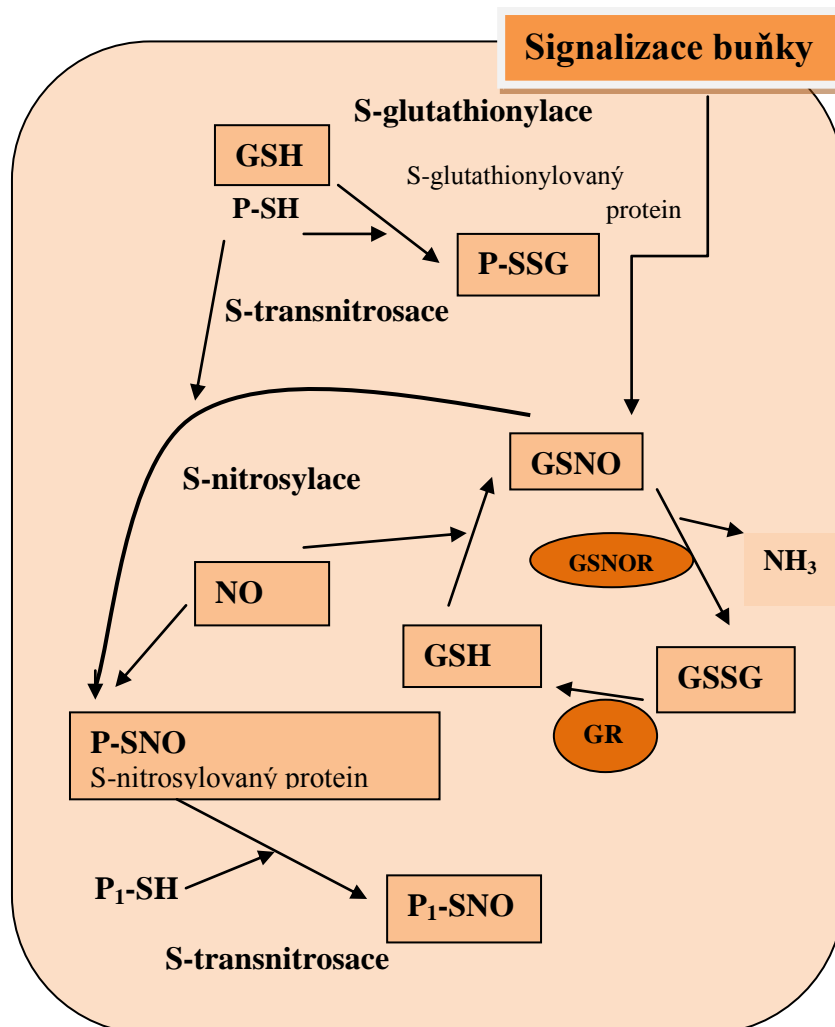


Obr. 16: Strukturní vzorec S-nitrosogluthathionu (GSNO, <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nitrosogluthathione.svg>; 26. 4. 2014)

S-nitrosogluthathion je přírodní rezervoár NO. Předpokládá se role GSNO jako zásobní molekuly (uvolňuje NO) v NO-dependentní signální transdukci. V současné době výsledky řady studií potvrzují význam GSNO v mechanismech reakce rostlin na působení biotických a abiotických stresových faktorů (Corpas *et al.*, 2013).

Mechanismus regulace hladiny S-nitrosoglutathionu pomocí S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) během vývoje rostlin a za stresových podmínek, pomůže objasnit komplexní metabolismus NO (Letterier *et al.*, 2011).

GSNO je generován v procesu zvaném S-nitrosylace (Corpas *et al.*, 2013). GSNO je centrální meziprodukt při tvorbě a degradaci buněčných S-nitrosothiolů (Browniska *et al.*, 2013). Na obr. 17 je schématicky znázorněn model metabolismu S-nitrosoglutathionu v rostlinných buňkách. GSNO v reakci katalyzované GSNOR je za uvolnění amonných iontů přeměněn na oxidovanou formu glutathionu (GSSG), která je za katalýzy glutathionreduktasy (GR), redukována na glutathion. V reakci s NO může opět vznikat GSNO. GSNO může interagovat s vhodnou -SH skupinou proteinů jedná se o tzv. S-transnitrosaci, kdy dochází k vzniku vysokomolekulárních S-nitrosothiolů. NO z nitrosylovaných proteinů může být v procesu S-transnitrosace přenesen na -SH skupiny jiných proteinů. Redukovaný GSH může reagovat z -SH skupinami proteinů v procesu známém jako S-glutathionylace.

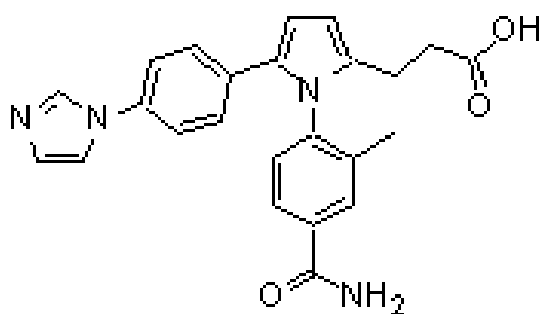


Obr. 17: Model metabolismu S-nitrosoglutathionu (GSNO) v buňkách (upraveno podle Corpas *et al.*, 2013).

2.5.4 Syntetický inhibitor GSNOR - N6022

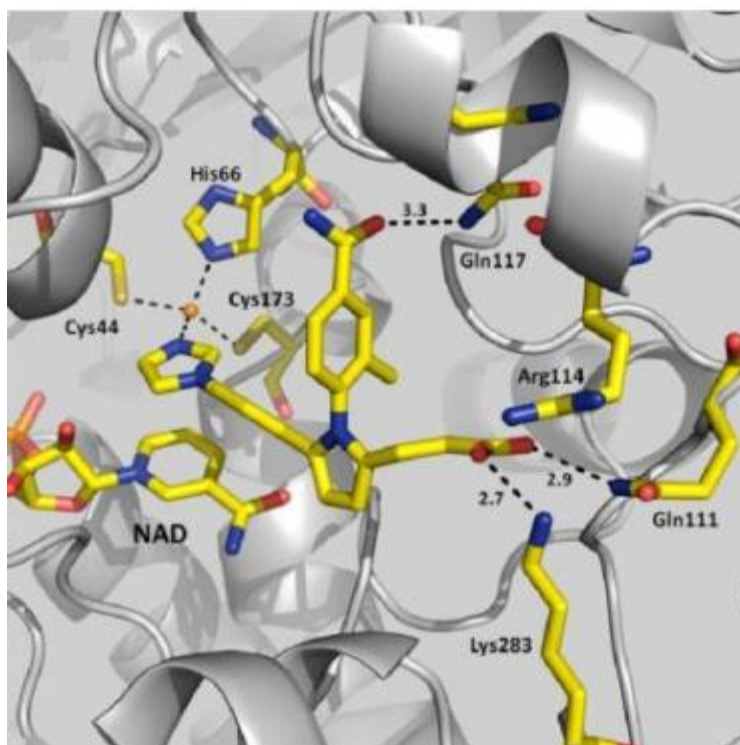
Inhibitory GSNOR jsou vyvíjeny jako léčiva, která korigují narušenou homeostázu GSNO a NO. V současné době je řada z nich ve fázi klinického vývoje pro léčbu zánětlivých onemocnění plic, astmatu a zánětlivých onemocnění střev (Sun *et al.*, 2011). Zvýšená hladina GSNO v důsledku inhibice GSNOR aktivity vede k buněčné signalizaci S-nitrosylací, dochází k ovlivňování hladiny NO a dusitanů, vedoucí k produkci dalších reaktivních forem kyslíku a dusíku (Sanghani *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011).

Sloučenina označená zkratkou N6022 je nové léčivo první třídy vykazující silnou inhibiční aktivitu proti GSNOR, enzymu zapojeném v metabolismu S-nitrosoglutathionu a podílejícím se na udržování homeostázy oxidu dusnatého (obr. 18).



Obr. 18: N6022 - Syntetický inhibitor GSNOR. Sumární vzorec $C_{24}H_{22}N_4O_3$, chemický název 3-(5-(4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylfenyl)-1H-pyrrol-2-yl) propionová kyselina (MW 414.46).

Jedná se o specifický a plně reverzibilní inhibitor GSNOR, který inhiboval lidskou GSNOR v nanomolární koncentraci: 8 nM (IC_{50}) a hodnota K_i je 2,5 nM (Green *et al.*, 2012). Váže se na vazebné místo substrátu GSNO jako nekompetitivní inhibitor. V případě lidské GSNOR inhibice zahrnuje vazbu propionové kyseliny z N6022 se všemi třemi rezidui tvořícími anion-vazebnou kapsu. Inhibitor N6022 vykazuje vysokou inhibiční schopnost i pro GSNOR z rajčete. Byla stanovena hodnota $IC_{50} = 300 \pm 18$ nM a příslušná hodnota $K_i = 429 \pm 30$ nM (Kubienová *et al.*, 2013a). Inhibice GSNOR brání metabolismu GSNO a umožňuje jeho akumulaci, u živočichů dochází např. k iniciaci protizánětlivé signalizace (Reyneart *et al.*, 2004). GSNO má bronchodilatační účinky a tím představuje významný terapeutický cíl jak při již zmíněné léčbě astmatu, tak i chronického obstrukčního plicního onemocnění a plicní hypertenze.



Obr. 19: Struktura inhibitoru N6022 (převzato z Green *et al.*, 2012). Interakce N6022 s vazebnou kapsou GSNOR v ternárním komplexu N6022 · GSNOR · NAD⁺.

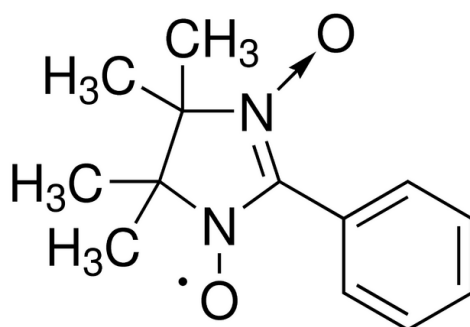
N6022 je vysoce silná sloučenina obsahující pyrrolové jádro. Struktura inhibitoru je kvartérní (čtyřstěn). Ve struktuře N6022 (obr. 19) jsou kyselé substituenty (zbytky kyseliny propionové) orientovány směrem k aniontové kapse uvnitř aktivního místa GSNOR a dochází k propojení vodíku a solí interakcí s Gln111, Arg114 a Lys283. Naproti tomu imidazol z N6022 směřuje ke katalytickému zinku a imidazolový dusík je součástí účinné tetrahedrálční koordinace zinku spolu se zbytky Cys44, His66 a Cys173. Imidazolový kruh je stabilizovaný pomocí π - π interakcí s nikotinamidovým kruhem NAD⁺. Další stabilizaci poskytují vodíkové vazby mezi benzamidem z N6022 a Gln 117 (Green *et al.*, 2012).

2.5.5 cPTIO a PTIO

cPTIO (2-4-karboxyfenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline--oxy-3-oxid) patří mezi sloučeniny, které se nazývají nitronyl nitroxidy (NNO). Nitronyl nitroxidy jsou deriváty 2-fenyl-4,4,5,5,-tetramethylimidazoline-1-oxy-3-oxid. NNO jsou stabilní organické radikály, které reagují s NO za vzniku iminonitroxidů (INO) a NO₂. Tyto sloučeniny jsou považovány za monitory NO, stechiometrické zdroje NO₂ a za potenciální terapeutické látky. Použití nitronyl nitroxidů, jako je 2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl- 3- oxid (PTIO, obr. 20), jako selektivních pastí na NO se stále zvyšuje. Bylo prokázáno, že PTIO a jeho

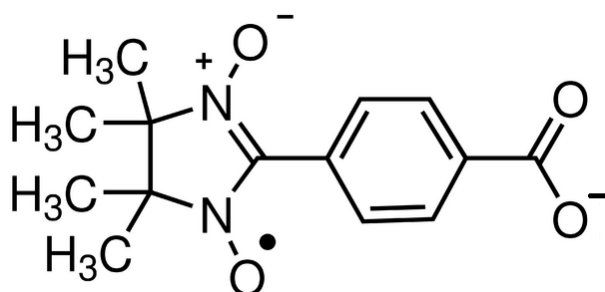
deriváty mohou způsobovat změny buněčného cyklu, vést k oxidativnímu stresu a apoptózy v plicních buňkách (Janssen *et al.*, 1998) a vykazují silný terapeutický účinek v případě endotoxinového šoku (Yoshida *et al.*, 1994).

Existuje řada studií, ve kterých bylo potvrzeno, že cPTIO je významný lapač NO (obr. 21). Ve studiích Fernández-Marcos *et al.* (2012) či Correa-Arangué *et al.* (2004) byl cPTIO použit jako lapač NO, kdy bylo potvrzeno, že při jeho aplikaci je potlačen růst primárních i postranních kořenů oproti kontrolní rostlině. Jeho funkce vychytávání NO byla potvrzena pomocí fluorescenční sondy DAF-FM, kdy byla sledována výrazně nižší produkce NO po jeho aplikaci.



Obr. 20: Strukturální vzorec PTIO

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p5084?lang=en®ion=CZ>; 26.4.2014)



Obr. 21: Strukturální vzorec karboxy-PTIO

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c221?lang=en®ion=CZ>; 26.4.2014)

2.5.6 Chitosan

Chitosan je přírodní netoxický biopolymer, který vzniká částečnou alkalickou N-deacetylací chitinu. Chitin je hlavní složka exoskeletonů korýšů a buněčných stěn hub. Chemicky je chitosan polykationtový heteropolysacharid, který je syntetizován kopolymerací (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukanu s (1→4)-2-acetamid-2-deoxy-β-D-glukanem. Molekula chitosanu má vysokou molekulovou hmotnost, je poměrně nerozpustná ve vodě, ale dobře rozpustná ve zředěných kyselinách s hodnotou pKa pod 6,5 (Aranaz *et al.*, 2009).

Fragmenty z chitinu a chitosanu iniciují obranné reakce rostlin v reakci na mikrobiální infekci, včetně hromadění fytoalexinů. Jak už bylo zmíněno chitin i chitosan mají antivirální, antibakteriální a protiplísňové účinky (Hadrami *et al.*, 2010).

Byly navrženy dva hlavní mechanismy inhibice vývoje mikrobiálních buněk pomocí chitosanu. Díky polykationtovému charakteru chitosanu dochází k interakci s aniontovými skupinami na povrchu buněk a následně tvorbě nepropustné vrstvy kolem buňky, které brání transportu základních živin. Za mírně kyselých podmínek je chitosan protonován a chitosanová vrstva je permeabilní, jedná se o reverzibilní reakci (Helander *et al.*, 2001). Druhý mechanismus spočívá v inhibici RNA a proteinové syntézy pronikáním do buněčného jádra gramnegativních bakterií.

Chitosan vykazuje řadu antimikrobiálních aktivit, které jsou závislé na typu chitosanu (nativní nebo modifikovaný), jeho stupni polymerace, typu hostitele a podmínkách okolního prostředí (Pospieszny *et al.*, 1991; Rabea *et al.*, 2003; Kulikov *et al.*, 2006). V některých studiích bylo zjištěno, že oligomerní chitosany (pentametry a heptametry) vykazují lepší fungicidní účinnost než větší jednotky (Rabea *et al.*, 2003). V jiných případech se zvyšuje antimikrobiální aktivita s nárůstem molekulové hmotnosti chitosanu, větší účinek byl pozorován u hub a řas než v případě bakterií (Kulikov *et al.*, 2006; Savard *et al.*, 2002). Bylo prokázáno že chitosan inhibuje systémové šíření virů a viroidů v celé rostlině a zvyšuje hypersenzitivní reakce hostitele na infekci (Pospieszny *et al.*, 1991; Chirkov, 2002). Chitosan rovněž inhibuje růst širokého spektra bakterií a minimální koncentrace potřebná pro inhibici se liší mezi druhy od 10 – 1000 pm (Muzzarelli *et al.*, 1990).

