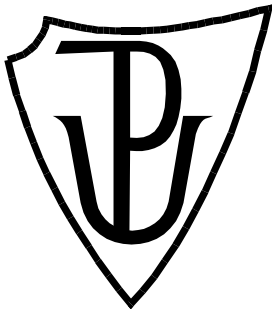
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium enzymů s diaminooxidasovou a aminoaldehyddehydrogenasovou aktivitou v reakci na teplotní stres hrachu setého (*Pisum sativum*)

Autor:	**Bc. Jana Štanclová**
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.**
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové 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 ..... *podpis diplomanta*

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí své diplomové práce doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za veškerou spolupráci, ochotu, pomoc a cenné rady při řešení dané problematiky. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Jahnové, Mgr. Tereze Tiché, Ph.D. a Mgr. Janě Sekaninové, Ph.D. za odborné konzultace a pomoc při vypracování experimentální části. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé katedře Biochemie za přátelský přístup, vstřícnost a ochotu. Zvláštní poděkování patří mé rodině za velkou podporu po celou dobu mého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jana Štanclová
Název práce	Studium enzymů s diaminooxidasovou a aminoaldehyddehydrogenasovou aktivitou v reakci na teplotní stres hrachu setého (*Pisum sativum*)
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

V rámci obranné reakce na teplotní stres (TS) se zvyšuje produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), exprese heat shock proteinů (Hsp) a aktivita antioxidačních enzymů eliminujících ROS. Nezastupitelnou roli v obranných mechanismech mají polyaminy (PA). Klíčovou roli v katabolismu PA hrají aminoxidasy - polyaminoxidasy (PAO), diaminoxidasy (DAO) a aminoaldehydehydrogenasy (AMADH).

Cílem diplomové práce bylo sledovat možné zapojení AMADH a DAO v obranných reakcích rostlin na působení krátkodobého (2 h při 45 °C) a dlouhodobého (45 °C) TS a možnost regulace jejich aktivity S-nitrosylací v důsledku zvýšené produkce oxidu dusnatého. Studie byla realizována na dvou kultivarech hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset) s rozdílnou odolností vůči patogenním organismům. U hrachu setého kultivar Twinset (odolný na patogeny) na rozdíl od kultivaru Kudrnáč (citlivý) v reakci na krátkodobý TS byla zaznamenána aktivace obranných mechanismů, tj. zvýšená aktivita askorbátperoxidasy, produkce Hsp, zvýšená aktivita AMADH vedoucí k produkci γ-aminomáselné kyseliny (GABA). V reakci na TS byla prokázaná zvýšená produkce ROS a RNS u obou kultivarů hrachu setého. Výsledky experimentů s dithiotreitolem a korelace detekované hladiny S-nitrosylovaných proteinů se změnami v aktivitách AMADH v důsledku krátkodobého TS poukazují na možnost regulace aktivity AMADH S-nitrosylací. Toto tvrzení je nutné následně dále prokázat např. metodou biotin switch.

Klíčová slova	Aminoaldehyddehydrogenasa, diaminoxidasa, heat shock proteiny, hrách setý, polyaminy, reaktivní formy dusíku, reaktivní formy kyslíku, teplotní stres
Počet stran	93
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Jana Štanclová
Title	Study of enzymes with diaminooxidase and aminoaldehyde dehydrogenase activity in response to the temperature stress of pea (*Pisum sativum*)
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

As a response to temperature stress (TS), the production of reactive oxygen or nitrogen species (ROS, RNS), heat shock protein (Hsp) expression, and the activity of antioxidant enzymes are increasing. Polyamines (PA) play an irreplaceable role in defense mechanisms. Amine oxidases - polyamine oxidases (PAO), diamine oxidases (DAO) and aminoaldehyde dehydrogenases (AMADH) play a key role in the catabolism of PA.

The aim of the thesis was to study the possible involvement of AMADH and DAO in plant defense responses to the short-term (2 h at 45 °C) or long-term (45 °C during whole experiment) TS and regulation their activity by S-nitrosylation due to increased nitric oxide production. For experiments, two cultivars of pea (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč and *Pisum sativum* cv. Twinset) with different pathogen resistance, were used. In response to short-term TS, pathogen-resistant cultivar Twinset has been shown to activate defence mechanisms, ie increased ascorbate peroxidase activity, Hsp production, increased AMADH activity leading to production of γ-aminobutyric acid (GABA). In response to TS, increased production of ROS and RNS has been demonstrated in both pea cultivars. Results of experiments with dithiotreitol showed a correlation between detected levels of S-nitrosylated proteins and changes in AMADH activity indicating the possibility of regulation of AMADH activity by S-nitrosylation during short-term TS. This statement must then be further demonstrated, for example, by the biotin switch method.

Keywords	Aminoaldehyde dehydrogenase, diamine oxidase, heat shock proteins, pea, polyamines, reactive nitrogen species, reactive oxygen species, temperatures stress
Number of pages	93
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD 1

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 3
2.1 Obranné reakce u rostlin vystavených teplotnímu stresu 3
2.1.1 Heat shock proteiny 4
2.1.2 Reaktivní formy kyslíku 10
2.1.2.1 Produkce reaktivních forem kyslíku 11
2.1.2.2 Enzymy podílející se na regulaci oxidačního stresu 14
2.1.3 Reaktivní formy dusíku 17
2.1.3.1 Enzymy podílející se na regulaci nitrosačního stresu 19
2.1.4 Úloha reaktivních forem kyslíku v obranných mechanismech rostlin v reakci na teplotní stres 21
2.1.5 Úloha reaktivních forem dusíku v obranných mechanismech rostlin v reakci na teplotní stres 25
2.1.6 Úloha polyaminů v obranných mechanismech rostlin v reakci na abiotický stres 28
2.1.6.1 Biosyntéza polyaminů 29
2.1.7 Enzymy podílející se na regulaci hladiny polyaminů a aminoaldehydů 30
2.1.7.1 Aminoxidasy 30
2.1.7.2 Aminoaldehyddehydrogenasa 32

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 34
3.1 Materiál 34
3.1.1 Biologický materiál 34
3.1.2 Chemikálie 34
3.1.3 Přístroje a zařízení 35
3.2 Metody 35
3.2.1 Příprava rostlinného materiálu 35
3.2.2 Zpracování rostlinného materiálu 37
3.2.3 Histochemická detekce reaktivních forem dusíku a kyslíku využitím fluorescenčních sond 37
3.2.4 Spektrofotometrické stanovení proteinových S-nitrosothiolů 38
3.2.5 Detekce aminoaldehyddehydrogenasy metodou Western blot 39
3.2.6 Detekce heat shock proteinů 70 metodou Western blot 41
3.2.7 Stanovení aktivity aminoaldehyddehydrogenasy 41
3.2.8 Stanovení aktivity diaminoxidasy 42
3.2.9 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy 42
3.2.10 Stanovení proteinů metodou Bradforda 43

4 VÝSLEDKY 44
4.1 Mikroskopická detekce reaktivních forem dusíku a kyslíku 45
4.1.1 Stanovení produkce reaktivních forem dusíku 45
4.1.2 Stanovení produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku 47

4.2 Stanovení S-nitrosothiolů Savillovou metodou 48
4.3 Regulace aktivity aminoaldehyddehydrogenasy v reakci na teplotní stres u hrachu setého 50
4.3.1 Aktivita aminoaldehyddehydrogenasy u hrachu setého kultivaru Kudrnáč a Twinset 50
4.3.2 Vliv teplotního stresu na aktivitu aminoaldehyddehydrogenasy 51
4.4 Detekce aminoaldehyddehydrogenasy metodou Western blot 53
4.5 Vliv dithiothreitolu na aktivitu aminoaldehyddehydrogenasy 55
4.6 Regulace aktivity diaminoxidasy v reakci na teplotní stres u hrachu setého 57
4.6.1 Aktivita diaminoxidasy u hrachu setého kultivaru Kudrnáč a Twinset 57
4.6.2 Vliv teplotního stresu na aktivitu diaminoxidasy 58
4.7 Vliv teplotního stresu na aktivitu askorbátperoxidasy 60
4.8 Detekce heat shock proteinů 70 metodou Western blot 61

5 DISKUZE 63

6 ZÁVĚR 74

7 LITERATURA 76

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 88

CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo v teoretické části vypracovat literární rešerši zaměřenou na charakterizaci:

1. obranných reakcí při abiotickém stresu se zaměřením na teplotní stres;
2. úlohy reaktivních forem dusíku a kyslíku v obranné reakci na teplotní stres;
3. polyaminů a jejich úlohy v obranné reakci rostlin na teplotní stres.

V experimentální části bylo cílem práce studium vlivu krátkodobého a stálého teplotního stresu u dvou kultivarů *Pisum sativum* (cv. Kudrnáč, cv. Twinset) lišících se odolností vůči patogenním organismům na:

1. aktivitu diaminoxidasy a aminoaldehyddehydrogenasy v kořenové a nadzemní části;
2. regulaci aktivity vybraných enzymů prostřednictvím posttranslační modifikace S-nitrosylace;
3. produkci reaktivních forem kyslíku a dusíku.

1 ÚVOD

Během celého životního cyklu jsou rostliny neustále vystavovány měnícím se environmentálním faktorům, avšak jsou schopny se přizpůsobit se širokému spektru různých podmínek. Jakmile dojde k překročení určité prahové hodnoty, rostliny jsou stresovány. Některé definice rozlišují stres na „eustres“, který je pro organismus náročný, ale vede ke zlepšení stavu. Druhým typem je „distres“, který přesahuje schopnost aklimatizace a způsobuje nevratné poškození rostliny nebo dokonce její smrt (Krasensky-Wrzaczek a Kangasjärvi, 2018).

Jedním z nejdůležitějších environmentálních faktorů je teplota, která má vliv na růst a vývoj rostlin, míra účinku závisí na intenzitě tepla, délce a rychlosti zvyšování teploty (Li *et al*., 2018). V průběhu odpovědi na teplotní stres se v rostlinné buňce rapidně mění její redoxní rovnováha. Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) představují vysoce reaktivní molekuly či volné radikály, které významně ovlivňují redoxní stav buňky. ROS i RNS mají v buňkách primárně signální funkce, za stresových podmínek naopak jejich vysoké hladiny mohou přispívat ke vzniku tzv. oxidačního nebo nitrosačního stresu vedoucího k poškození buněčné struktury (Choudhury *et al*., 2017).

Posttranslační modifikace proteinů (PTM) představují klíčové mechanismy regulace jejich stability díky změně konformace, subcelulární lokalizace i aktivity cílových proteinů. Nejdůležitější PTM v signalizaci ROS představuje oxidace dvou sulfanylových (-SH) skupin cysteinu za tvorby disulfidové vazby (Biswas *et al*., 2006). Mezi další sloučeniny produkované v rostlinných buňkách v reakci na teplotní stres patří oxid dusnatý (NO). Stejně jako ROS je i NO vysoce reaktivní a schopný posttranslačně modifikovat proteiny na cysteinových zbytcích, a to prostřednictvím S-nitrosylace, která spočívá v navázání nitroso- skupiny (-NO) na cílovou -SH skupinu cysteinu (Tada *et al*., 2008; Hussain *et al*., 2016). Významnými enzymy metabolismu ROS u rostlin, jejichž aktivita je regulována S-nitrosylací, jsou askorbátperoxidasa zachycující peroxid vodíku (H_2O_2) a NADPH oxidasa produkující H_2O_2, což dokazuje, že NO může mít regulační roli v produkci H_2O_2 (Yun *et al*., 2011; De Pinto *et al*., 2013; Yang *et al*., 2015).

Polyaminy (PA) jsou nízkomolekulární alifatické polykationty, které se akumulují v reakci na abiotický stres (Hussain *et al*., 2011). Podílejí se na růstu a vývoji rostlin (Silveira *et al*., 2013), programované buněčné smrti (Kim *et al*., 2013), zrání ovoce (Gil-Amado a Gomez-Jimenez, 2002), diferenciaci xylému (Tisi *et al*., 2011). Metabolismus PA je katalyzován dvěma třídami enzymů, a to diaminoxidasami

obsahujícími jako kofaktor měď, a polyaminoxidasami obsahujícími FAD. Katabolismus PA vede k produkci H_2O_2, který v nízké koncentraci zastává funkci signální molekuly a ve vysokých koncentracích je toxický (Cona *et al*., 2006). Poměr katabolismu a biosyntézy PA je rozhodujícím faktorem, který vede buď k toleranci rostlin na abiotický stres, nebo k buněčné smrti. PA tedy významně přispívají k toleranci rostlin stres modulací homeostázy ROS (Moschou *et al*., 2008).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Obranné reakce u rostlin vystavených teplotnímu stresu

Rostliny jsou neustále vystavovány různým biotickým a abiotickým stresovým faktorům, které způsobují změny v jejich metabolismu. Tyto změny vedou k udržení rovnováhy mezi tvorbou a spotřebou energie a k optimálnímu redoxnímu stavu v buňce (Suzuki *et al*., 2012). Řada stresových faktorů má značný nepříznivý vliv na metabolismus, růst a vývoj rostlin, kdy při jejich dlouhodobém působení dochází až k úhynu rostliny. Stresové faktory abiotického charakteru zahrnují působení sucha, UV záření, salinity, extrémních teplot, působení těžkých kovů, pesticidů, herbicidů, či mechanické poškození/poranění rostliny. Tyto faktory jsou v důsledku zhoršení životního prostředí vážnými hrozbami pro zemědělství. Jsou hlavní příčinou úbytku plodin na celém světě a snižují průměrné výnosy u většiny zemědělsky významných plodin o více než 50 % (Boguszewska a Zagdanska, 2012).