Kvartérní amoniové soli chitosanu, jako jsou N,N,N-trimethylchitosan; N-propyl-N,N-dimethylchitosan a N-furfural-N,N-dimethylchitosan, jsou účinné při inhibici růstu a vývoje *Escherichia coli*, a to zejména v kyselém prostředí (Jia *et al.*, 2001). V posledních letech je řada prací zaměřena na studium antioxidační aktivity chitosanu (Park *et al.*, 2004). Bylo prokázáno, že se jedná o lapače ROS jako je hydroxylový radikál, H₂O₂ a aniont superoxidu.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. Experimentální část

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Aceton (Lachema, Česká republika); agar (Sigma-Aldrich, Německo); adenosintrifosfát (Sigma-Aldrich, Německo); akrylamid (Sigma-Aldrich, Německo); APS (Sigma-Aldrich, Německo); brofenolová modř (Bio-Rad, USA); Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA); DAF-FM DA (Sigma-Aldrich, Německo); diethylether (Lachema, Česká republika); dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo); dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, Německo); DTT (Sigma-Aldrich, Německo); DMSO (Sigma-Aldrich, Německo); dusitan sodný (Sigma-Aldrich, Německo); dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich, Německo); ethanol (96%, Lachema, Česká republika); glutathion (Acros Organics, USA); glycin (Sigma-Aldrich, Německo); glycerol (Sigma-Aldrich, Německo); hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo); hydrogenfosforečnan draselný dihydrát (Sigma-Aldrich, Německo); hydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Sigma-Aldrich, Německo); hydroxid draselný (Lachema, Česká republika); chitosan (Sigma-Aldrich, Německo); chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika); merkptoethanol (Sigma-Aldrich, Německo); kyselina chlorovodíková (Lachema, Česká republika); kyselina octová (Lachema, Česká republika); kyselina trihydrogenfosforečná (Lachema, Česká republika); MES hydrát (Sigma-Aldrich, Německo); MS médium s vitamíny (Sigma-Aldrich, Německo); methanol (Lachema, Česká republika); *N, N'*-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, Německo); *N, N, N', N'*-tetramethylethylendiamin (Sigma-Aldrich, Německo); NADH (AppliChem, Německo); NBT-BCIP (Sigma-Aldrich, Německo); N6022 (Axon Medchem, Holandsko); persíran amonný (Sigma-Aldrich, Německo), PMSF (Sigma-Aldrich, Německo); Ponceau S (Merck, Německo); primární polyklonální králičí protilátka anti-SIGSNOR (KBB PrF UPOL); proteinový standard pro SDS-PAGE (Bio-Labs, UK); PTIO (Sigma-Aldrich, Německo); sacharosa (Sigma-Aldrich, Německo); SAVO (Bochemie, Česká republika); sekundární anti-králičí protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfátasou (Sigma-Aldrich, Německo); sušené nízkotučné mléko (AppliChem, Německo); Triton X-100 (Acros Organics, USA); Tween-20 (Sigma-Aldrich, Německo); uhličitan amonný (Lach-Ner, Česká republika)

3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); centrifuga CL31R (Thermo Jouan, Francie); centrifuga 6K15 (Sigma, Německo); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); digitální

předvážky (KERN, Německo); dokumentační zařízení BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP, USA); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); laminární box (Schoeller, ČR); magnetická míchačka (IKA, Německo); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); nitroceluloseová membrána 0,45 μm (Bio-Rad, USA); spektrofotometr BioSpec-nano (Shimadzu, USA); termostat (Grant, UK); třepačka VXR basic (IKA, Německo); vortex (Stuart, UK); zařízení pro rychlou imunodetekci SNAP id. (Millipore, USA); zařízení pro rychlý transfer proteinů na membránu Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA); zařízení pro transfer proteinů na membránu Trans-Blot Semi dry (Bio-Rad, USA); zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA), mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA), světelný a fluorescenční mikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko).

3.1.3 Rostlinný materiál

Pro studium vlivu aplikace vybraných látek (ATP, GSNO, GSH, N6022 - inhibitor GSNOR-, nitroprussid sodný, PTIO) na vývoj klíčnic rostlin byly vybrány 3 genotypy *Solanum* spp. lišící se rezistencí k biotrofnímu patogenu *Oidium neolycopersici* (padlí rajčatové): *S. lycopersicum* cv. Amateur – náchylný, *S. chmielewskii* – středně náchylný, *S. habrochaites* – vysoce rezistentní.

Semena byla nejprve sterilizována 30 s v 70% roztoku ethanolu, 30 minut za stálého třepání v 3% roztoku SAVA a následně 3x promyta sterilní vodou. Sterilizovaná semena byla přenesena na 3 vrstvy filtračního papíru v Petriho misce, které byly ovlhčené sterilní vodou. Petriho miska se semeny byla po dobu 2-3 dnů uchována ve tmě při teplotě 24 °C. 10 naklíčených semen v jedné řadě bylo vyseto do čtvercových Petriho misek na pevné MS médium (40 ml/misku) obsahující testované sloučeniny o finální koncentraci uvedené v tabulce 5 (obr. 22). V kontrolním experimentu byla semena vyseta na MS médium neobsahující testované látky. Misky byly umístěny na 9 dní ve fytotronu při 25 °C. Experimenty byly prováděny vždy ve trojím opakování pro jednotlivé genotypy *Solanum* spp.

Pro studium vlivu koncentrace inhibitoru GSNOR (N6022) na vývoj klíčnic rostlin byl použit genotyp *S.habrochaites*. Finální koncentrace sloučeniny N6022 v MS mediu byla 0,1; 1 a 10 μM . Experiment byl proveden ve dvojitým opakování.

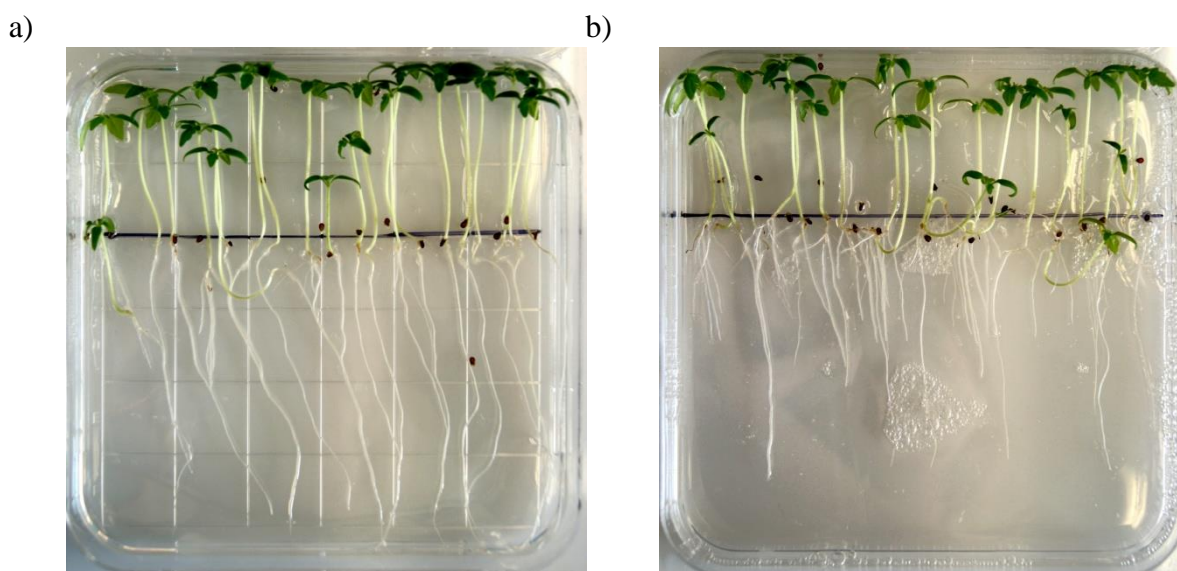
Tab. 5: Testované sloučeniny - finální koncentrace v MS médiu a koncentrace zásobních roztoků

Typ sloučeniny	Koncentrace zásobního roztoku	Finální koncentrace v MS médiu
ATP	100 mM	1 mM
GSH	100 mM	1,5 mM
GSNO	100 mM	100 μ M
N6022	1 mM	1 μ M
SNP	100 mM	100 μ M
PTIO	133 mM	0,1 mM
Chitosan 1	10 mg/ml pH=5,5	1 mg/ml
Chitosan 2	10 mg/ml pH=5,5	1 mg/ml

Chitosan 1: původ v exoskeletech korýšů z argentinského pobřeží Bahia Blanca, připraven v laboratoři prof. Lamatinna v Argentině

Chitosan 2: komerční chitosan od firmy Sigma-Aldrich (Německo)

Vliv testovaných látek na růst semenáčků byl 9 dnů po výsevu semen na MS medium dokumentován digitálním fotoaparátem Sony A330. Následně byla oddělena kořenová část od nadzemní, rostlinný materiál byl zvážen a zamražen pro realizaci dalších experimentů (stanovení aktivity GSNOR, Western blot). Kořeny semenáčků byly dále použity pro histochemickou detekci produkce RNS.



Obr. 22: Petriho misky s 9-ti denními semenáčky *Solanum habrochaites* pěstovanými na MS médiu (a) a MS médiu s 0,1 mM PTIO (b).

3.1.4 Příprava média

K naváženým látkám podle tab. 6 bylo přidáno 800 ml destilované H₂O a pH bylo upraveno na hodnotu 6,1. Objem byl doplněn na 1 l. Po autoklávování byla hodnota pH média 5,8.

Tab. 6: Příprava pevného média pro výsev semen

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

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

MES hydrát: 2-(N-Morfolino) ethansulfonová kyselina hydrát

3.1.5 Příprava S-nitrosoglutathionu (GSNO)

S-nitrosoglutathion byl připraven podle metodiky Moore a Mani z roku 2002. Ve 3 ml 0,5 M HCl bylo rozpuštěno na ledové lázni 614 mg glutathionu (MW=307,3). Dále bylo přidáno 138 mg dusitanu sodného (MW = 69). Reakční směs byla chlazená 40 minut v ledové lázni. Vzniklá červená sraženina byla odsáta pomocí Büchnerovy nálevky a promyta 2x 10 ml ledově vychlazené deionizované H₂O, 2x 10 ml ledově vychlazeného acetonu a 2x 10 ml ledově vychlazeného diethyletheru. Takto promytý produkt byl přenesen do alobalu (GSNO je nestabilní na světle), sušen v exikátoru a po dosušení zamražen. Jako pracovní roztok byl použit 4 mM GSNO.

3.1.6 Vyhodnocení délky kořenů a nadzemní části

Pro vyhodnocení délky kořenů byl použit ImageJ 1.33 software (National Institute of Health, USA).

3.2 Metody

3.2.1 Histochemie

Lokalizace a detekce RNS pomocí fluorescenční sondy DAF-FM DA byla realizována s využitím světelného a fluorescenčního mikroskopu Olympus BX50. Apikální části kořene (4 mm dlouhé segmenty) byly inkubovány 20 minut v 20 μ M DAF-FM DA v 10 mM Tris-HCl pufru, pH 7,4. Poté byly přeneseny na podložní sklíčko do kapky 5% glycerolu v 10 mM Tris-HCl pufru, pH 7,4, překryty krycím sklíčkem. Zelená fluorescence detekuje přítomnost RNS. Negativní kontrola byla realizována po aplikaci PTIO (lapače NO) ke kořenovým segmentům.

3.2.2 Extrakce

Rostlinný materiál byl homogenizován v poměru 1 : 2 (1 g rostlinného materiálu : 2 ml pufru) s extrakčním pufrem: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,2% (v/v) Triton X-100; 2 mM DTT (dithiotreitol); 1 mM PMSF (fenylmethylsulfonyl chlorid). DTT a PMSF byly k pufru přidány vždy těsně před použitím. Po 20 minutové centrifugaci extraktu byla při 16 000 g a 4 °C byl supernatant přečištěn gelovou filtrací na kolonce NAP-5 (GE Healthcare). K ekvilibraci kolonky byl použit 10 mM Na⁺-fosfátový pufr, pH 6,8 (3x opakovaná aplikace 2,5 ml Na⁺-fosfátového pufru). Poté bylo nanášeno na kolonku 500 μ l supernatantu, po jeho vsáknutí byl na kolonku aplikován 1 ml elučního pufru, tj. 50 mM K⁺-fosfátový pufr pH 7,8. Po zachycení 1 ml eluátu byla kolonka promyta 25 ml deionizované vody.

3.2.3 Stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR)

Metoda stanovení aktivity GSNOR je založena na principu Warburgova optického testu. Spektrofotometricky byla sledována oxidace NADH při 340 nm a 25°C. Měření bylo prováděno na 96 jamkových destičkách na readeru Synergy. Reakční směs v jednotlivých jamkách obsahovala 225 μ l reakčního pufru (20 mM Tris, pH 8), 15 μ l extraktu, 30 μ l 2 mM NADH. Reakce byla nastartována přidávkem 30 μ l 4 mM GSNO. V případě blanku se místo substrátu GSNO přidává 30 μ l deionizované H₂O. NADH a GSNO byly připravovány vždy čerstvě a uchovávány v chladu a tmě.

3.2.4 Stanovení proteinů metodou Bradfordové

Měření obsahu proteinů bylo prováděno na 96 jamkových destičkách na readeru Synergy. Jako standart byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Do jednotlivých jamek bylo napipetováno: 45 μ l deionizované vody, 5 μ l extraktu nebo standardu BSA o příslušné

koncentraci (0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 - 1,2 mg/ml) a 200 μ l pracovního činidla Bradfordové. Po 5 minutové inkubaci, byla proměřena absorbance při 595 nm.

Složení zásobního roztoku činidla Bradfordové: 0,5 mg/ml Coomasie Brilliant Blue G250; 0,25 M metanol; 0,5 M 85 % kyselina fosforečná. Naředěním 1:4 deionizovanou vodou byl získán pracovní roztok.

3.2.5 SDS-PAGE

Elektroforetická separace proteinů byla provedena metodou SDS-PAGE v 10% dělicím polyakrylamidovém gelu, pH 8,8 a 4% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu, pH 6,8.

V tab. 7 je uveden rozpis roztoků na přípravu 4 gelů pro skla se spacery o šířce 1,5 mm. Jako elektrodotový pufr byl použit 0,025 M Tris-HCl pH 8,3 obsahující 0,192 M glycin a 0,1% SDS. Dělení proteinů probíhalo v zaostřovacím gelu při konstantním napětí 120 V, na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu bylo napětí navýšeno na 200 V.

Vzorky proteinů určené k separaci za denaturujících podmínek byly připraveny smícháním v poměru 3:1 s Laemmliho vzorkovacím pufrem (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 0,2% bromfenolová modř; 5% β -merkaptoethanol). Poté byly ependorfy se vzorky vloženy do termobloku a inkubovány 5 min při 95°C. Po zchladnutí bylo nanášeno 40 μ l příslušného vzorku do jamky elektroforetické komůrky. V případě standartu molekulové hmotnosti (BioLabs) bylo do jamky aplikováno 5 μ l standardu bez inkubace při teplotě 95 °C. Jako standart molekulové hmotnosti byl použit komerční Protein-Ladder 10-250 kDa (BioLabs). Jedná se o směs dvanácti vysoce purifikovaných rekombinačních proteinů, které tvoří jasně identifikovatelné ostré bandy při separaci metodou SDS-PAGE. Bandy proteinů o velikost 25 a 80 kDa mají trojitou intenzitu, slouží jako referenční indikátory.

Tab. 7: Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy jsou uvedeny v ml pro 4 gely se spacery 1,5 mm.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	1,5 M Tris- HCl, pH 8,8	0,5 M Tris- HCl, pH 6,8	H ₂ O	10% SDS	TEMED	10% APS
Dělicí 12%	12	7,5	-	10,2	0,3	0,03	0,3
Zaostřovací 4%	3,9	-	7,5	18,3	0,3	0,03	0,3

3.2.6 Western blot

Transfer separovaných proteinů metodou SDS-PAGE na nitroceluloseovou membránu byl realizován s využitím zařízení

1. Semi-dry Trans-Blot (Bio-Rad) s následnou inkubací membrány s primární protilátkou přes noc (metoda 1)
2. Trans-Blot Turbo (Bio-rad) a realizací imunodetekce pomocí přístroje SNAP id. (Millipore) (metoda 2)

Metoda 1

Proteiny byly přeneseny na membránu v zařízení pro transfer proteinů Trans-Blot Semi-dry (Bio-Rad). Blotování probíhalo 2 hodiny při 130 mA. Úspěšnost přenosu byla ověřena vizualizací proteinů barvivem Ponceau S. Membrána po přenosu proteinů byla inkubována 2h v 5% blokovacím roztoku. Poté byla přenesena do roztoku obsahujícího primární protilátku zředěnou v poměru 1:1000 s blokovacím roztokem, inkubace probíhala přes noc ve 4°C na třepačce. Následovalo 3x opakované promytí membrány v 15 minutových intervalech roztokem TTBS. K membráně byla na 1 h přidána sekundární protilátka značená alkalickou fosfatase zředěná v poměru 1:5000 v TTBS. Následovalo opět 3x opakované promytí membrány v 15 minutových intervalech roztokem TTBS. Pro vizualizaci byla membrána inkubována 5 minut v chromogenním substrátu NBT-BCIP.

Metoda 2

Transfer proteinů na membránu byl realizován v zařízení Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) s nastavením: 2,5 A, 25 V, doba přenosu byla pouze 10 minut. Úspěšnost přenosu byla ověřena vizualizací proteinů barvivem Ponceau S.

Následně byla na přístroji SNAP id. (Millipore) metodou rychlé imunodetekce provedena imunochemická detekce proteinů na membráně. Toto zařízení bylo napojeno na zdroj vakua a využívá podtlak pro rychlý přenos blokovacího roztoku a roztoků protilátek přes membránu. Výhoda této metody spočívá hlavně v časové nenáročnosti, vyšší citlivosti, nízké interferenci signálu pozadí a také možnosti zpracovávat větší množství membrán najednou (až 6). Přístroj SNAP id. byl přes odsávací baňku napojen ke zdroji vakua, povrch držáku blotu byl navlhčen destilovanou vodou a do středu držáku byla umístěna membrána tak, aby proteiny obarvené barvivem Ponceau S směřovaly nahoru. Následně byla membrána pokryta spacerem tak, že zakryl celou membránu. Možné vzniklé vzduchové bubliny byly odstraněny opatrným přejížděním válečku po povrchu membrány. Víko držáku blotu bylo pevně uzavřeno a vloženo do přístroje SNAP id. Do každé komůrky byl odlit příslušný objem (závisí

na velikosti zvolené komůrky) blokovacího roztoku. Blokovací roztok byl po zapnutí zdroje vakua odsát přes membránu. Po úplném odsátí blokovacího roztoku byl vypnut zdroj vakua.

Byla aplikována primární protilátka. Po dobu 10 minutové inkubaci byl roztok odsát a membrána byla 3x promyta odpovídajícím objemem promývacího roztoku (0,1% Tween v TBS (TTBS)). Po promytí byla membrána inkubována po dobu 10 minut se sekundární protilátkou. Po odstranění roztoku se sekundární protilátkou membrána 3x promyta příslušným objemem promývacího roztoku. Po posledním promytí byl odpojen zdroj vakua a po vyjmutí membrány z držáku následovala vizualizace proteinů. K vizualizaci barevného produktu byl použit chromogenní substrát NBT-BCIP pro sekundární protilátku značenou alkalickou fosfatasou (10 minutová inkubace - vytvoření tmavě fialového zbarvení). Po promytí destilovanou vodou byla membrána vysušena a následovalo denzitometrické vyhodnocení s využitím dokumentačním systému Biospectrum 410, který je vybaven citlivou chlazenou CCD kamerou a napojen na počítač s programem VisionWorks pro sběr a analýzu získaných obrazových dat.

Příprava roztoků:

Blotovací pufr: 0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 20% methanol, pH 8,3

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

Blokovací roztok: 0,2 a 5 % nízkotučné sušené mléko v TTBS; pracovní pufr pro imunodetekci (TBS): 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5; 0,1% Tween v TBS (TTBS)

Barvicí roztok s NBT-BCIP: 75 μ l komerčního roztoku NBT-BCIP (Sigma) + 5 ml pufru (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$)

Primární protilátka:

- (a) připravená anti-králičí primární polyklonální protilátka proti SIGSNOR (1:1000 v 5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)

Sekundární protilátka:

- (b) komerční sekundární anti-králičí protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfatasou (1:5000 v TTBS)

4. Výsledky a diskuze

Problematika řešená v bakalářské práci je součástí výzkumného projektu zaměřeného na studium úlohy reaktivních forem dusíku ve fyziologickém vývoji rostlin a v reakci rostlin na působení biotických a abiotických stresových faktorů. V práci jsme se zaměřily na studium vlivu sloučenin, které mohou modulovat hladinu NO v rostlinné buňce a tak ovlivnit vývoj rostliny. V návaznosti na již zrealizované experimenty a získané výsledky týkající se zapojení RNS v obranných mechanismech a na základě nedávno publikované studie zaměřené na charakterizaci GSNOR u *Solanum* spp. byly do studie zařazeny tři genotypy *Solanum* spp. lišící se rezistencí k biotrofnímu patogenu *Oidium neolycopersici* (padlí rajčatové): *S. lycopersicum* cv. Amateur – náchylný, *S. chmielewskii* – středně náchylný, *S. habrochaites* – vysoce rezistentní.

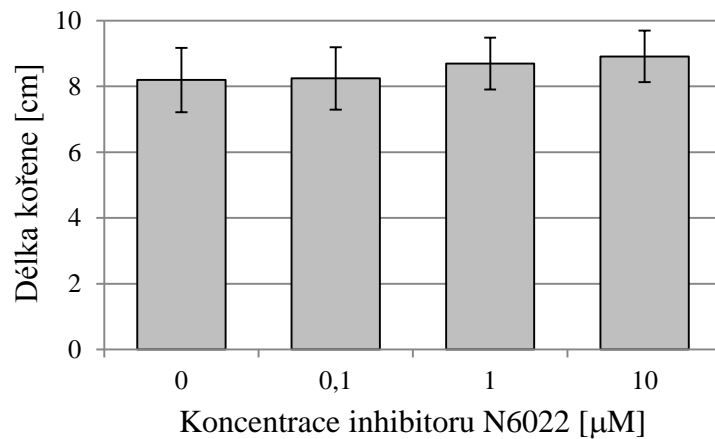
V rámci experimentální části bakalářské práce byl sledován vliv aplikace vybraných látek (ATP, GSNO, N6022, GSH, PTIO, chitosan) do růstového MS média na fyziologické parametry klíčnicích rostlin (délka kořene a nadzemní části), na produkci NO v kořenech (histochemická detekce NO) a změny v aktivitě GSNOR, enzymu regulujícímu hladinu NO v živých organismech.

4.1 Vliv koncentrace sloučeniny N6022 na vývoj kořene a produkci oxidu dusnatého

Enzym GSNOR se podílí na regulaci hladiny NO v buňce, katalyzuje přeměnu GSNO na N-hydroxysulfonamid. Konečný produkt je závislý na koncentraci GSH (Jensen *et al.*, 1998).

Sloučenina N6022 vykazuje inhibiční účinky na enzymy GSNOR (Green *et al.*, 2012; Kubienová *et al.*, 2013a). Zvýšená hladina GSNO v důsledku inhibice GSNOR aktivity vede k buněčné signalizaci S-nitrosylací, dochází k ovlivňování hladiny NO a dusitanů, vedoucí k produkci dalších reaktivních forem kyslíku a dusíku (Sanghani *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011).

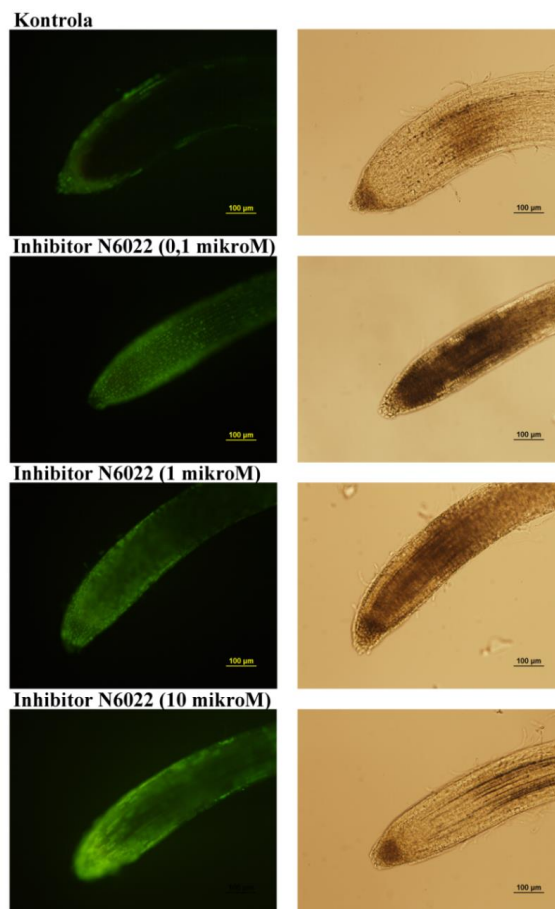
V práci Kubienová *et al.* (2013a), která je zaměřena na charakterizaci enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy, byl prokázán inhibiční vliv N6022 na GSNOR, jehož zdrojem je *Solanum* spp. (IC_{50} byl 300 ± 18 nM). Byl prokázán nekompetitivní charakter inhibice s inhibiční konstantou $K_i = 429 \pm 30$ nM, tudíž se tato látka jeví jako atraktivní cíl pro *in vivo* studie na rostlinách. V rámci prvních experimentů jsme otestovaly vliv koncentrace inhibitoru GSNOR (N6022) na růst klíčnicích rostlin. Experimenty byly realizovány na *S. habrochaites* rezistentním genotypu vůči biotrofnímu patogenu padlí rajčatové. Byly testovány koncentrace sloučeniny N6022: 0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M. V přítomnosti inhibitoru GSNOR byl zaznamenán slabý pozitivní vliv na růst kořenů (obr. 23).

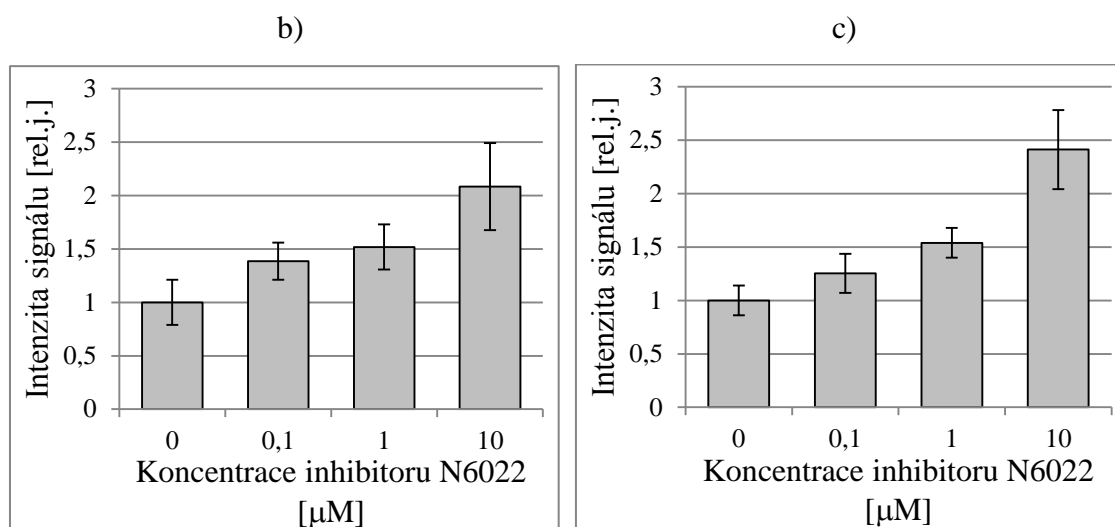


Obr. 23: Vliv inhibitoru GSNOR N6022 na růst kořene u 9-ti denních semenáčků genotypu *S. habrochaites*. Použité koncentrace sloučeniny N6022: 0,1 µM; 1 µM; 10 µM.

Se zvyšující se koncentrací sloučeniny N6022 v médiu byl pozorován významný nárůst produkce NO, a to zejména v kořenové špičce (obr. 24). Nejvýraznější intenzita signálu byla detekována v apikální části kořene po aplikaci 10 µM inhibitoru N6022.

a)





Obr. 24: Vliv koncentrace inhibitoru GSNOR (N6022) na produkci NO v kořenové špičce 9-ti denních semenáčků *Solanum habrochaites*. Detekce NO s využitím fluorescenční sondy DAF-FM DA. a) Detekce NO s využitím fluorescenčního mikroskopu, b) vyhodnocení intenzity signálu v kořenové špičce (do vzdálenosti 1,4 mm od apikální části kořene), c) vyhodnocení intenzity signálu v kořenové špičce (pouze do vzdálenosti 0,2 mm od apikální části kořene).

4.2 Vliv testovaných látek na vývoj kořene a nadzemní části

V řadě publikovaných studií je v realizovaných experimentech sloučenina S-nitrosoglutathion (GSNO) používána jako fyziologický donor NO (Liu *et al.*, 2007; Zandonadi *et al.*, 2010; Semchuk *et al.*, 2011). Dalšími sloučeninami, které se používají jako donory NO, je např. nitroprussid sodný (SNP) nebo S-nitroso-N-acetyl-D-L-penicilamin (SNAP) (Fernández-Marcos *et al.*, 2013; Correa-Aragunde *et al.*, 2004). Nejčastěji je GSNO v experimentech používán v koncentraci 100 μM, případně 200 μM (Liu *et al.*, 2007; Zandonadi *et al.*, 2010).

V případě nitroprussidu sodného byla pozorována pozitivní stimulace růstu primárního kořene při aplikaci 0,1 nM SNP. Při vyšší koncentraci SNP než 50 μM naopak docházelo k inhibici primárního kořene a růstu laterálních kořenů (Correa-Aragunde *et al.*, 2004). Sloučenina PTIO (lapač NO) se používá ve studiích zaměřených na úlohu NO ve fyziologických procesech nebo v mechanismu obranných reakcí rostlin (Fernández-Marcos *et al.*, 2012, 2013). Obvyklá koncentrace PTIO v experimentech je 1 mM (Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Fernández-Marcos *et al.*, 2012, 2013). Inhibiční účinek PTIO na růst primárního kořene i laterálních kořenů a také vliv na snížení hladiny NO byl potvrzen v několika studiích (Fernández-Marcos *et al.*, 2012; Correa-Aragunde *et al.*, 2004).

Ve studii Wu *et al.* (2008b) byl prokázán vliv zvýšené koncentrace extracelulárního ATP na růst kořene *Salvia miltiorrhiza*. Byla potvrzena významná úloha NO v mechanismu působení eATP (Wu *et al.*, 2008b).

Při porovnání testovaných genotypů se nejpomaleji vyvíjel genotyp *S. chmielewskii*. Délka i hmotnost kořene, podobně jako nadzemní části, byly výrazně nižší v porovnání s dalšími studovanými genotypy (obr. 25a,b, obr. 26a,b). Naopak kořen i nadzemní část genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur byly u 9-denních rostlin nejdelší (obr. 25a,c, obr. 26a,c).

V případě aplikace ATP, GSNO (donor NO) a inhibitoru GSNOR (N6022) byl pozorován pozitivní vliv na růst kořene. Nejvýraznější změny byly zaznamenány u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur (obr. 25c). U genotypu *S. habrochaites* se aplikace ATP, GSNO nebo N6022 projevila pouze mírným nárůstem (obr. 25c). V případě genotypu *S. chmielewskii* byl pozorován významný pozitivní vliv na růst kořene po aplikaci ATP. U všech genotypů byl růst kořene v prostředí GSH (redukovaného glutathionu) a PTIO (lapač NO) inhibován (obr. 25c).