Teplotní stres (TS) je často definován jako zvýšení teploty nad prahovou hodnotu po dobu dostatečnou k tomu, aby způsobila nevratné poškození růstu a vývoje rostlin. Obecně platí, že přechodné zvýšení teploty, obvykle 10-15 °C nad okolní teplotu, se považuje za TS (Willits a Peet, 1998). TS, ke kterému dochází v důsledku nepříznivých podmínek prostředí (chlad nebo zvýšená teplota), významně ovlivňuje redoxní stav buňky, kdy se následné změny v metabolických drahách negativně projevují na růstu i vývoji rostlin (Suzuki a Mittler, 2006; Suzuki *et al*., 2012; Bita a Gerats, 2013). V důsledku TS se mění buněčná homeostáza v rostlinné buňce primárně narušením fotosyntézy a zvýšením fotorespirace (Noctor *et al*., 2007). Rostliny v rámci obranné reakce na TS disponují řadou mechanismů na úrovni regulační, jako je např. produkce signálních molekul (významnou roli hrají ROS, RNS a Ca^{2+} ionty), indukce mitogenem aktivovaných proteinkinas (MAPK), Ca^{2+}-dependentních proteinkinas (CDPK), zvýšení transkripce obranných genů a tvorby tzv. heat shock proteinů (Hsp). Dalším regulačním mechanismem je udržení stability buněčných membrán prostřednictvím osmoprotektantů a v neposlední řadě také aktivace enzymových i neenzymových antioxidačních systémů vedoucí ke snížení hladiny ROS. Akumulace osmoticky aktivních látek, tzv. osmoprotektantů, jako jsou např. prolin, glycinbetain nebo rozpustné sacharidy (sacharosa, rafinosa, stachyosa, trehalosa) je jedním z důležitých adaptivních mechanismů v rostlinách vystavených TS (Sakamoto *et al*., 2000).

Komplexní aktivace obranných mechanismů umožňuje rostlinám vyrovnat se s působením TS (Wahid *et al*., 2007).

Přímým důsledkem buněčných změn vyvolaných TS je nadprodukce ROS (Bhattacharjee, 2012). ROS jsou vysoce reaktivní molekuly či volné radikály, které ve vysokých hladinách působí toxicky. Mohou se podílet na poškození nukleových kyselin, oxidaci proteinů, případně peroxidaci lipidů, což nakonec může vést až ke smrti buňky. Zvýšená koncentrace ROS v důsledku působení stresových faktorů, vede k tzv. oxidačnímu stresu (Vadez *et al*., 2012). V závislosti na koncentraci mají ROS u rostlin dvojí roli (Kotchoni a Gachomo, 2006). Při nízkých koncentracích mohou ROS působit v buněčné signalizaci jako tzv. druzí poslové a podílet se na aktivaci řady intracelulárních signálních drah, a to jak za fyziologických podmínek, tak i v rámci obranných reakcí na stres. Naopak, při vyšších koncentracích se projevuje toxický účinek ROS negativně na další růst a vývoj rostliny (Mittler, 2002; Torres *et al*., 2002; Miller *et al*., 2008). Hladina ROS je proto kontrolována řadou antioxidačních systémů, které jsou významně aktivovány v rámci obranných reakcí rostlin při působení stresových faktorů (Tuteja *et al*., 2012).

Na základě globálních klimatických změn je TS považován za kritický faktor pro produktivitu rostlin a rostlinnou biogeografii. Reakce rostlin na TS závisí na intenzitě změn teploty, době trvání stresu a druhu rostliny. Vysoké teploty mohou nepříznivě ovlivnit životně důležité fyziologické procesy, jako je fotosyntéza, respirace, příjem/výdej vody, stabilitu membrán a také mohou modulovat hladiny fytohormonů, primárních i sekundárních metabolitů (Hemantaranjan *et al*., 2014). Termotolerance, schopnost organismu odolávat teplu, je velmi důležitou vlastností v rostlinách, protože rostliny jsou fixovány na svém místě. Experimentální studie prokázaly, že získaná termotolerance může být u rostlin zprostředkovaná aktivací buněčných mechanismů (kyselinou salicylovou (SA), kyselinou abscisovou (ABA), Ca^{2+} ionty, ethylenem) vedoucích k ochraně před oxidačním poškozením buněk/celých rostlin za vysokých teplot (Larkindale a Huang, 2004; Suzuki a Mittler, 2006).

2.1.1 Heat shock proteiny

Molekulární chaperony jsou klíčovou komponentou, která přispívá k buněčné homeostáze při optimálních i nepříznivých podmínkách růstu. Jsou zodpovědné za skládání, translokaci i degradaci proteinů během buněčných procesů. Dále působí také při stabilizaci proteinů a membrán, napomáhají opětovnému skládání proteinů za

stresových podmínek. Mnoho proteinů vykazuje chaperonovou aktivitu a mnoho molekulárních chaperonů patří mezi stresové proteiny původně identifikované jako tzv. heat shock proteiny (Hsp) neboli proteiny teplotního šoku (Lindquist a Craig, 1988; Mishra *et al*., 2018). Exprese stresových proteinů je důležitá pro adaptaci rostlin na stres. Většina stresových proteinů je rozpustná ve vodě, a proto pravděpodobně ke stresové toleranci přispívají hydratací buněčných struktur (Wahid a Close, 2007). Molekulární Hsp/chaperony se nacházejí v cytoplazmě, jádře, mitochondriích, chloroplastech a endoplazmatickém retikulu a podle jejich molekulové hmotnosti jsou rozděleny do pěti hlavních tříd: Hsp70 (DnaK), chaperoniny (GroEL a Hsp60), Hsp90, Hsp100 (Clp) a malé Hsp (sHsp) s molekulovou hmotností 15-30 kDa (Lindquist a Craig, 1988). Hsp/chaperony Hsp60, Hsp70 a Hsp90 interagují se širokou škálou ko-chaperonových proteinů, které regulují jejich aktivitu nebo pomáhají při skládání specifických proteinů (Wang *et al*., 2004; Kotak *et al*., 2007; Gupta *et al*., 2010;). V přehledné práci Park a Seo (2015) jsou uvedeny Hsp podílející se na rostlinné imunitě (Tab. 1).

Tab. 1 Přehled heat shock proteinů (Hsp) podílejících se na rostlinné imunitě (převzato a upraveno z Park a Seo, 2015).

Třída	**Molekulová hmotnost (kDa)**	**Předpokládaná funkce**	**Umístění v buňce**	**Zástupce**
Hsp100	100-104	Skládání proteinů, desagregace	Cytosol, mitochondrie, chloroplast	Hsp100, Clp
Hsp90	82-90	Genetické vyrovnávání, regulace receptorů, translokace proteinů	Cytosol, endoplazmatické retikulum, jádro, mitochondrie, chloroplast	Hsp90, Grp94/gp96
Hsp70	68-75	Zabraňuje agregaci, pomáhá opětovnému složení	Cytosol, endoplazmatické retikulum, jádro, mitochondrie, chloroplast	Hsp70, BiP/Grp78
Hsp60	58-65	Skládání a pomoc při opětovném skládání	Cytosol, mitochondrie, chloroplast	Cpn60, CCT
Hsp40	35-54	Ko-chaperon	Cytosol, endoplazmatické retikulum	Hsp40, ERdj
sHsp	15-30	Zabraňuje agregaci, ko-chaperon	Cytosol, endoplazmatické retikulum, mitochondrie, chloroplast	Hsp20

Nízkomolekulární sHsp jsou v rostlinách mnohem rozmanitější než jiné Hsp/chaperony s ohledem na podobné sekvence, umístění v buňce a funkce. sHsp jsou všudypřítomně syntetizovány v prokaryotických a eukaryotických buňkách jako odpověď na teplo a jiné stresové faktory. Je také známo, že některé sHsp jsou exprimovány během určitých vývojových fází (Wang *et al*., 2004).