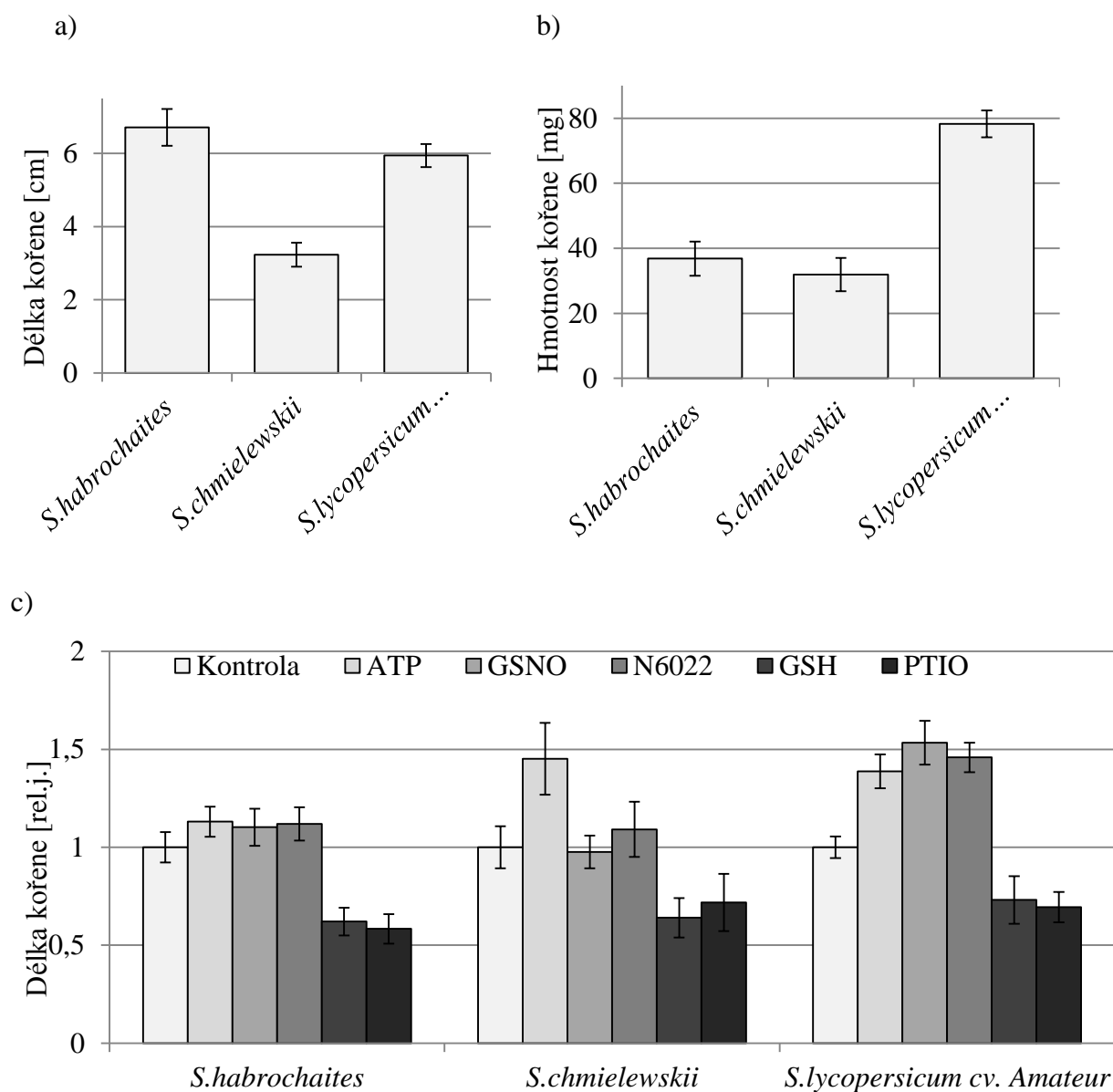
Glutathion je všudypřítomný tripeptid, který má významnou roli ve vývoji rostlin, klíčení pylu a je zapojen do obranného mechanismu rostlin (Foyer a Noctor, 2009; Zechmann *et al.*, 2011). Ve studii Veroux *et al.* (2000) bylo prokázáno, že nedostatek GSH vede k zablokování buněčného dělení v G1 fázi, čili je nezbytný pro zahájení a udržování buněčného dělení. Také bylo naznačeno, že existence vývojových drah závislých na GSH je nezbytná pro zahájení a udržování buněčného dělení během postembryonálních vývojů kořenů. Je známo, že GSH reakcí s oxidem dusnatým přispívá ke vzniku GSNO jako zásobárny NO. Redukční účinek GSH byl sledován také na etiolovaných semenáčcích *A. thaliana*, kdy byla pozorována inhibice růstu nejen hypokotypů, ale také změna v délce primárního kořene, počtu kořenových vlásků a změny v gravitropickém růstu (Tonon *et al.*, 2010).

V prostředí lapače NO PTIO měly sníženou hmotnost pouze kořeny *S. lycopersicum* cv. Amateur (obr. 25d). Hmotnost kořenů 9-ti denních rostlin po aplikaci ostatních testovaných látek byla vyšší v porovnání s kontrolou. Největší změny byly detekované vlivem ATP u genotypu *S. lycopersicum* a GSNO u genotypu *S. chmielewskii*. Podobně jako délka i hmotnost kořenů byla minimálně ovlivněna testovanými látkami v případě genotypu *S. habrochaites*.

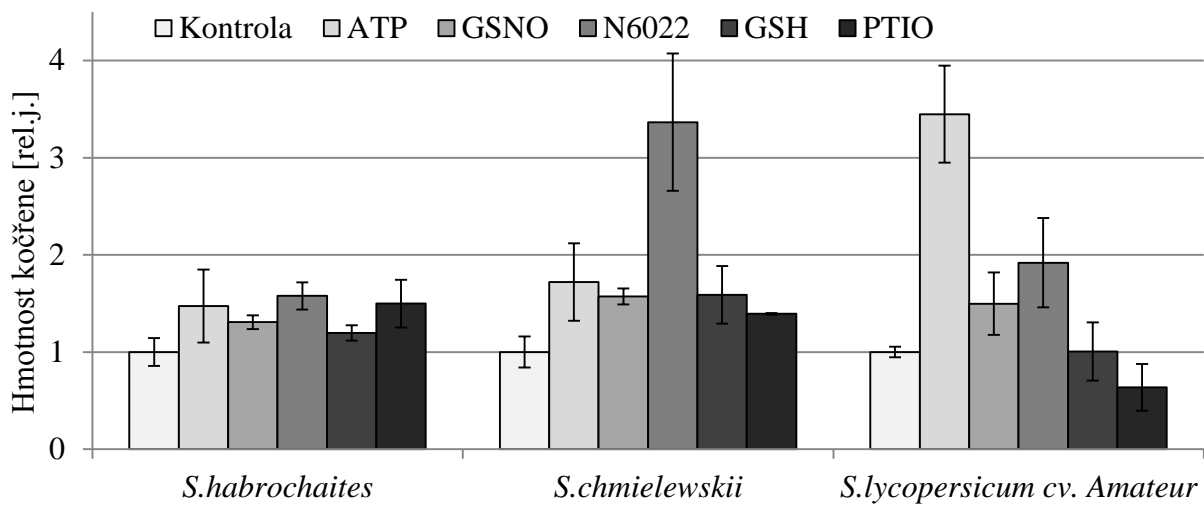
Bylo prokázáno, že NO je klíčovou složkou signálních drah při dormanci a klíčení semen (Beligni a Lamattina, 2000; Bethke *et al.*, 2004a, b, 2006; Libourel *et al.*, 2006). Ve studii Correa-Aragunde *et al.* (2004) byl potvrzen vliv NO na růst primárního kořene a rozvoj laterálních kořenů u rajčat. Je známo, že při ošetření rostlin dusičnany dojde ke stimulaci

rozvoje laterálních kořenů (Granato a Rapper 1989; Zhang a Forde, 1999). Enzymovou či neenzymovou redukcí dusičnanů může dojít ke zvýšené produkci NO v kořenech. Nabízí se hypotéza, že by vznikající NO, jako signální molekula, mohl oznamovat přítomnost dusičnanů v půdě a tím zprostředkovávat jeho vliv na tvorbu laterálních kořenů (Stohr a Ullrich, 2002).

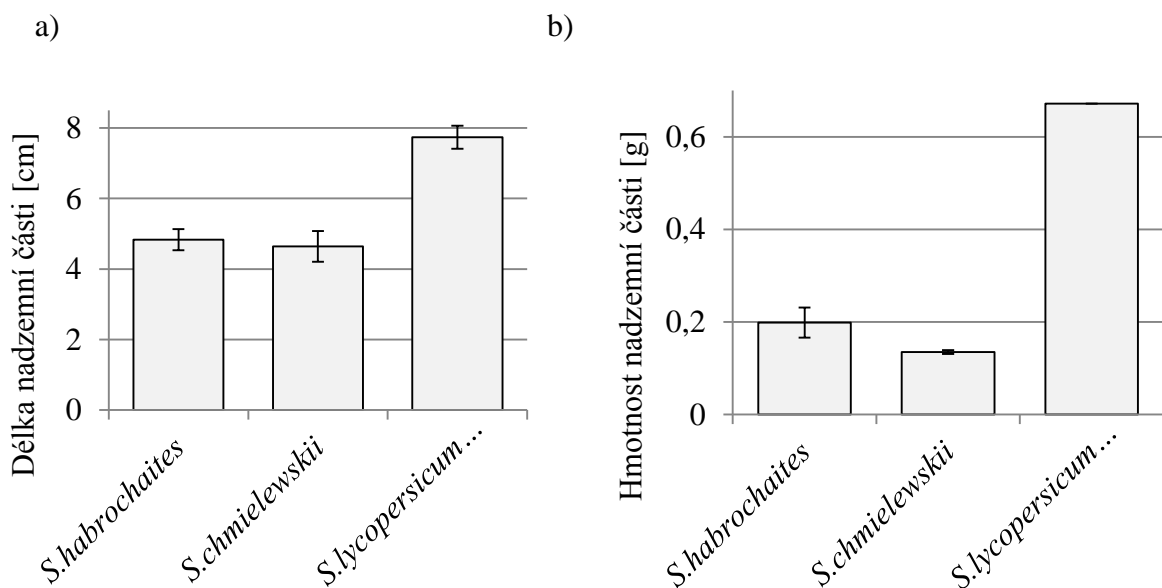
Vliv testovaných sloučenin na růst nadzemních částí klíčících rostlin (délku a hmotnost) byl minimální (obr. 24d). U genotypu *S. chmielewskii* a *S. lycopersicum* byla pozorována mírná inhibice růstu kořene v prostředí testovaných látek (největší vliv měl lapač NO PTIO) (obr. 26d).



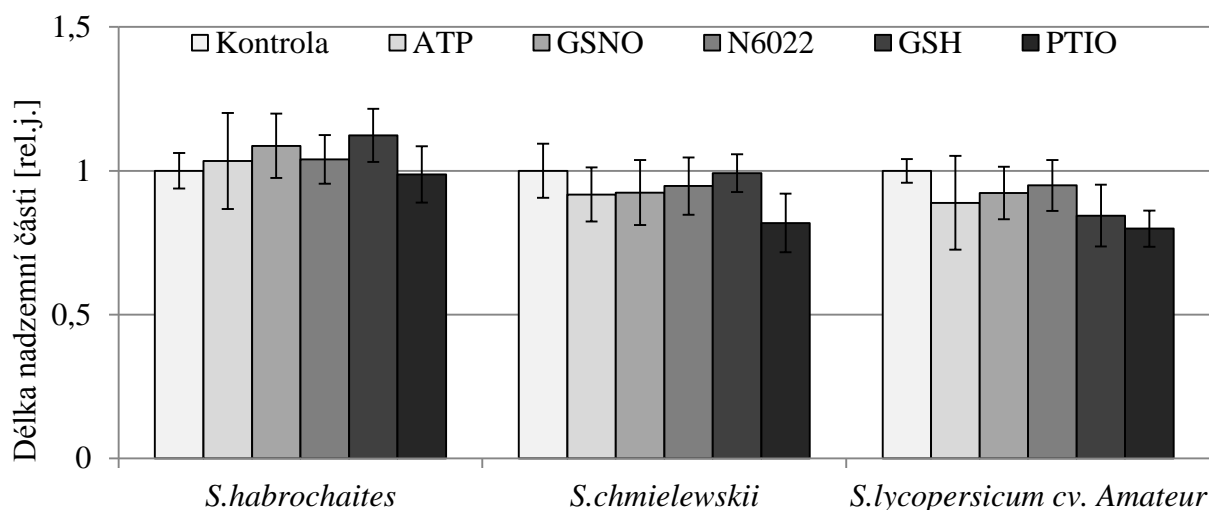
d)



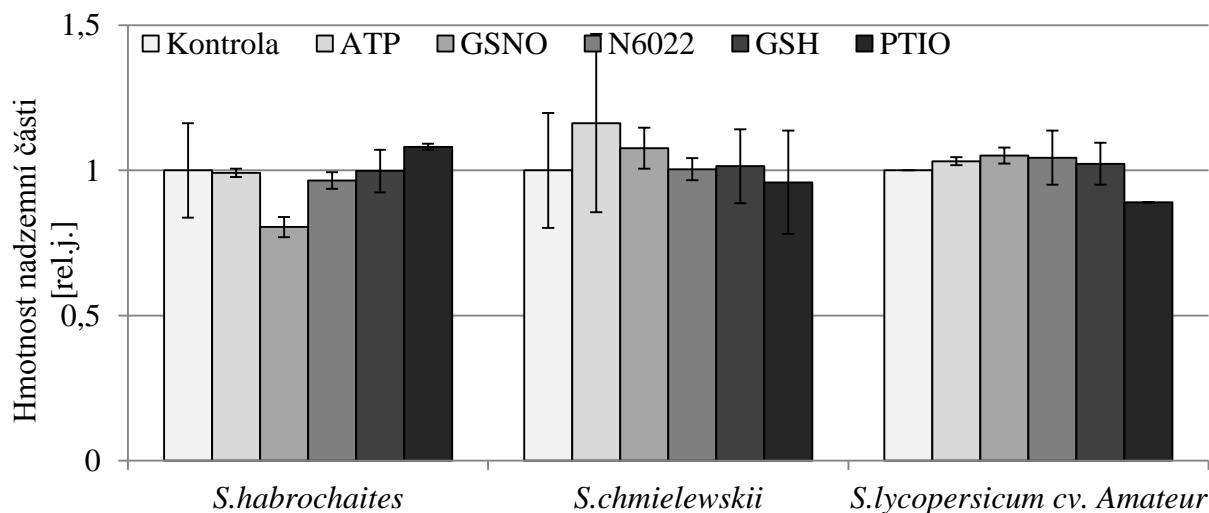
Obr. 25: Vliv testovaných látek na délku a hmotnost kořene 9-ti denních semenáčků tří genotypů *Solanum* spp. (*S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*). Porovnání a) délky kořenů b) hmotnosti kořenů c) délky kořenů po aplikaci testovaných látek d) hmotnosti kořenů po aplikaci testovaných látek. Testované sloučeniny: 1 mM ATP; 100 μ M GSNO; 1 μ M N6022; 1,5 mM GSH; 0,1 mM PTIO.



c)



d)



Obr. 26: Vliv testovaných látek na délku a hmotnost nadzemní části 9-ti denních semenáčků tří genotypů *Solanum* spp. (*S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*). Porovnání a) délky nadzemní části b) hmotnosti nadzemní části c) délky nadzemní části po aplikaci testovaných látek d) hmotnosti nadzemní části po aplikaci testovaných látek. Testované sloučeniny: 1 mM ATP; 100 μ M GSNO; 1 μ M N6022; 1,5 mM GSH; 0,1 mM PTIO.

V rámci studie působení látek, potenciálně ovlivňujících hladinu NO, na růst klíčících rostlin genotypu *Solanum* spp. byl sledován účinek chitosanu. K dispozici byly dva chitosany, které se lišily svým původem. Chitosan 1 má původ v exoskeletech korýšů z argentinského pobřeží Bahia Blanca a byl připraven deacetylací chitinu v laboratoři prof. Lamattina v Argentině. Chitosan 2 je komerční od firmy Sigma Aldrich (Německo).

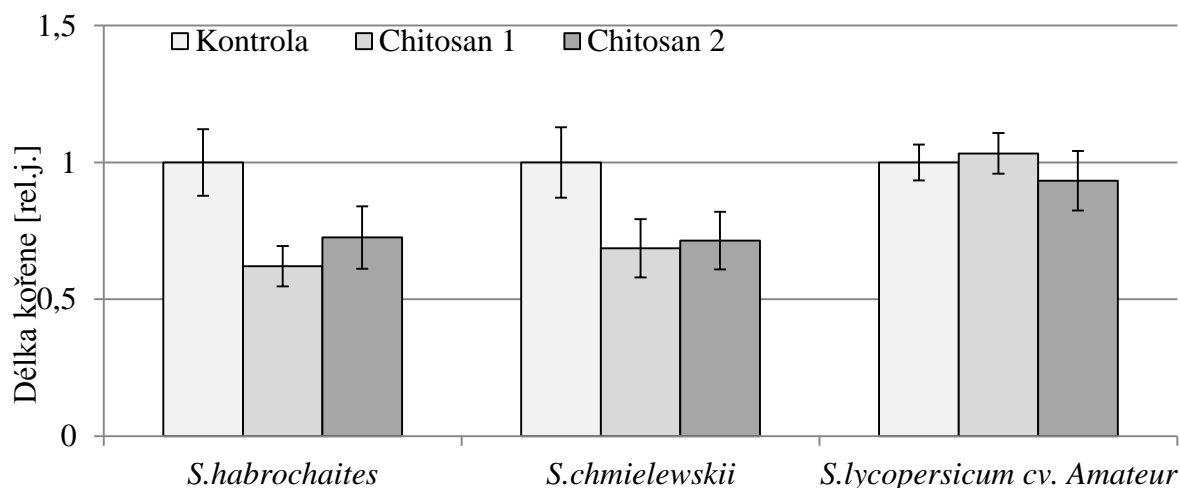
V porovnání s kontrolou byl pozorován u genotypů *S. habrochaites* a *S. chmielewskii*, vykazujících rezistentní vlastnosti při napadení patogenem *O. neolycopersici*, snížený nárůst délky kořene u rostlin ošetřených chitosanem (obr. 27). U posledního ze tří testovaných genotypů *S. lycopersicum* cv. Amateur nebyl vliv chitosanu na růst kořene pozorován.

Již z literatury je známo, že ošetření rostlin chitosanem zvyšuje rezistenci rostlin na patogeny, dále např. substrát obohacený o chitosan potlačil hnití kořenů působené *Fusarium oxysporum* u rajčete (Lafontaine a Benhamou, 1996). Mnoho studií zabývajících se efektem chitosanu na zemědělsky významné plodiny vykazuje pozitivní účinek na růst jak kořenů, tak i listů a květů. Avšak je zajímavostí, že např. chitosan nemá žádný vliv na rýži (Bonlertnirun *et al.*, 2005). Ve studii Guan *et al.* (2009) bylo zjištěno, že ačkoli chitosan neměl významný vliv na klíčení semen kukuřice při nízkých teplotách, zlepšuje index klíčení, snižuje střední dobu klíčení a zvyšuje délku kořene a jeho hmotnost. Bylo prokázáno, že chitosan zvyšuje odolnost semen pšenice k některým chorobám a zlepšuje jejich kvalitu a/nebo jejich schopnost klíčit (Reddy *et al.*, 1999). Podobně semena arašídů ošetřená chitosanem vykazují zvýšenou míru klíčivosti (Zhou *et al.*, 2002).

V několika studiích byl potvrzen antioxidační účinek chitosanu. Rozpustný chitosan je výborným lapačem ROS, např. H_2O_2 a superoxidového aniontu (Xie *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2006, 2008; Chen *et al.*, 2009). Hypersenzitivní reakce (HR) jako obranná strategie rostlin je charakteristická prudkou akumulací ROS a synergické působení NO a H_2O_2 omezuje invazi patogenu. Studie Mlíčková *et al.* (2004) a Tománková *et al.* (2006) potvrdily intenzivnější HR (tedy akumulaci ROS) u středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* ve srovnání s vysoce rezistentním *S. habrochaites*. Ve studii Piterková *et al.* (2009) byl pozorován významný nárůst produkce NO v extraktech infikovaných listů rajčete u středně a vysoce rezistentního genotypu, což bylo potvrzeno i lokalizací NO konfokální mikroskopií.

Jelikož při formování kořene dochází k produkci ROS (převážně u rezistentních genotypů), je možné, že po přidavku chitosanu, který je lapačem ROS, dojde k pomalejšímu růstu kořene. U citlivého genotypu je akumulace ROS a taktéž produkce NO odlišná (Piterková *et al.*, 2009), neboť vykazuje rozdílné obranné mechanismy.

Zůstává tedy otázkou k řešení, proč jsme v naší práci pozorovali snížený nárůst délky kořenů u rezistentních genotypů, která bude řešena v následné práci.



Obr. 27: Vliv chitosanu na délku kořene 9-ti denních semenáčků tří genotypů *Solanum* spp. (*S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*). Testované sloučeniny: 1mg/ml chitosan 1 nebo chitosan 2

4.3 Vliv testovaných látek na produkci oxidu dusnatého

V kořenových špičkách čtyř- a devítidenních klíčnicích rostlin byla histochemickou metodou s využitím fluorescenční sondy DAF FM-DA detekována intenzita fluorescenčního signálu korespondující s hladinou RNS (Obr. 28b, c). Graf na obr. 28b byl zařazen do bakalářské práce z důvodů demonstrace dynamických změn produkce RNS. Měření 4. den po výsevu naklíčených semen na médium s testovanými látkami bylo realizováno v rámci doktorské práce P. Moricové. Přítomnost NO v apikální části kořene byla potvrzena v pracích Piterková *et al.* (2011), Fernández-Marcos *et al.* (2012) a Correa-Aragunde *et al.* (2004).

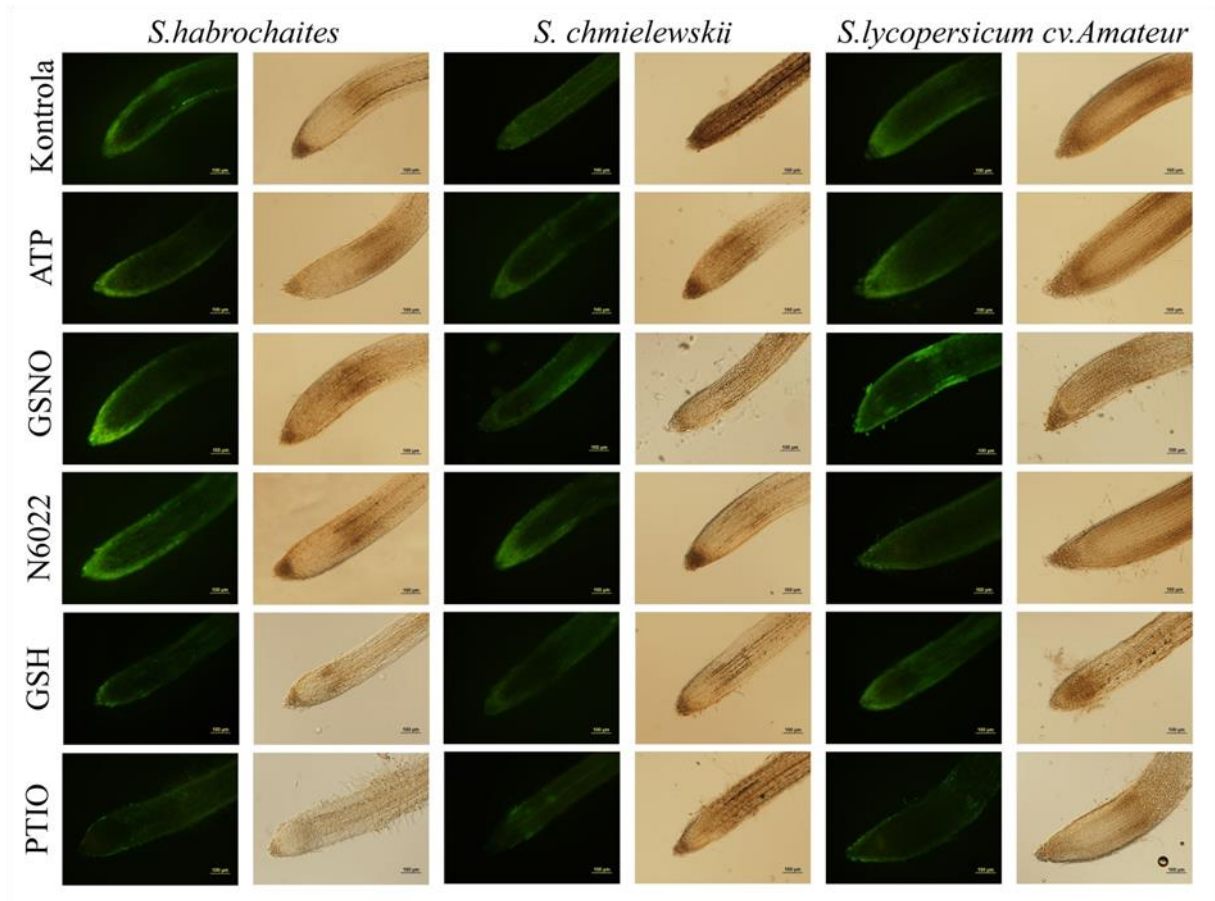
Z obrazové dokumentace a orientačního vyhodnocení intenzity signálu je zřejmá dynamika změn v produkci NO v průběhu růstu kořene (u 4- a 9-ti denních rostlin) (obr. 28). K nejvýraznějším změnám dochází v apikální části kořene (obr. 28a). Lze předpokládat, že největší změny v hladině NO budou krátce po přenesení naklíčených semen na médium obsahující testované látky. Postupně dochází k odbourání testovaných sloučenin, případně jejich vyčerpání. Například je známo, že GSNO je sloučenina nestabilní na světle (Williams 1999). Ve studii Wu *et al.* (2008b) bylo potvrzeno, že ATP vyvolává rychlou a na dávce závislou produkci NO v kořenových kulturách *Salvia miltiorrhiza*. Během prvních 4 hodin došlo k nárůstu produkce NO a bylo dosaženo maximální úrovně produkce. Naproti tomu studie od Chivasa *et al.* (2009) ukázala, že dlouhotrvající akumulace eATP má negativní efekt na odpověď rostlin na patogenní infekci.

Výsledky z histochemické studie prokázaly zvýšenou koncentraci NO v kořenu u rostlin pěstovaných na médiu s GSNO a s inhibitorem GSNOR a naopak sníženou hladinu NO

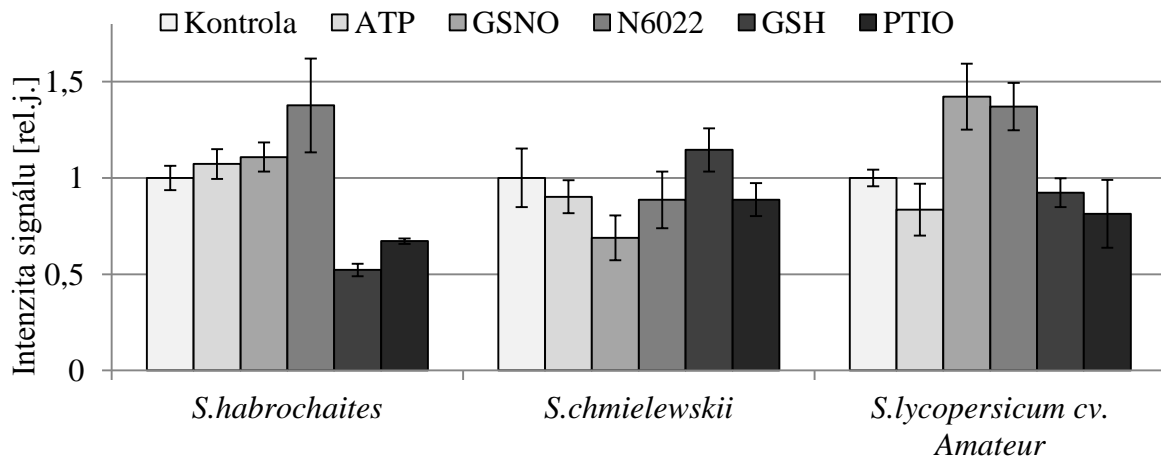
v prostředí s GSH a zejména v prostředí s lapačem PTIO (Obr. 28c). Významný vliv ATP v MS médiu na koncentraci NO v kořenech čtyř- a devítidenních rostlin nebyl prokázán.

Významně zvýšená koncentrace NO byla detekovaná u kořene čtyřdenních rostlin *S. habrochaites* a *S. lycopersicum* cv. *Amateur* pěstovaných na médiu s donorem NO (GSNO) nebo s inhibítoem GSNOR (N6022) (obr. 28).

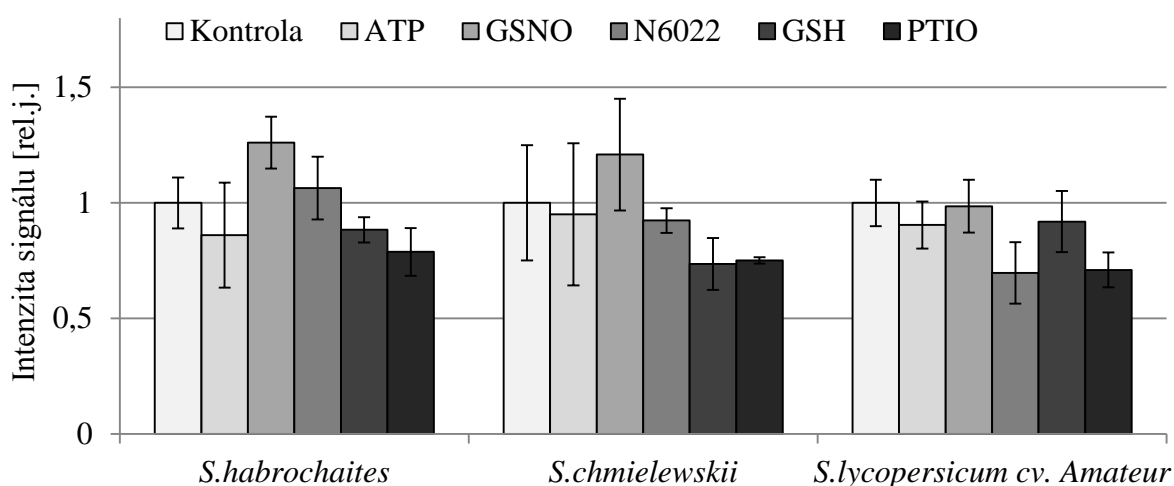
a)



b)



c)



Obr. 28: Vliv testovaných látek na intenzitu signálu oxidu dusnatého (NO) detekovaného histochemicky s využitím fluorescenční sondy DAF-FM DA v kořenové špičce tří genotypů *Solanum* spp. (*S. habrochaites*, *S. chmielewskii*, *S. lycopersicum* cv. Amateur) a) Detekce NO s využitím fluorescenčního mikroskopu u 9 denních rostlin, b) vyhodnocení intenzity signálu v kořenové špičce u 4 denních rostlin c) vyhodnocení intenzity signálu v kořenové špičce u 9-ti denních rostlin.

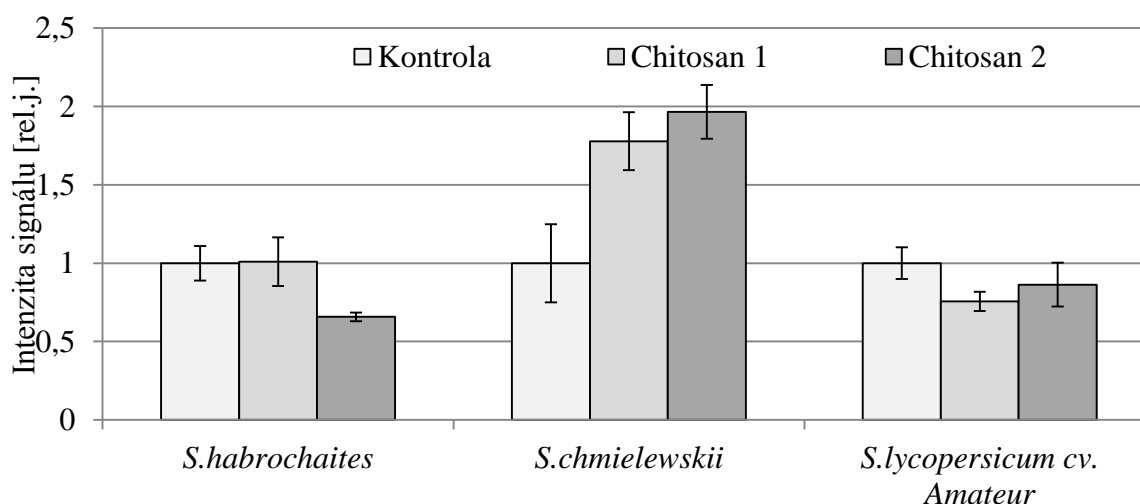
Po aplikaci obou testovaných chitosanů byla zaznamenána významně zvýšená produkce NO v apikální části kořenové špičky u genotypu *S. chmielewskii*. V případě genotypu *S. habrochaites* a *S. lycopersicum* cv. Amateur nebyl prokázán významný vliv chitosanu na produkci NO, případně byl detekován mírný pokles hladiny NO v kořenové špičce (obr. 29b). Již dřívější experimenty prokázaly nejintenzivnější HR po infekci patogenem u *S. chmielewskii*, kdy dojde k nejvýraznější produkci NO (Piterková *et al.*, 2009).

Z literatury je známo, že chitosan podporuje produkci NO. Chitosanem indukovaná tvorba NO poté např. vede k omezení růstu patogena. Tímto byly potvrzeny antifungicidní účinky na patogena. Genotyp *S. chmielewskii* – středně rezistentní, se díky své intenzivní HR a produkci NO dokáže lépe bránit napadení patogenem, pokud je přestován v prostředí chitosanu.

a)



b)



Obr. 29: Vliv chitosanu na intenzitu signálu oxidu dusnatého (NO) detekovaného s využitím využitím fluorescenční sondy DAF-FM DA v kořenové špičce 9-ti denních rostlin tří genotypů *Solanum* spp. (*S. habrochaites*, *S. chmielewskii*, *S. lycopersicum* cv. Amateur)
a) Detekce NO s využitím fluorescenčního mikroskopu, b) vyhodnocení intenzity signálu v kořenové špičce.