Ko-chaperony Hsp40 díky přítomnosti vysoce konzervované J-domény regulují aktivitu Hsp70 (Rug a Maier, 2011). Bylo prokázáno, že Hsp40 společně s Hsp70 působí jako pozitivní regulátory rostlinné imunity. Mimo cytosol a mitochondrie se Hsp40 nacházejí v endoplazmatickém retikulu savčích buněk, kde mají označení ERdj případně ERj, u rostlin je o jejich přesné funkci známo málo informací (Ohta a Takaiwa, 2014; Park a Seo, 2015).

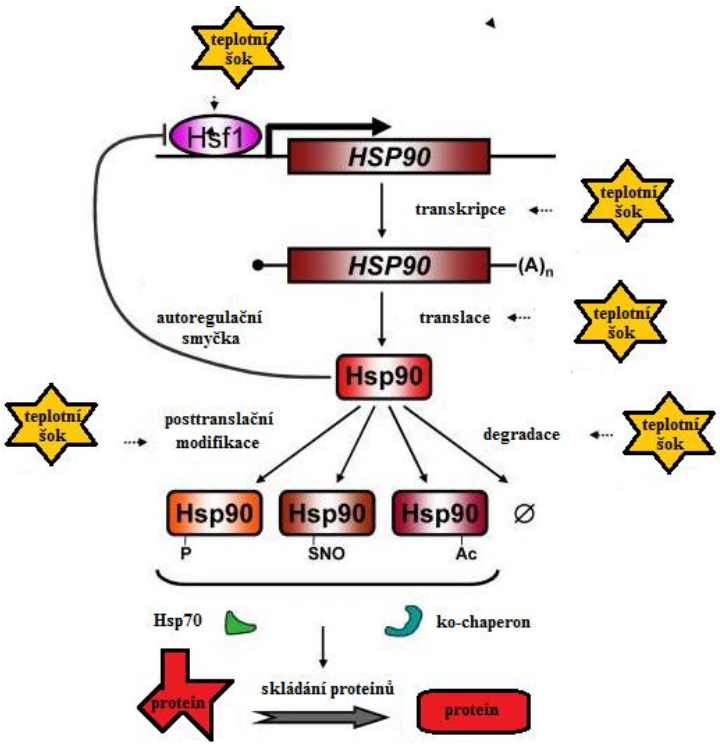
Třída Hsp60, která se také označuje jako chaperoniny je třídou molekulárních chaperonů, které byly nalezeny u prokaryot a v mitochondriích a plastidech eukaryot. Do této třídy patří prokaryotický GroEL a jeho eukaryotický ekvivalent Hsp60 (Wang *et al*., 2004). Mitochondriální Hsp60 byl poprvé nalezen u Tetrahymen (*pozn. Tetrahymena je označení pro skupinu prvoků z kmene nálevníci*), kde byl vytvořen během odpovědi tohoto organismu na stres. Chloroplastový chaperonin je nutný pro sestavení ribulosa-bisofosfátkarboxylasy/oxygenasy (RUBISCO) a odtud plyne název pro RUBISCO vazebný protein (Hendrick a Hartl, 1993).

Hsp70 společně se svými ko-chaperony (např. DnaJ/Hsp40 a GrpE) pomáhají při procesech skládání proteinů v téměř všech buněčných kompartmentech (Hartl, 1996; Frydman, 2001). Hsp70 se skládají z vysoce konzervované N-koncové ATPasové domény o velikosti 44 kDa a C-koncové peptidové vazebné domény o velikosti 25 kDa, která je rozdělena na konzervovanou vazebnou doménu substrátu a méně konzervovanou doménu C-konce o velikosti 10 kDa. Cyklus vazby a uvolňování substrátového proteinu je spojen s vnitřní ATPasovou aktivitou Hsp70, která se využívá jako pohon konformační změny v C-koncové peptidové vazebné doméně (Bukau a Horwich, 1998). Základní funkcí Hsp70 je ochrana před agregací a napomáhání při opětovném skládání proteinů za normálních i stresových podmínek (Hartl, 1996; Frydman, 2001). Rovněž se podílejí na importu a translokaci proteinů a usnadňují proteolytickou degradaci nestabilních proteinů tím, že jsou zacíleny na lysozomy nebo proteasomy (Hartl, 1996). Dále se mohou podílet na kontrole biologické aktivity složených regulačních proteinů a také mohou působit jako negativní represory. Prostřednictvím tzv. heat shock faktorů (Hsf) je regulována transkripce Hsp (Mishra *et*

al., 2002). Hsf se nacházejí v cytosolu, kde vytváří trimery a po fosforylaci jsou translokovány do jádra, kde se navážou na určité místo na promotoru genu kódujícího Hsp a iniciují jejich expresi (Morimoto *et al*., 1992).

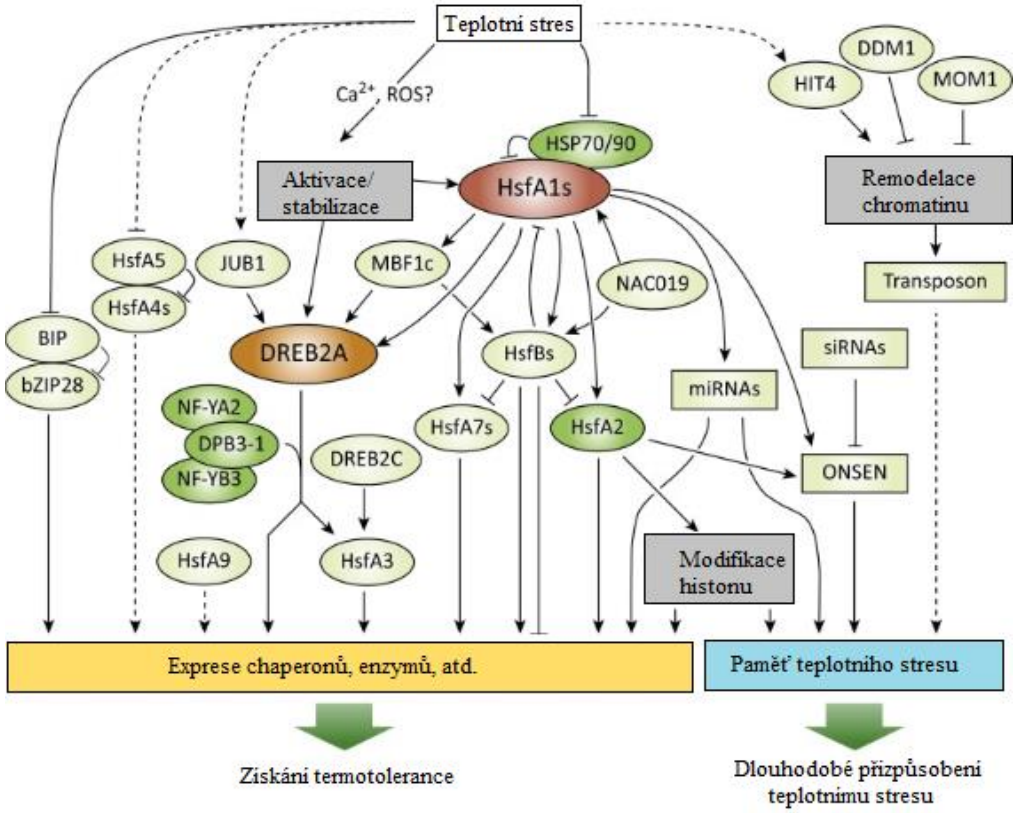
Hsp90 je jeden z nejrozšířenějších cytosolických proteinů u bakterií, eukaryot včetně kvasinek a představuje 1-2 % z celkového množství proteinů v nestresovaných buňkách. Výskyt heho homologů byl také popsán v endoplazmatickém retikulu a v chloroplastech (Buchner, 1999). Hsp90 napomáhají správnému složení proteinů, stabilizují proteiny vůči TS, pomáhají při jejich degradaci, zabraňují nesprávnému složení proteinů, agregaci rozložených nebo částečně složených proteinů, napomáhají transportu proteinů přes endoplazmatické retikulum a organelové membrány a řídí buněčných cyklus (Buchner, 1999; Frydman, 2001; Young *et al*., 2001; Stechmann a Cavalier-Smith, 2004). Také bylo zjištěno, že interagují s proteasomem 26S, kde hrají hlavní roli při jeho sestavení a zajištují jeho integritu (Imai *et al*., 2003). Na Obr. 1 je uvedeno schéma regulace transkripce Hsp90 prostřednictvím Hsf1. Aktivita Hsp90 je regulována posttranslačními modifikacemi, ale i interakcemi s různými ko-chaperony které ovlivňují jejich vazebnou specifitu pro dané proteiny (Leach *et al*., 2012).