4.4 Vliv testovaných látek na aktivitu GSNOR

V rámci pilotních experimentů byla stanovena S-nitrosoglutathionreduktasová aktivita v kořenech i nadzemních částech 9-ti denních rostlin tří genotypů *Solanum* spp. lišících se rezistencí k biotrofnímu patogenu padlí rajčatové: *S. habrochaites* - vysoce rezistentní, *S. chmielewskii* - středně náchylný, *S. lycopersicum* cv. Amateur - náchylný.

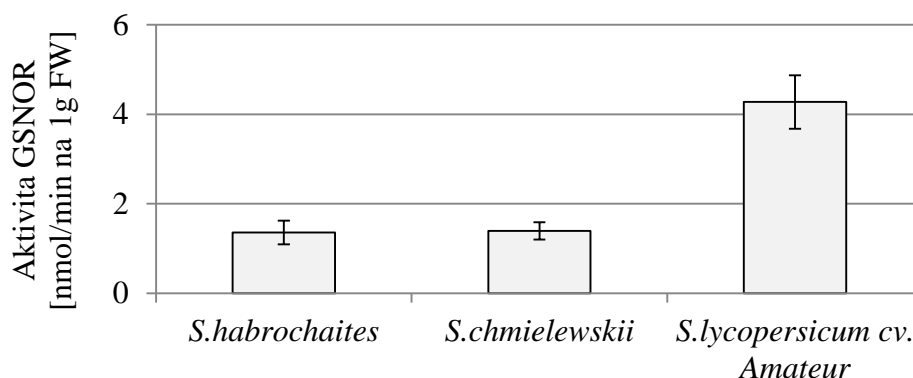
Téměř desetinásobně nižší aktivita GSNOR byla detekována v kořenu v porovnání s nadzemní částí 9-ti denních rostlin u všech tří genotypů *Solanum* spp. Nejnižší aktivita byla

pozorována u kořene i nadzemní části genotypu *S. habrochaites*. Nejvyšší aktivita byla sledována u náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. Tyto výsledky jsou v korelaci s daty publikovanými v práci Kubienová *et al.* (2013a), kdy byly stanoveny aktivity GSNOR u 10-ti denních semenáčků výše uvedených genotypů *Solanum* spp. U starších rostlin (30, 45 denních byla prokázána vyšší aktivita ve stonku v porovnání s kořenem (Kubienová *et al.*, 2013c).

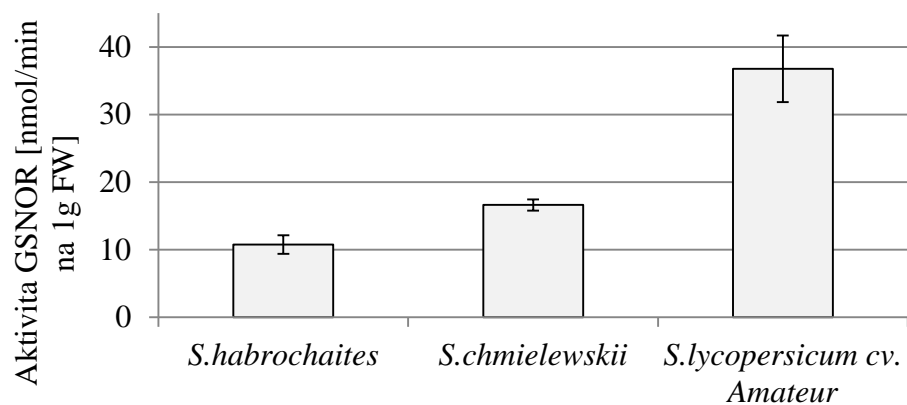
U kořenů rostlin pěstovaných na médiu s testovanými sloučeninami byla vždy zaznamenána zvýšená GSNOR aktivita. U genotypů *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* největší změny v GSNOR aktivitě v kořenech byly detekovány u rostlin na médiu obsahujícím GSH. U genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur byly nejvyšší změny GSNOR aktivity pozorovány u kořenů rostlin pěstovaných na médiu se sloučeninou PTIO a ATP. V rámci nadzemní části rostlin nebyly změny v aktivitě GSNOR vlivem testovaných sloučenin tak vysoké. U genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur byla zaznamenána zvýšená GSNOR aktivita vlivem všech testovaných sloučenin s výjimkou lapače NO (PTIO). Profil změn aktivit GSNOR pod vlivem testovaných látek byl v případě genotypů *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* podobný. U *S. habrochaites* byl pokles GSNOR aktivity v prostředí ATP a GSH výraznější.

Protože se jednalo pouze o pilotní experimenty a výsledky nebyly ověřeny v dostatečném opakování, nelze jednoznačně vyslovit závěry týkající se vlivu testovaných látek na aktivitu GSNOR. Rovněž bude důležité sledovat dynamiku změn v průběhu vývoje rostlin v daném prostředí.

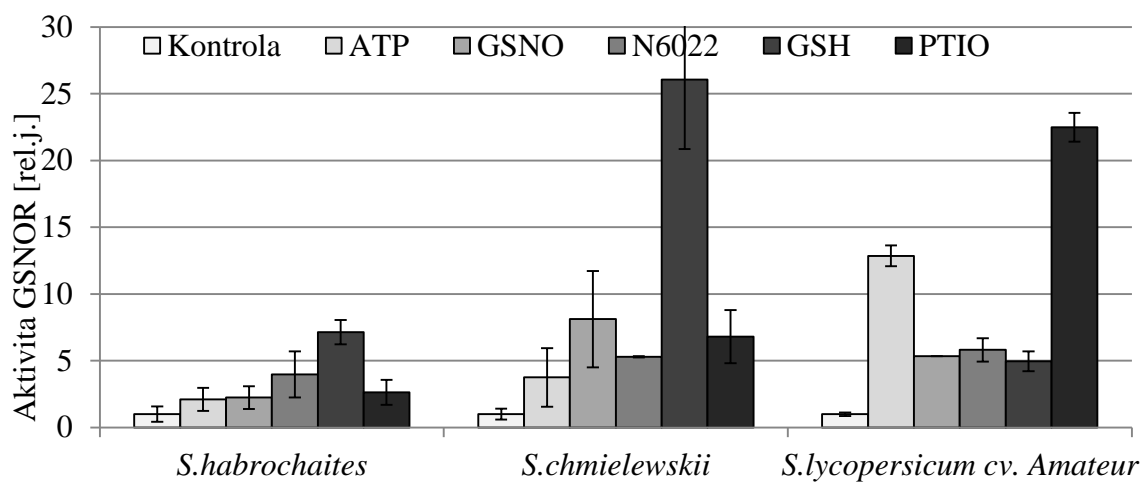
a)



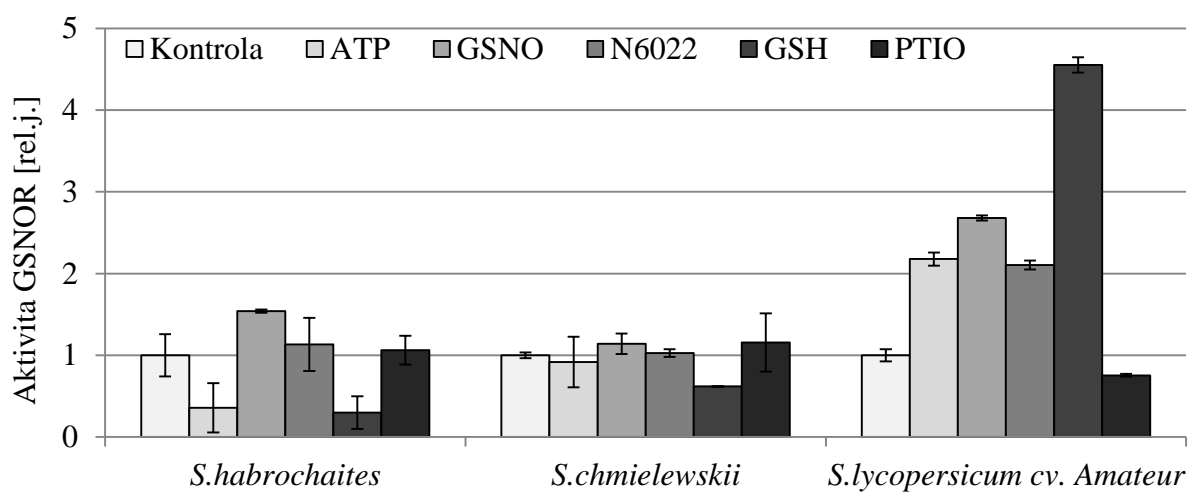
b)



c)



d)



Obr. 30: Vliv testovaných látek na aktivitu GSNOR 9-ti denních semenáčků genotypů *Solanum* spp. (*S. habrochaites*, *S. chmielewskii*, *S. lycopersicum cv. Amateur*).

GSNOR aktivita detekovaná u a) kořene, b) nadzemní části, c) kořene po aplikaci testovaných látek, d) nadzemní části po aplikaci testovaných látek.

4.5 Detekce GSNOR metodou Western blot

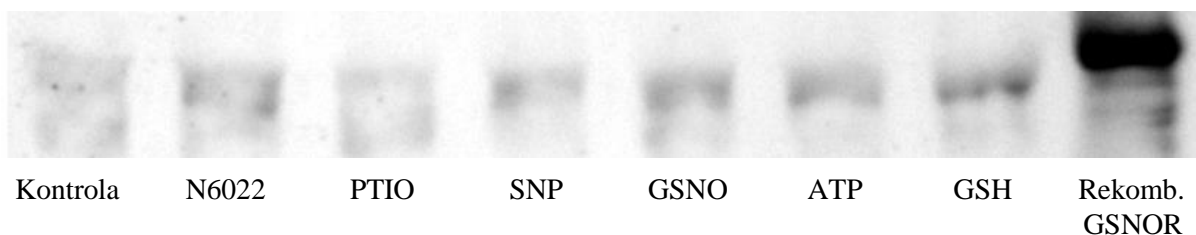
V rámci pilotních experimentů byla detekována přítomnost GSNOR v kořenech a nadzemních částí tří genotypů *Solanum* spp. metodou Western blot.

Detekce GSNOR v kořenech genotypů *Solanum* spp. byla z důvodů nedostatku rostlinného materiálu (malá hmotnost kořínků) neúspěšná. V nadzemních částech byla úspěšně detekována GSNOR ve všech třech genotypech *Solanum* spp. s rostoucí intenzitou signálu od *S. habrochaites* k *S. lycopersicum* cv. Amateur.

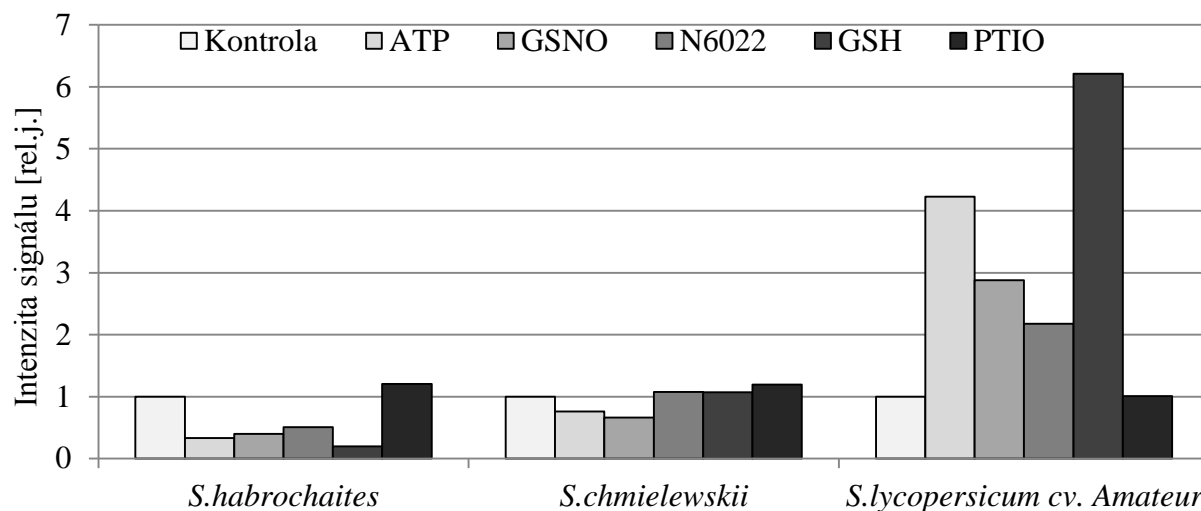
U všech tří genotypů byl pozorován minimální nebo žádný nárůst signálu oproti kontrole u nadzemních částí ošetřených PTIO (obr. 31b). V rámci náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur došlo k nárůstu intenzity signálu u rostlin pěstovaných na MS médiu obsahujícím všechny testované látky s výjimkou PTIO. Nejvýznamnější změny byly detekovány u rostlin ošetřených GSH a ATP. U nadzemních částí *S. habrochaites* byl u rostlin pěstovaných na médiu s ATP, GSNO, GSH a N6022 pozorován výrazně nižší signál oproti kontrole.

V porovnání s výsledky aktivit nadzemních částí genotypů *Solanum* spp. byl sledován podobný trend u genotypů *S. habrochaites* a *S. chmielewskii*. U *S. habrochaites* se výsledky liší v aplikaci GSNO a PTIO.

a)



b)



Obr. 31: Vliv testovaných látek na intenzitu bandů - Western blot detekce GSNOR 9-ti denních semenáčků genotypů *Solanum* spp. (*S. habrochaites*, *S. chmielewskii*, *S. lycopersicum* cv. Amateur) a) příklad membrány po detekci GSNOR metodou Western blot - nadzemní část *S. lycopersicum* cv. Amateur, b) vyhodnocení detekce GSNOR v nadzemní části rostlin metodou Western blot. Rekombinantní GSNOR je z *Brassica oleracea*, koncentrace proteinu v jamce byla 32 $\mu\text{g/ml}$.

5. Závěr

Nejdůležitější výstupy z celé práce, zaměřené na otestování vlivu aplikace látek modulujících hladinu RNS na klíčení tří vybraných genotypů rajčete, jsou:

- V bazálním stavu (tj. bez aplikace modulátorů) má nejdelší kořeny a nadzemní části náchylný genotyp *S. lycopersicum* cv. Amateur v porovnání s dalšími dvěmi studovanými genotypy.
- Se zvyšující se koncentrací sloučeniny N6022 (inhibitor GSNOR) byl fluorescenční mikroskopii pozorován významný nárůst produkce NO v kořenové špičce rezistentního genotypu *S. habrochaites*.
- Pozitivní vliv na růst kořene všech tří genotypů *Solanum* spp. byl pozorován po aplikaci eATP, GSNO a N6022, naopak u všech genotypů *Solanum* spp. byl růst kořene v prostředí GSH a PTIO inhibován.
- Následně pomocí fluorescenční sondy DAF-FM DA byl fluorescenční mikroskopii zaznamenán nárůst hladiny NO v kořenových špičkách po aplikaci eATP, GSNO a inhibitoru GSNOR, naopak snížená produkce NO byla zaznamenána v přítomnosti GSH a lapače NO (PTIO).
- U genotypů vykazující rezistentní vlastnosti při napadení patogenem *O. neolycopersici* byl pozorován snížený nárůst délky kořene u rostlin rostoucích na médiu s chitosanem.
- V rámci pilotních experimentů byla detekována desetinásobně nižší aktivita GSNOR v kořeni v porovnání s nadzemní částí 9-ti denních rostlin tří genotypů *Solanum* spp.
- U genotypů *S. habrochaites* a *S. chmielewskii* byly pozorovány největší změny u GSNOR aktivity v kořenech při ošetření GSH. U genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur byla změna aktivity GSNOR sledována u rostlin po aplikaci PTIO a ATP.
- V nadzemních částech byla detekována GSNOR ve všech genotypech metodou Western blot. Nejvyšší intenzita signálu byla u *S. lycopersicum* cv. Amateur.
- Závěrem lze říci, že byla potvrzena významná role NO v procesu klíčení a pilotní experimenty poukázaly na roli GSNOR ve vývoji kořene rostlin.

6. Literatura

- Achkor H., Díaz M., Fernández M. R., Biosca J. A., Parés X., Martínez M. C. (2003): Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**, 2248 – 2255.
- Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357**, 593 – 615.
- Altug S., Demiryurek A. T., Cakici I., Kanzik I. (1999): The beneficial effects of peroxynitrite on ischaemia – reperfusion arrhythmias in rat isolated hearts. *European Journal of Pharmacology* **384**, 157 – 162.
- Airaki M., Leterrier M., Mateos R. M., Valderrama R., Chaki M., Barroso J. B., Del Río L. A., Palma J. M., Corpas F. J. (2012): Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum Annuum L.*) plants under low temperature stress. *Plant Cell and Environment* **35**, 281 – 295.
- Ammar W. B., Mediouni C., Tray B., Ghorbel M. H., Jemal F. (2008): Glutathione and phytochelatin contents in tomato plants exposed to cadmium. *Biologia Plantarum* **52**, 314 – 320.
- Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Panos I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras A. (2009): Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology* **3**, 203 – 230.
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J. (2011): Understanding the fate of peroxynitrite in plant cells – from physiology to pathophysiology. *Phytochemistry* **72**, 681 – 688.
- Arc E., Galland M., Godin B., Gwendal G., Rajjou L. (2013): Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. *Frontier in Plant Science* **4**, 346 – 358.
- Bailly C. (2004): Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* **14**, 93 – 107.
- Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H., Corbineau F. (2008): From intracellular signaling networks to cell death: the role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 806 – 814.
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Sandalio L. M., Valderrama R., Palma J. M., Lupianez J. A., del Río L. A. (1999): Localization of nitric - oxide synthase in plant peroxisomes. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 36729 – 36733.
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Rodriguez-Serrano M., Esteban F. J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M. C., Valderrama R., Sandalio L. M., Del Río L. A. (2006): Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of experimental Botany* **57**, 1785 – 1793.
- Batak I., Devic M., Gibal Z., Grubišić D., Poff K. L., Konjevic R. (2002): The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A and phytochrome B – specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Seed Science Research* **12**, 253 – 259.
- Beligni M. V., Lamattina L. (2000): Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**, 215 – 221.

- Beligni M. V., Fath A., Bethke P. C., Lamattina L., Jones R. L. (2002): Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiology* **129**, 1642 – 1650.
- Benhar M., Forrester M. T., Stamler J. S. (2009): Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Molecular Cell Biology* **10**, 721 – 732.
- Bethke P. C., Badger M. R., Jones R. L. (2004a): Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**, 332 – 341.
- Bethke P. C., Gubler F., Jacobsen J. V., Jones R. L. (2004b): Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* **219**, 847 – 855.
- Bethke P. C., Libourel I. G., Reinohl V., Jones R. L. (2006): Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* **223**, 805 – 812.
- Bodin P., Burnstock G. (2001): Purinergic signalling: ATP release. *Neurochemical Research* **26**, 959 – 969.
- Boonlertnirun S., Sarobol E., Sooksathan B. (2005): Studies on chitosan concentration and frequency of foliar application on rice yield potential cv. Suphunburi 1. 31st Congress on Science and Technology of Thailand, *Suranaree University of Technology*, pp 40-44.
- Bright J., Desikan R., Hancock J. T., Weir I. S., Neill S. J. (2006): ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal* **45**, 113 – 122.
- Broniowska K. A., Diers A. R., Hogg N. (2013): S-nitrosoglutathione. *Biochimica et Biophysica Acta* **1830**, 3173 – 3181.
- Carver J., Doctor A., Zaman K., Gaston B. (2005): S-nitrosothiol formation. *Methods in Enzymology* **396**, 95 – 105.
- Clark G., Roux S. J. (2009): Extracellular nucleotides: ancient signaling molecules. *Plant Science* **177**, 239 – 244.
- Cooney R. V., Harwood P. J., Custer L. J., Franke A. A. (1994): Light-mediated conversion of nitrogen - dioxide to nitric-oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives* **102**, 460 – 462.
- Corpas F. J., Del Rio L. A., Barroso J. B. (2008a): Post-translational modifications mediated by reactive nitrogen species: nitrosative stress responses or components of signal transduction pathways? *Plant Signaling Behavior* **3**, 301 – 303.
- Corpas F. J., Chaki M., Fernández-Ocaña A., Valderrama R., Palma J. M., Carreras A., Begara-Morales J. C., Airaki M., del Río L. A., Barroso J. B. (2008b): Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1711 – 1722.
- Corpas F. J., Alché J. D., Barroso J. B. (2013): Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in Plant Science* **4**, 126 – 128.
- Correa-Aragunde, Graziano C. M., Lamattina L. (2004): Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**, 900 – 905.
- Crawford N. M., Galli M., Tischner R., Heimer Y. M., Okamoto M., Mack A. (2006): Response to Zmojtel *et al.*: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Science* **11**, 526.

- DalCorso G., Farinati S., Maistri S., Furini A. (2008): How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Interfrative Plant* **50**, 1268 – 1280.
- Demidchik V., Nichols Ch., Oliynyk M., Dark M., Dark A., Glover B. J., Davies J. M. (2003): Is ATP a signaling agent in plants? *Plant Physiology* **133**, 456 – 461.
- Demidchik V., Shang Z. L., Shin R., Thompson E., Rubio L., Laohavisit A., Mortimer J. C., Chivasa S., Slabas A. R., Glover B. J., Schachtman D. P., Shabala S. N., Davies J. M. (2009): Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca²⁺ channels. *Plant Journal* **58**, 903 – 913.
- Del Rio L. A., Corpas F. J., Sandalio L. M., Palma J. M., Barroso J. B. (2003): Plant Peroxisomes, Reactive Oxygen Metabolism and Nitric Oxide. *IUBMB Life* **55**, 71 – 81.
- DeRidder B. P., Goldsbrough P. B. (2006): Organ-specific expression of glutathione S -transferases and the efficacy of herbicides afeners in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **140**, 167 – 175.
- Díaz M., Achkor H., Titarenko E., Martínez M. C. (2003): The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Lett* **543**, 136 – 139.
- Dixon D. P., Skipsey M., Grundy N. M., Edwards R. (2005): Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **138**, 2233 – 2244.
- Di Virgilio F. (2007): Liaisons dangereuses: P2X7 and the inflammasome. *Trends Pharmacology Science* **28**, 465 – 472.
- Dutta A. K., Okada Y., Sabirov R. Z. (2002): Regulation of an ATP-conductive large conductance anion channel and swelling-induced ATP release by arachidonic acid. *Journal Physiology* **542**, 803 – 816.
- Edwards R., Brazier-Hicks M., Dixon D. P., Cummins I. (2005): Chemical manipulation of antioxidant defences in plants. *Advance in Botany Research* **42**, 1 – 32.
- El Msehli S., Lambert A., Baldacci-Cresp F., Hopkins J., Boncompagni E., Smiti S. A., Hérouart D., Frendo P. (2011): Crucial role of (homo)glutathione in nitrogen fixation in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytologist* **192**, 496 – 506.
- Engeland K., Höög J. O., Holmquist B., Estonius M., Jörnvall H., Vallee B. L. (1993): Mutation of Arg-115 of human class III alcohol dehydrogenase: a binding site required for formaldehyde dehydrogenase activity and fatty acid activation. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **90**, 2491 – 2494.
- Espunya M. C., Díaz M., Moreno-Romero J., Martínez M. C. (2006): Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell Environmental* **29**, 1002 – 1011.
- Fernández-Marcos M., Snaz L., Lorenzo O. (2012): Nitric oxide An emerging regulator of cell elongation during primary root growth. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 196 – 200.
- Fernández- Marcos M., Sanz L., Lewis D. R., Muday G. K., Lorenzo O. (2013): Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **108**, 18506 – 18511.

- Foresi N. P., Laxalt A. M., Tonón C. V., Casalongue C. A., Lamattina L. (2007): Extracellular ATP induces nitric oxide production in tomato cell suspensions. *Plant Physiology* **145**, 589 – 592.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina L. (2010): Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* **22**, 3816 – 3830.
- Foyer C. H., Noctor G. (2009): Redox regulation and photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling* **11**, 861 – 905.
- Frein D., Schildknecht S., Bachschmid M., Ullrich V. (2005): Redox regulation: A new challenge for pharmacology. *Biochemical Pharmacology* **70**, 811 – 823.
- Fröhlich A., Durner J. (2011) The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): Is one really needed? *Plant Science* **181**, 401 – 404.
- Gamborf O. L., Eveleigh D. E. (1968): CULTURE METHODS AND DETECTION OF GLUCANASES IN SUSPENSION CULTURES OF WHEAT AND BARLEY. *Canadian Journal of Biochemistry* **46**, 417.
- Gouvea C. M., Souza J. F., Magalhaes A. C., Martins I. S. (1997): NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* **21**, 183 – 187.
- Gow A. J., Buerk D. G., Ischiropoulos H. (1997): A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2841 – 2845.
- Gow A. J., Farkouh C. R., Munson D. A., Posencheg M. A., Ischiropoulos H. (2004): Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**, 262 – 268.
- Granato T. C., Raper C. D. (1989): Proliferation of maize (*Zea mays* L.) roots in response to localized supply of nitrate. *Journal of Experimental Botany* **40**, 263 – 275.
- Green L. S., Lawrence E. C., Patton A. K., Sun X., Rosenthal G. J., Richards J. P. (2012): Mechanism of Inhibition for N6022, a First-in-Class Drug Targeting S-Nitrosogluthathione Reductase. *Biochemistry* **51**, 2157 – 2168.
- Guan Y. J., Hu J., Wang X. J. Shao C. X. (2009): Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal of Zhejiang University-Science B* **10**, 427 – 433.
- Guo F. Q., Okamoto M., Crawford N. M. (2003): Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal. *Science* **302**, 100 – 103.
- Guo F. Q., Crawford N. M. (2005): *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and darkinduced senescence. *Plant Cell* **17**, 3436 – 3450.
- Guo F. Q. (2006): Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: AtNOS1 is just the beginning. *Trends Plant Science* **11**, 527.
- Gupta K. J., Stoimenova M., Kaiser W. M. (2005): In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2601 – 2609.

- Hadrami A. E., Adam L. R., Hadrami I. E., Daayf F. (2010): Chitosan in plant protection. *Marin Drugs* **8**, 968 – 987.
- Hedberg J. J., Griffiths W. J., Nilsson S. J. F., Höög J. O. (2003): Reduction of S-nitrosoglutathione by human alcohol dehydrogenase 3 is an irreversible reaction as analysed by electrospray mass. *European Journal of Biochemistry* **270**, 1249 – 1256.
- Helander I., Nurmiaho-Lassila E., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S. (2001): Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram - negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **71**, 235 – 244.
- Hess D. T., Stamler J. S. (2011): Regulation by S-nitrosylation of protein posttranslational modification. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 4411 – 4418.
- Hilhorst H. W., Karssen C. M. (1988): Dual effect of light on the gibberellin-and nitrate-stimulated seed germination of *Sisymbrium officinale* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **86**, 591 – 597.
- Hill B. G., Dranka B. P., Bailey S. M., Lancaster J. R., Darley-Usmar V. M. (2010): What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *The Journal of biological chemistry* **285**, 19699 – 19704.
- Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2009): Nitrate proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické listy* **103**, 788 – 794.
- Hu X., Neill S. J., Tang Z., Cai W. (2005): Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology* **137**, 663 – 670.
- Huang J., Kim-Shapiro D. B., King S. B. (2004): Catalase-mediated nitric oxide formation from hydroxyurea. *Journal of Medicinal Chemistry* **47**, 3495 – 3501.
- Hurd T. R., Filipovska A., Costa N. J., Dahm C. C., Murphy M. P. (2005a): Disulphide formation in mitochondrial protein thiols. *Biochemical Society Transactions* **33**, 1390 – 1393.
- Hurd T. R., Costa N. J., Dahm C. C., Beer S. M., Brown S. T., Filipovska A., Murphy M. P. (2005b): Glutathionylation of mitochondrial proteins. *Antioxidants and Redox Signaling* **7**, 999 – 1010.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A. M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M. V., Pedrajas J. R., Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F. J., Barroso J. B. (2011): Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1803 – 1813.
- Chen R., Sun S., Wang C., Li Y., Liang Y., An F. (2009): The *Arabidopsis* PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Research* **19**, 1377 – 1387.
- Chirkov S. N. (2002): The antiviral activity of chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology* **38**, 1 – 8.
- Chivasa S., Ndimba B. K., Simon W. J., Lindsey K., Slabas A. R. (2005): Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability. *Plant Cell* **17**, 3019 – 3034.
- Chivasa S., Murphy A. M., Hamilton J. M., Lindsey K., Carr J. P., Slabas A. R. (2009): Extracellular ATP is a regulator of pathogen defence in plants. *Plant Journal* **60**, 436 – 448.

- Ischiropoulos H. (2003): Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**, 776 – 783.
- Janssen Y. M. W., Soultanakus R., Steece K., Heerdt E., Singh R. J., Joseph J., Kalyanaraman B. (1998): Depletion of nitric oxide causes cell cycle alterations, apoptosis, and oxidative stresses in pulmonary cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **19**, L1100 – L1109.
- 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.
- Jeter C. R., Tang W. Q., Hanaff E., Butterfield T., Roux S. J. (2004): Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2652 – 2664.
- Jia Z., Shen D., Xu W. (2001): Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Research* **333**, 1 – 6.
- Kavya R., Saluja R., Singh S., Dikshit M. (2006): Nitric oxide synthase regulation and diversity: Implications in Parkinson's disease. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **15**, 280 – 294.
- Khakh B. S., Burnstock G. (2009): The double life of ATP. *Scientific American* **301**, 84 – 92.
- Kim S. Y., Sivaguru M., Stacey G. (2006): Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiol.* **142**, 984 – 992.
- Kim S. H., Kim T. J., Han J. S., Suh J. W. (2009): Hypertonic stress increased extracellular ATP levels and the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **73**, 1252 – 1256.
- Kojima H., Hirotsu M., Nakatsubo N., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T. (2001): Bioimaging of nitric oxide with fluorescent indicators based on the rhodamine chromophore. *Analytical Chemistry* **73**, 1967 – 1973.
- Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Nagano T. (1998): Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry* **70**, 2446 – 2453.
- Kone B. C., Kuncewicz T., Zhang W., Yu Z. Y. (2003): Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **285**, F178 – F190.
- Kranner I., Beckett R. P., Wornik S., Zorn M., Pfeifhofer H. W. (2002): Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *Plant Journal* **31**, 13 – 24.
- Kranner I., Birtic S., Anderson K. M., Pritchard H. W. (2006): Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death. *Free Radical Biology and Medicine* **40**, 2155 – 2165.
- Kranner I., Minibayeva F. V., Beckett R. P., Seal C. E. (2010): What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytology* **188**, 655 – 673.
- Krouk G., Crawford N. M., Coruzzi G. M., Tsay Y. F. (2010): Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 266 – 273.

- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tache R., Luhová L., Barroso J. B., Petřivalský M. (2013a): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosogluthione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889 – 902.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2013b): S-nitrosogluthionreduktasa: Klíčový enzym regulace S-nitrosylace. *Chemické listy* **107**, 202 – 208.
- Kubienová L. (2013c): Studium produkce reaktivních forem dusíku a enzymů jejich metabolismu u rostlin. UP v Olomouci, *Disertační práce*, 11.
- Kulikov S. N., Chirkov S. N., Il'ina A. V., Lopatin S. A., Varlamov V. P. (2006): Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia* **42**, 224 – 228.
- Lafontaine J. P., Benhamou N. (1996): Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium oxysporum* sp. *radicis-lycopersici*. *Biocontrol Science and Technology* **6**, 111-124.
- Lamb C., Dixon R. A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 251 – 275.
- Lanteri M. L., Laxalt A. M., Lamattina L. (2008): Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *Plant Physiology* **147**, 188 – 198.
- Lazarowski E. R., Boucher R. C., Harden T. K. (2003): Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Molecular Pharmacology* **64**, 785 – 795.
- Lee U., Wie C., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E. (2008): Modulation of nitrosative stress by S-nitrosogluthione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 786 – 802.
- Leitner M., Vandelle E., Gaupels F., Bellin D., Delledonne M. (2009): NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Current Opinion of Plant Biology* **12**, 451 – 458.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J. M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2011): Function of S-nitrosogluthione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 789 – 793.
- Leterrier M., Airaki M., Palma J. M., Chaki M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2012): Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosogluthione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environmental Pollution* **166**, 136 – 143.
- Lew R. R., Dearnaley J. D. (2000): Extracellular nucleotide effects on electrical properties of growing *Arabidopsis thaliana* root hairs. *Plant Science* **153**, 1 – 6.
- Leymarie J., Vitkauskaitė G., Hoang H. H., Gendreau E., Chazoule V., Meimoun P., Corbineau F., El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C. (2012): Role of reactiveoxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. *Plant Cell Physiology* **53**, 96 – 106.
- Liaudet L., Vassalli G., Pacher P. (2009): Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Frontiersin Bioscience* **14**, 4809 – 4814.