Chaperony třídy Hsp100 patří do velké rodiny AAA proteinů, tj. ATPas spojených s různými buněčnými aktivitami (ATPases Associated with diverse cellular Activities). Jejich hlavní funkce spočívá v tom že, zabraňují agregaci a nesprávnému složení proteinů. Další významnou úlohou Hsp100 je zapojení v desagregaci (tj. rozpadu proteinových celků na části) anebo úplné degradaci proteinů. Odstranění nefunkčních, ale i potenciálně škodlivých polypeptidů, které jsou důsledkem chybného skládání, denaturace nebo agregace proteinové struktury, je důležité pro udržení buněčné homeostázy (Schirmer *et al*., 1996; Latterich a Patel, 1998).



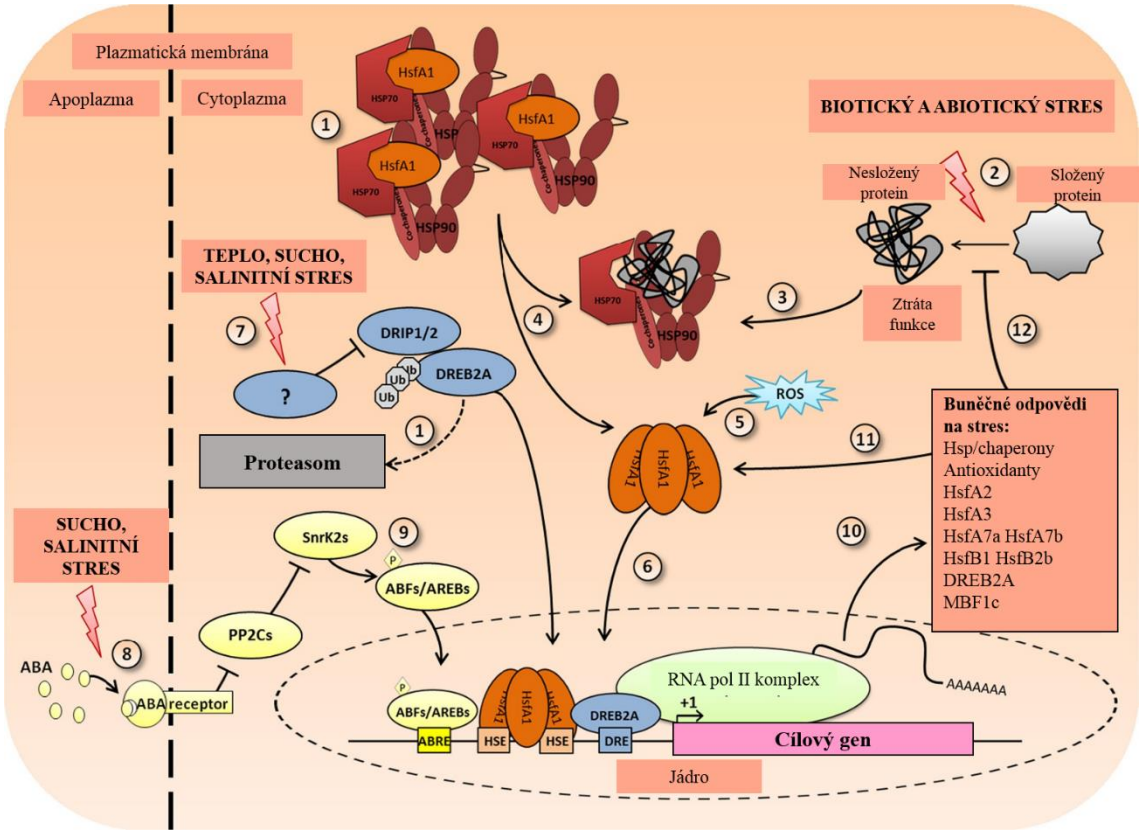
Obr. 1 Transkripce heat shock proteinu 90 (Hsp90) u *Saccharomyces cerevisiae* je řízena heat shock faktorem 1 (Hsf1), který je negativně autoregulován. Posttranslační modifikace, jako fosforylace, S-nitrosylace a pravděpodobně i acetylace, ovlivňují aktivitu Hsp90 i interakci Hsp90 se specifickými ko-chaperony, čímž se sníží/zpomalí rychlost skládání proteinů (převzato a upraveno z Leach *et al*., 2012).

Hsf jsou přítomny u všech eukaryot, nicméně nejvíce jich bylo objeveno u rostlin (38 u sóji, 25 v rýži, 21 v *Arabidopsis thaliana*) v porovnání s jediným Hsf1 u *Saccharomyces cerevisiae* nebo se sedmi v lidském organismu (Nover *et al*., 2001; Baniwal *et al*., 2004, Fujimoto a Nakai, 2010). Hsf jsou rozděleny na základě strukturních motivů do tří skupin A, B a C (Nover *et al*., 1996; Nover *et al*., 2001). Pro Hsf třídy A je nutný tzv. aktivační motiv AHA (aromatický, hydrofobní, kyselý), který je potřebný pro transkripční aktivitu. Hsf třídy B a C tento motiv postrádají a jsou proto považovány za inhibiční Hsf (Ikeda *et al*., 2011). HsfA1 představují hlavní regulátory odpovědi na TS. Předpokládá se, že HsfA1 přímo regulují hladiny exprese genů kódujících důležité transkripční faktory, které reagují na TS, zahrnující např. „dehydratační responsivní element vázající protein 2a“ (DREB2A), HsfA2, HsfA7a, HsfB a „multiproteinový bridging faktor 1c“ (MBF1C) (Yoshida *et al*., 2011). Na Obr. 2 je naznačena složitost a provázanost sítě regulačních reakcí, ke kterým dochází po vystavení organismu TS.



Obr. 2 Regulační síť transkripcí zapojená do reakce na teplotní stres. Během reakce na teplotní stres působí heat shock faktory A1 (HsfA1) jako hlavní transkripční regulátory. Za nestresových podmínek heat shock protein 70 a 90 (Hsp70; Hsp90) inhibují aktivitu HsfA1. Po teplotním stresu jsou HsfA1 aktivovány a indukují expresi transkripčních faktorů - „dehydratační responsivní element vázající protein 2a" (DREB2A), „multiproteinový bridging faktor 1c" (MBF1C), HsfA2, HsfA7a a HsfB. Pro stabilizaci a aktivaci DREB2A je nutná posttranslační regulace. Aktivovaný DREB2A indukuje expresi svých cílových genů (převzato a upraveno z Ohama, 2017).

Mezi rostlinnými Hsf je rovněž HsfA1 považován za hlavní transkripční aktivátor nepostradatelný pro vyvolání odpovědi na TS (Yoshida *et al*., 2011). Aktivita HsfA1 je regulována PTM (fosforylací a sumoylací) a protein-proteinovou interakcí (Yoo *et al*., 2006; Schulz-Raffelt *et al*., 2007). Za nestresových podmínek Hsp70 a Hsp90 potlačují aktivitu HsfA1 (Hahn *et al*., 2011). Po TS dochází k uvolnění HsfA1 (Zheng *et al*., 2016; Jacob *et al*., 2017) (Obr. 3).



Obr. 3 Schématické znázornění úlohy heat shock proteinů (Hsp) a heat shock faktorů (Hsf) v aktivaci obranných mechanismů na abiotický stres. 1) Za nestresových podmínek dochází k protein-proteinové interakci Hsf třídy A1 s Hsp90/70. Jejich ko-chaperony a „dehydratační responsivní element vázající protein 2a" (DREB2A) jsou degradovány prostřednictvím ubikvitin-26 S proteasomovému systému (UPS) díky DREB2A interakčního proteinu (DRIP1/2) E3 ligasy. 2) Za stresových podmínek se zvyšuje množství chybně složených proteinů, což vede ke ztrátě jejich funkce. 3) Chybně složené proteiny interagují s Hsp90/70. 4) Dochází k uvolnění HsfA1 z komplexu s Hsp90/70. 5) V souvislosti s vysokým obsahem reaktivních forem kyslíku (ROS) mohou HsfA1 vytvářet oligomery. 6) HsfA1 se následně váže na tzv. heat shock elementy (HSE) na DNA a indukuje transkripci cílových genů. 7) Teplo, sucho a salinita mají za následek inhibici E3 ligasy DRIP1/2 a akumulaci DREB2A. 8) Sucho a salinita způsobují akumulaci kyseliny abscisové (ABA), která se následně váže na receptor proteinfosfatasy 2 Cs (PP2C). 9) Kinasa SnrK2 aktivuje cílový protein ABF/AREBs fosforylací. 10) HsfA1, ABF/AREBs a DREB2A vstupují do jádra, kde se společně nebo odděleně váží na svůj cílový motiv na DNA (ABRE, DRE a HSE), což vede k aktivaci exprese cílových genů. 11) Indukované proteiny zahrnují stresově specifické transkripční faktory, které zpětnovazebně pozitivně ovlivňují transkripci Hsf a Hsp (převzato a upraveno z Jacob *et al.*, 2017).

2.1.2 Reaktivní formy kyslíku

Všechny aerobní organismy využívají kyslík v průběhu dýchání. Samotný kyslík není příliš reaktivní ani toxický, ale má potenciál být částečně redukován, což vede ke tvorbě velmi reaktivních meziproduktů. Mezi ROS patří singletový kyslík ($^1O_2$), superoxidový radikál ($O_2^{-}\bullet$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál ($OH\bullet$) (Saxena *et al.*, 2016). ROS jsou produkovány i za fyziologických podmínek např. v chloroplastech,

mitochondriích a peroxisomech jako vedlejší produkty respirace a fotosyntézy. V důsledku působení stresových faktorů je rychlost produkce ROS významně zvýšená, což může vést k oxidaci/peroxidaci DNA, proteinů, sacharidů a lipidů s následnou buněčnou smrtí (Raja *et al*., 2017). Konečným důsledkem rychlého nárůstu intracelulárních hladin ROS je tzv. oxidační stres. Koncentrace ROS je u rostlin regulována řadou antioxidačních systémů enzymového a neenzymového charakteru. Mezi významné enzymové antioxidanty podílející se na snížení hladiny ROS patří např. katalasa (CAT, EC 1.11.1.6), askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11), glutathionperoxidasa (GSHPX, EC 1.11.1.9) a superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) a neenzymovými antioxidanty jsou např. askorbát (ASH), glutathion (GSH), α-tokoferol a flavonoidy (Kapoor *et al*., 2015). Rostliny využívají ROS jako signální molekuly k regulaci růstu a vývoje za fyziologických podmínek (Saxena *et al*., 2016). ROS vystupují i jako molekuly signální transdukce zprostředkovávající odpověď na řadu environmentálních stresů biotického a abiotického charakteru. Na jedné straně jsou tedy ROS poškozující toxické molekuly a na druhé straně se jedná o molekuly signální transdukce (Suzuki a Mittler, 2006).

2.1.2.1 Produkce reaktivních forem kyslíku

Je známo, že chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy a enzymy lokalizované na plazmatických membránách patří mezi významné zdroje ROS v rostlinných buňkách (Obr. 4) (Gill a Tuteja, 2010; Noctor *et al*., 2018). Produkce ROS v mitochondriích probíhá za normálních respiračních podmínek, ale může být zvýšena v reakci na různé biotické a abiotické stresové faktory. Komplex I a III mitochondriálního elektronového transportního řetězce jsou hlavním místem tvorby O_2^{-}• (Obr. 4) (Quan *et al*., 2008; Nadeem, 2018). Bylo odhadnuto, že přibližně 1-5 % spotřebovaného mitochondriálního O_2 vede k produkci H_2O_2, který může reagovat s Fe^{2+} ionty a Cu^{+} ionty za vzniku vysoce toxického OH•, který následně může projít mitochondriální membránou a podílet se na membránové peroxidaci (Møller, 2001; Rhoads *et al*., 2006). Dochází ke tvorbě cytotoxických lipidových aldehydů, alkenů a hydroxyalkenů a to zejména 4-hydroxy-2-nonenalu a malondialdehydu, které mohou způsobit buněčné poškození reakcí s proteiny, jinými lipidy a nukleovými kyselinami (Gill a Tuteja, 2010; Raja *et al*., 2017; Noctor *et al*., 2018).