- Libourel I. G., Bethke P. C., DeMichele R., Jones R. L. (2006): Nitric oxide gas stimulates germination of dormant *Arabidopsis* seeds: Use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. *Planta* **223**, 813 – 820.
- Linkohr B. I., Williamson L. C., Fitter H. A., Leyser H. M. O. (2002): Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **29**, 751 – 760.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J. S. (2001): A metabolite enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490 – 494.
- Liu H. Y., Yu X., Cui D. Y., Sun M. H., Sun W. N., Tang Z. C. (2007): The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. *Cell Research* **17**, 638 – 649.
- Liu Y., Shi L., Ye N., Liu R., Jia W., Zhang J. (2009): Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **183**, 1030 – 1042.
- Liu Y., Ye N., Liu R., Chen M., Zhang J. (2010): H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2979 – 2990.
- Lombardo M. C., Graziano M., Polacco J. C., Lamattina L. (2006): Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signaling and Behaviour* **1**, 28 – 33.
- Lustig K. D., Shiau A. K., Brake A. J., Julius D. (1993): Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **90**, 5113–5117.
- Malik S. I., Hussain A., Yun B. W., Spoel S. H., Loake G. J. (2011): GSNOR-mediated de-nitrosylation in the plant defence response. *Plant Science* **181**, 540 – 544.
- Martínez M. C., Achkor H., Persson B., Fernández M. R., Shafqat J., Farrés J., Jörnvall H., Parés X. (1996): *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase - Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class P and liver class I alcohol dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry* **241**, 849 – 857.
- Mlíčková K., Luhová L., Lebeda A., Mieslerova B., Peč P. (2004): Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 753 – 761.
- Moore K. P., Mani A. R. (2002): Measurement of protein nitration and S-nitrosothiol formation in biology and medicine, in: Enrique Cadenas, Packer Lester (Eds.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, pp. 256 – 268.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assay with Tobago tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473 – 497.
- Muzzarelli R. A. A., Tarsi R., Filippini O., Giovanetti E., Biagini G., Varaldo P. E. (1990): Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **34**, 2019 – 2023.
- Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. (2008): Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **59**, 165 – 176.

- Nocito F. F., Espen L., Crema B., Cocucci M., Sacchi G. A. (2008): Cadmium induces acidosis in maize root cells. *New Phytologist* **179**, 700 – 711.
- 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 Environmental* **35**, 454 – 484.
- Pagnussat G. C., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L. (2002): Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* **129**, 954 – 956.
- Pagnussat G. C., Lanteri M. L., Lamattina L. (2003): Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology* **132**, 1241 – 1248.
- Park P. J., Je J. Y., Kim S. K. (2004): Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydrate Polymer* **55**, 17 – 22.
- Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008): Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chemické Listy* **102**, 410 – 416.
- Piterková J., Petřivalský M., Luhová L., Mieslerová B., Sedlářová M., Lebeda A. (2009): Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Molecular Plant Pathology* **10**, 501-513.
- Piterková J., Hofman J., Mieslerová B., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A., Petřivalský M. (2011): Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp. – *Oidium neolycopersici* interaction. *Environmental and Experimental Botany* **74**, 37 – 44.
- Planchet E., Gupta K. J., Sonoda M., Kaiser W. M. (2005): Nitric oxide emission from Tobago leaves and cell suspensions: rate lifting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electrontransport. *Plant Journal* **41**, 732 – 743.
- Pospieszny H., Chirkov S., Atabekov J. (1991): Induction of antiviral resistance in plants by chitosan. *Plant Science* **79**, 63 – 68.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998): Klíčení semen. Fyziologie stresu. Fyziologie rostlin. *Academia Praha*, pp. 348 – 351, 412 – 414.
- Queval G., Issakidis-Bourguet E., Hoerberichts F. A., Vandorpe M., Gakiere B., Vanacker H., Miginiac-Maslow M., Van Breusegem F., Noctor G. (2007): Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength dependent gene expression and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. *Plant Journal* **52**, 640 – 657.
- Rabea E. I., El Badawy M. T., Stevens C. V., Smagghe G., Steurbaut W. (2003): Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* **4**, 1457 – 1465.
- Reddy M. V., Arul K., Angers P., Couture L. (1999): Chitosan treatment of beat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **47**, 1208 – 1216.
- Reichler, S. A., Torres J., Rivera A. L., Cintolesi V. A., Clark G., Roux S. J. (2009): Intersection of two signalling pathways: extracellular nucleotides regulate pollen germination and pollen tube growth via nitric oxide. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2129 – 2138.

- Reumann S., Babujee L., Ma C., Wienkoop S., Siemsen T., Antonicelli G. E., Rasche N., Luder F., Weckwerth W., Jahn O. (2007): Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolite pathways and defense mechanisms. *Plant Cell* **19**, 3170 – 3193.
- Reynaert N. L., Ckless K., Korn S. H., Vos N., Guala A. S., Wouters E. F., van der Vliet A., Janssen-Heininger Y. M. (2004): Nitric oxide represses inhibitory κ B kinase through S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **101**, 8945 – 8950.
- Riewe D., Grosman L., Fernie A. R., Wucke C., Geigenberger P. (2008): The potato-specific apyrase is apoplastically localized and has influence on gene expression, growth, and development. *Plant Physiology* **147**, 1092 – 1109.
- Rubbo H., Radi R. (2008): Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochimica et Biophysica Acta-general Subject* **1780**, 1318 – 1324.
- Rusterucci C., Espunya M. C., Diaz M., Chabannes M., Martinez M. C. (2007): S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology* **143**, 1282 – 1292.
- Sanghani P. C., Robinson H., Bosron W. F., Hurley T. D. (2002): Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of Apo, Binary, and inhibitory ternary complexes. *Biochemistry* **41**, 10778 – 10786.
- Sanghani P. C., Robinson H., Bennett-Lovsey R., Hurley T. D., Bosron W. F. (2003a): Structure-function relationships in human Class III alcohol dehydrogenase (formaldehyde dehydrogenase). *Chemico-Biological Interactions* **143**, 195 – 200.
- Sanghani P. C., Bosron W. F., Hurley T. D. (2003b): Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structural changes associated with ternary complex formation. *Biochemistry* **41**, 15189 – 15194.
- Sanghani P. C., Davis W. I., Fears S. L., Green S. L., Zhai L., Tang Y., Martin E., Bryan N. S., Sanghani S. P. (2009): Kinetic and cellular characterization of novel inhibitors of S-nitrosoglutathione reductase. *J. Biol. Chem.* **284**, 24354 – 24362.
- Savard T., Beaulieu C., Boucher I., Champagne C. P. (2002): Antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables. *Journal of Food Protection* **65**, 828 – 833.
- Semchuk N. M., Vasylyk 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*. *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal* **83**, 69 – 79.
- Simpson G. G. (2005): NO flowering. *Bioessays* **27**, 239 – 241.
- Song, C. J., Steinebrunner I., Wang X. Z., Stout S. C., Roux S. J. (2006): Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **140**, 1222 – 1232.
- Souza J. M., Peluffo G., Radi R. (2008): Protein tyrosine nitration - functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 357 – 366.

- Staab C. A., Alander J., Brandt M., Lengqvist J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög 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., Hellgren M., Höög 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.
- Staab C. A., Alander J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2009): The Janus face of alcohol dehydrogenase 3. *Chemico-Biological Interactions* **178**, 29 – 35.
- Stamler J. S., Jaraki O., Osborne J., Simon D. I., Keaney J., Vita J., Singel D., Valeri C. R., Loscalzo J. (1992): Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **89**, 7674 – 7677.
- Stohr C., Ullrich W. R. (2002): Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplasmic space. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2293 – 2303.
- Sun X., Wasley J. W., Qiu J., Blonder J. P., Stout A. M., Green L. S., Strong S. A., Colagiovanni D. B., Richards J. P., Mutka S. C., Chun L., Rosenthal G. J. (2011): Discovery of S-nitrosoglutathione reductase inhibitors: Potential agents for the treatment of asthma and other inflammatory diseases. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2**, 5849 – 5853.
- Szarka A., Tomasskovic B., Bánhegyi G. (2012): The Ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 4458 – 4483.
- Šírová J., Sedlářová M., Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2011): The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Science* **181**, 560 – 572.
- Tanaka K., Gilroy S., Jones A. M., Stacey G. (2011): Extracellular ATP signaling in plants. *Trends in Cell Biology* **20**, 601 – 608.
- Tang W., Brady S. R., Sun Y., Muday G. K., Roux S. J. (2003): Extracellular ATP inhibits root gravitropism at concentrations that inhibit polar auxin transport. *Plant Physiology* **131**, 147 – 154.
- Thomas C., Rajagopal A., Windsor B., Dudler R., Lloyd A., Roux S. J. (2000): A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance. *Plant Cell* **12**, 519 – 533.
- Thomas D. D., Liu Z. P., Kantrow S. P., Lancaster J. R. (2001): The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **98**, 355 – 360.
- Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P., Lebeda A. (2006): Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiology of Molecular Plant Pathology* **68**, 22 – 32.
- Tonon C., Terrile M. C., Iglesias M. J., Lamattina L., Casalongue C. (2010): Extracellular ATP, nitric oxide and superoxide act coordinately to regulate hypocotyl growth in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Physiology* **167**, 540 – 546.
- Tuteja N., Chandra M., Tuteja R., Misra M. K. (2004): Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **4**, 227 – 237.

- Vernoux T., Wilson R. C., Seeley K. A., Reichheld J. P., Muroy S., Brown S., Maughan S. C., Cobbett C. S., Vanontagu M., Inzé D., May M. J., Sung Z. R. (2000): The root meristemless1/cadmum sensitive Gene Defines a Glutathione-Dependent Pathway Involved in Initiation and Maintenance of Cell Division during Postembryonic Root Development. *Plant Cell* **12**, 97 – 109.
- Wang Y. Q., Yun B. W., Kwon E., Hong J. K., Yoon J., Loake G. J. (2006): S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1777 – 1784.
- Wang P., Du Y., Li Y., Ren D., Song Ch. (2010): Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**, 2981 – 2998.
- Weerasinghe R. R., Swanson S. J., Okada S. F., Garrett M. B., Kim S. Y., Stacey G., Boucher R. C., Gilroy S., Jones A. M. (2009): Touch induces ATP release in *Arabidopsis* roots that is modulated by the heterotrimeric G-protein complex. *FEBS Letters* **583**, 2521 – 2526.
- Weitzberg E., Hezel M., Lundberg J. O. (2010): Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway Implications for Anesthesiology and Intensive Care. *Anesthesiology* **113**, 1460 – 1475.
- Williams D. H. (1999): The Chemistry of S-nitrosothiols. *Accounts of Chemical Research* **32**, 869 – 876.
- White P. J., Charbonneau A., Cooney G. J., Marette A. (2010): Nitrosative modifications of protein and lipid signaling molecules by reactive nitrogen species. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **299**, 868 – 878.
- Wu S. J., Liu Y. S., Wu J. Y. (2008a): The signaling role of extracellular ATP and its dependence on Ca²⁺ flux in elicitation of *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Plant and Cell Physiology* **49**, 617 – 624.
- Wu S. J., Wu J. Y. (2008b): Extracellular ATP-induced NO production and its dependence on membrane Ca²⁺ flux in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Journal of Experimental Botany* **59**, 4007 – 4016.
- Xie W., Xu P., Liu Q. (2001): Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **11**, 1699 – 1701.
- Yamasaki H. (2000): Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo*. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **355**, 1477 – 1488.
- Yamasaki H., Sakihama Y. (2000): Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* **468**, 89 – 92.
- Yoshida M., Akaike T., Wada Y., Sato K., Ikeda K., Ueda S., Maeda H. (1994): Therapeutic effects of imidazolineoxyl N-oxide against endotoxin-shock through its direct nitric oxide-scavenging activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **202**, 923 – 930.
- Zago E., Morsa S., Dat J. F., Alard P., Ferrarini A., Inzé D., Delledonne M., Van Breusegem F. (2006): Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiology* **141**, 404 – 411.

- Zandonadi D. B., Santos M. P., Dobbss L. B., Olivares F. L., Canellas L. P., Binzel M. L., Okorokova-Facanha A. L., Facanha A. R. (2010): Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta* 231, 1026 – 1035.
- Zaninotto F., La Camera S., Polverari A., Delledonne M. (2006): Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiology* **141**, 379 – 383.
- Zawoznik M. S., Groppa M. D., Tomaro M. L., Benavides M. P. (2007): Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 2007 **173**, 190 – 197.
- Zemojtel T., Frohlich A., Palmieri M. C., Kolanczyk M., Mikula I., Wyrwicz L. S., Wanker E. E., Mundlos S., Vingron M., Martasek P., Durner J. (2006): Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends in Plant Science* **11**, 524 – 525.
- Zechmann B., Müller M. (2010): Subcellular compartmentation of glutathione in dicotyledonous plants. *Protoplasma* **246**, 15 – 24.
- Zechmann B., Koffler B. E., Russell S. D. (2011): Glutathione synthesis Essentials for pollen germination in vitro. *BMC Plant Biology* **11**: 54.
- Zhang H., Forde B. G. (1998): An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**, 407 – 409.
- Zhang Z., Naughton D., Winyard P. G., Benjamin N., Blake D. R., Symons M. C. (1998): Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: A potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. *Biochemical and Biophysical Research* **249**, 767 – 772.
- Zhang H., Forde B. G. (1999): Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.*, 6529 – 6534.
- Zhang D., Tian Q., Li L., Zhang W. (2007): Nitric oxide is involved in nitrate-induced inhibition of rooz elongation in *Zea mays*. *Annals of Botany* **100**, 497 – 503.
- Zhou Y. G., Yang Y. D., Qi Y. G., Zhang Z. M., Wang X. J., Hu X. J. (2002): Effects of chitosan on some physiological activity in germinating seed of peanut. *Journal of Peanut Science* **31**, 22 – 25.

7. Seznam použitých zkratek

AA/BIS	akrylamid- <i>N,N</i> -bisakrylamid
Ab	protilátka
ABA	kyselina abscisová
ADH (1,3)	alkoholdehydrogenasa (třídy 1,3)
anti-GSNO	protilátka proti GSNO
APS	persíran amonný
AP	alkalická fosfatasa
BSA	hovězí sérový albumin
CcOx	cytochrom <i>c</i> oxidasa
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
cPTIO	karboxy-PTIO;2-(4-karboxyfenyl)- 4,4,5,5,tetramethylimindezin-1-oxy-3-oxid
DAF-FM	diaminofluorescein
DAR-4M	diaminorhodoamin
DAF-2DA	DAF diacetát
DAF-4MAM	DAR-4M acetoxymethylester
DTT	dithiotreitol
eATP	extracelulární adenosintrifosfát
eNOS	endotelová synthasa NO
FAD	oxidovaný flavinadenindinukleotid
FALDH	glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
FMN	flavinmononukleotid
GA (s)	giberelin (y)
GSH	glutathion
GSSH	oxidovaný glutathion
GSNHOH	S-hydroxylaminoglutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSO ₂ H	kyselina sulfinová
GSO ₃ H	kyselina sulfonová
GSONH ₂	glutathion-sulfinamid

GSSG	glutathion-disulfid
GTP	guanisintrifosfát
GlyCyGSNO	S-nitrosocysteinyglycin
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
hGSH	homoglutathion
hGSNOR	lidská S-nitrosoglutathionreduktasa
HMGS	S-(hydroxymethyl)glutathion
HNO ₂	kyselina dusitá
MPK6	mitogen aktivovaná proteinkinasa 6
iNOS	inbiculní synthasa NO
N ₂ O	oxid dusný
N ₂ O ₃	oxid dusičitý
NAD ⁺	oxidovaný nikotinamidadeninukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfat
NBT-BCIP	nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfatem
NH ₂ OH	hydroxylamin
Ni-NOR	nitrit:NO oxidoreduktasa
nNOS	neuronová synthasa NO
NO ⁻	nabitý nitroxyl
NO	oxid dusnatý
NO ⁺	nitrosionový ion
NO ₂ ⁻	dusitanový anion, nitrit
NO ₂ ·	radikál oxidu dusičitého
NO ₂ Cl	nitrylchlorid
NO ₃ ⁻	dusičnanový anion, nitrát
NOS	NO-synthasa
NR	nitrátoreduktasa
nSHb	nesymbiotické hemoglobiny
O ₂ ⁻	superoxidový anion
O ₂ ⁻ ·	superoxidový radikál
O ₂ NOO ⁻	peroxynitrát

ONOO ⁻	peroxynitrit
ONOOCO ₂ ⁻	nitrosoperoxokarbonát
PLC	fosfolipasa C
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
Prx	peroxiredoxiny
PTIO	2-fenyl-4,4,5,5,-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxid
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RS ·	thiylový radikál
RSNO(s)	S-nitrosothiol(y)
SA	kyselina salicylová
sGC	solubilní guanylátcyklasa
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamin
SNP	nitroprussid sodný
TBS	fyzilogický roztok pufrovaný Tris
TEMED	tetramethylendiamin
UV	ultrafialové záření
XOD	xanthinoxidasa