Ve vyšších rostlinách a řasách probíhá fotosyntéza v chloroplastech obsahujících vysoce organizovaný membránový systém (thylakoidy), kde se nachází všechny složky

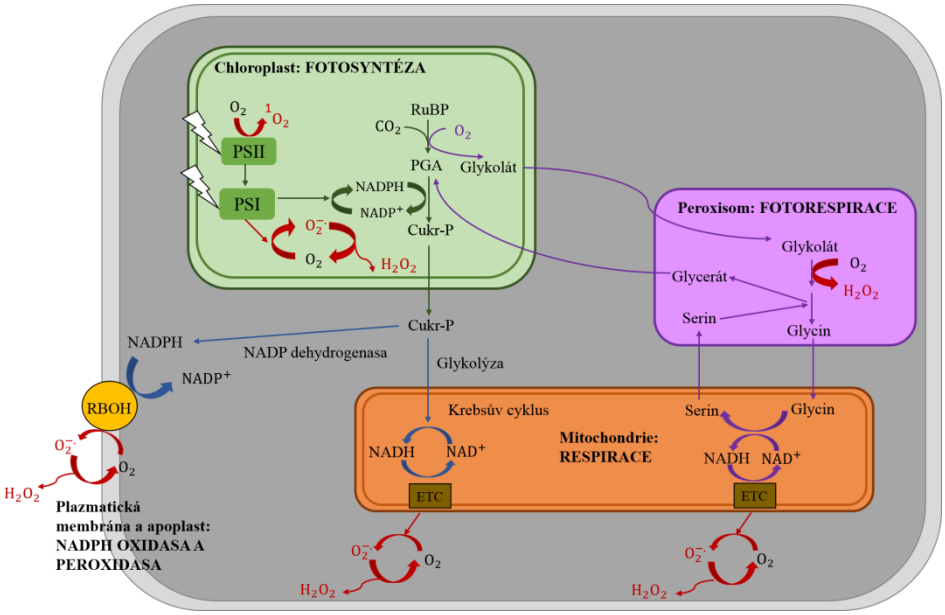
fotosyntetického aparátu (Pfannschmidt, 2003). Kyslík vytvořený v chloroplastech během fotosyntézy může přijímat elektrony, které procházejí fotosystémy, což vede ke tvorbě O_2^{-}•. Hlavním místem produkce ROS jsou fotosystémy PSI a PSII (Obr. 4). Různé abiotické stresové faktory, jako je nadbytek světla, sucho, salinita a podmínky limitující oxid uhličitý produkci ROS zvyšují. Pokud je elektronový transportní řetězec přetížen, je část elektronů odkloněna od ferredoxinu ke O_2, čímž se redukuje na O_2^{-}•, tzv. Mehlerova reakce. Přirozeným vedlejším produktem fotosyntézy je $^1O_2$, který se tvoří hlavně u PSII. Na vnější straně stromatální membrány se O_2^{-}• spontánně nebo za katalýzy CuZn-SOD dismutuje na H_2O_2 (Gill a Tuteja, 2010).

Hlavní metabolické procesy, jež jsou zodpovědné za tvorbu H_2O_2 v peroxisomech jsou oxidace glykolátu v procesu fotorespirace, oxidace β-mastných kyselin, reakce katalyzované flavinoxidasami a disproporcionace O_2^{-}• radikálů (Obr. 4) (Del Río *et al*., 2002).

Hlavním zdrojem ROS v apoplastu jsou rostlinné NADPH oxidasy, které jsou řazeny do rodiny RBOHs (Respiratory Burst Oxidase Homologues) a jsou homologní s podjednotkou gp91phox živočišné NADPH oxidasy. Tyto enzymy jsou lokalizovány v plazmatické membráně a vytváří apoplastický O_2^{-}• pomocí cytosolového NADPH (Obr. 4) (Sagi a Fluhr, 2006). Skládají se ze šesti transmembránových domén a cytosolových C-koncových FAD a NADPH hydrofilních vazebných domén. Cytoplazmatická N-koncová oblast rostlinných NADPH oxidas obsahuje dva vysoce konzervativní EF motivy, které jsou zodpovědné za regulaci aktivity RBOH. Nicméně konformační změny zprostředkované navázáním Ca^{2+} se vyskytují pouze na jednom EF motivu. Aktivita enzymu RBOH, jednoho z nejvýznamnějších zdrojů ROS v reakci na působení stresových faktorů, musí být přísně regulována na různé podněty. Aktivita RBOH, která je závislá na Ca^{2+}, je také regulována fosforylací, RBOH-lipidy a specifickými proteinovými interakcemi. ROS produkované pomocí RBOH aktivují Ca^{2+} kanály hyperpolarizací plazmatických membrán. Otevřením těchto kanálů se zvýší obsah Ca^{2+} v cytosolu. Zvýšený obsah symplastického Ca^{2+} může pak dále aktivovat RBOH vazbou na cytosolový EF motiv. Zvýšený obsah Ca^{2+} v cytosolu může spouštět další reakce prostřednictvím proteinů vázajících Ca^{2+}. Stejně jako u ROS je zvýšení koncentrace Ca^{2+} rozhodujícím krokem ke spuštění obranné signalizace (Podgórska *et al*., 2017). Při vysokých koncentracích S-nitrosothiolů (thiolové skupiny cysteinu modifikované oxidem dusnatým) může být aktivita NADPH oxidasy regulovaná prostřednictvím PTM S-nitrosylace. Bylo zjištěno, že NADPH oxidasa *A. thaliana*

(označovaná jako AtRBOHD) byla po vystavení S-nitrosoglutathionu (GSNO) nebo S-nitrosocysteinu (Cys-NO) S-nitrosylovaná na cysteinovém zbytku v pozici 890 (Cys890) jak v podmínkách *in vitro* tak *in vivo* během reakce na stres. Jelikož je Cys890 umístěn za konzervovanými zbytky fenylalaninu v pozici 921 a 570, dojde vazbou S-NO skupiny k zabránění vazby kofaktoru FAD, což nakonec vede k inhibici aktivity enzymu, poklesu produkce ROS a potlačení buněčné smrti (Yun *et al.*, 2011).

Na produkci ROS se podílí také enzym aminoxidasa. Tomuto enzymu se podrobně věnuje kapitola 2.1.7.1 Aminoxidasy. Dalším proteinem produkujícím ROS v apoplastu např. při abiotickém stresu je oxalátoxidasa (OXO, EC 1.2.3.4) (Raja *et al.*, 2017).



Obr. 4 Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) u rostlin. Hlavními místy tvorby ROS jsou chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy a NADPH oxidasa lokalizovaná na plazmatické membráně. ETC elektronový transportní řetězec, H_2O_2 peroxid vodíku, $^1O_2$ singletový kyslík, $O_2^{-}\bullet$ superoxidový radikál, PGA 3-fosfoglycerát, PSI/II fotosystém I/II, RBOH Respiratory Burst Oxidase Homologues, RuBP ribulosa-1,5-bisfosfát (převzato a upraveno z Noctor *et al.*, 2018).

2.1.2.2 Enzymy podílející se na regulaci oxidačního stresu

K ochraně před toxickými účinky ROS používají rostlinné buňky řadu antioxidačních obranných systémů lokalizovaných především v chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech (Gill a Tuteja, 2010). Nejúčinnějším intracelulárním enzymovým antioxidantem, který je přítomen ve všech aerobních organismech a subcelulárních kompartmentech náchylných k oxidačnímu stresu, je metaloenzym SOD. Tento enzym je důležitý v toleranci vůči stresu a představuje první obrannou linii vůči toxickým účinkům zvýšených hladin ROS. SOD katalyzuje dismutaci O_2^{-}• za tvorby H_2O_2. Tím se snižuje riziko tvorby hydroxylových radikálů přes Haber-Weissovu reakci Podle kovového kofaktoru jsou rozděleny SOD na enzymy obsahující měď nebo zinek (Cu/Zn-SOD), mangan (Mn-SOD) nebo železo (FeSOD) (Fridovich, 1995). Aktivita izoenzymů SOD může být detekována negativním barvením a identifikována na základě jejich citlivosti ke kyanidu draselnému (KCN) a H_2O_2. Mn-SOD je vůči oběma inhibitorům odolná, Cu/Zn-SOD je k oběma inhibitorům citlivá, zatímco Fe-SOD je vůči KCN citlivá a k H_2O_2 je odolná (Corpas *et al*., 1998). Charakteristická je také subcelulární distribuce těchto izoenzymů. Mn-SOD se nachází v mitochondriích eukaryotických buněk a peroxisomech (Fridovich, 1995; Corpas *et al*., 1998). Některé z izoenzymů Cu/Zn-SOD byly nalezeny v částech cytosolu a také v chloroplastech vyšších rostlin. Izoenzymy Fe-SOD se nacházejí u prokaryot a v chloroplastech eukaryotických buněk (Van Camp *et al*., 1996).

Dále mezi enzymové antioxidanty patří enzym CAT obsahující hem, jež odstraňuje H_2O_2 rozkladem na H_2O a O_2. CAT je lokalizovaná především v peroxisomech a mitochondriích. CAT je důležitá pro odstranění H_2O_2 vznikajícího např. při β-oxidaci mastných kyselin, fotorespiraci a purinovém katabolismu, díky čemuž může mít významnou roli při udržování buněčné redoxní homeostázy (Scandalios *et al*., 1997).

Za klíčový mechanismus metabolismu H_2O_2 u živočichů i u rostlin je považován askorbát-glutathionový (ASH-GSH) cyklus, známý také jako Foyer-Halliwell-Asadova dráha. Enzymy tohoto cyklu APX, monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR, EC 1.6.5.4), dehydroaskorbátreduktasa (DHAR, EC 1.8.5.1) a glutathionreduktasa (GR, EC 1.6.4.2) jsou lokalizovány v peroxisomech, mitochondriích, chloroplastech a v cytosolu (Jimenez *et al*., 1997; Foyer a Noctor, 2011; Del Río a López-Huertas, 2016).

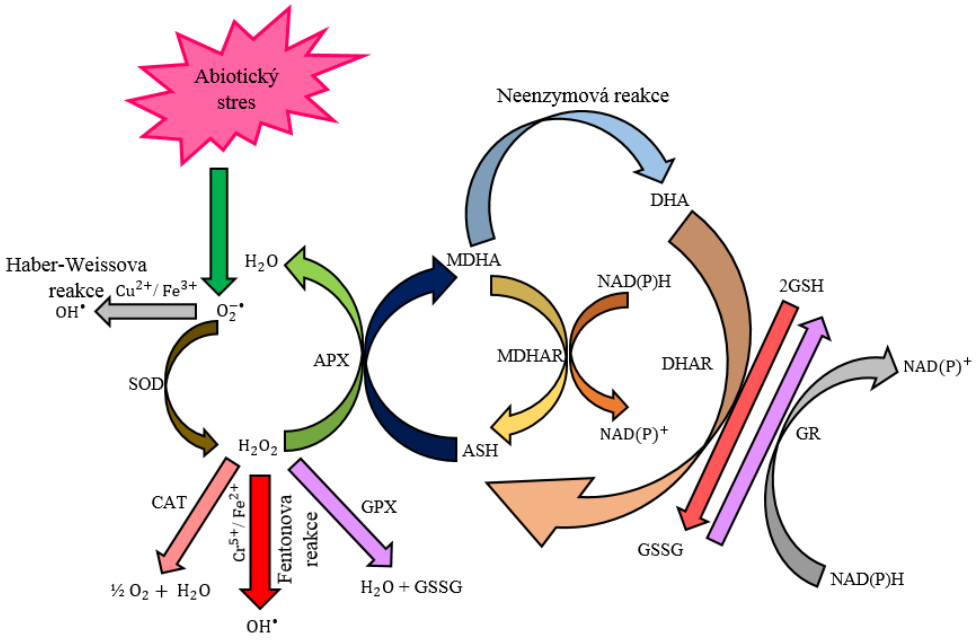
APX byla nalezena u mnoha vyšších rostlin a má nejméně pět různých izoforem zahrnujících: thylakoidní APX (tAPX), APX vázanou na membrány glyoxisomů (gmAPX), APX lokalizovanou ve stroma chloroplastů (sAPX) a cytosolovou formu (cAPX) (Asada, 1992; Yamaguchi *et al*., 1995; Ishikawa *et al*., 1996; Shigeoka *et al*., 2002). Pátý izoenzym APX se vyskytuje ve formě vázané na mitochondriální membrány (mitAPX) (Jimenez *et al*., 1997; De Leonardis *et al*., 2000). Molekulární a enzymové vlastnosti izoenzymů APX se liší od jiných hemových peroxidas, a to např. guajakolperoxidasy (GPX, EC 1.11.1.7). Izoenzymy APX mají vysokou specifitu ASH (Asada, 1999; De Leonardis *et al*., 2000). Mezi inhibitory APX, jejichž prostetickou skupinou je protoporfyrin, patří např. kyanid a azid. Vzhledem k tomu, že tyto inhibitory neovlivňují GP, jsou tato činidla užitečná k rozlišení APX aktivity od GPX (Amako *et al*., 1994; Shigeoka *et al*., 2002). Jednou z typických vlastností APX je její nestabilita za nepřítomnosti ASH. Pokud je koncentrace ASH nižší než 20 $\mu mol \cdot l^{-1}$, dojde k rychlé ztrátě aktivity APX (Ishikawa *et al*., 1996; De Leonardis *et al*., 2000).

Mezi další enzymy ASH-GSH cyklu patří GR. GR je flavoproteinová oxidoreduktasa, která hraje důležitou roli v obranném systému proti ROS tím, že udržuje redukovaný stav GSH. GSH je molekula, která se podílí na mnoha metabolických regulačních a antioxidačních procesech u rostlin. GR katalyzuje NADPH-závislou redukci disulfidové vazby oxidovaného glutathionu (GSSG) na volnou thiolovou skupinu GSH (Rao a Reddy, 2008). MDHAR, obsahující FAD, je enzym vysoce specifický pro monodehydroaskorbát (MDHA), který zde vystupuje jako akceptor elektronů a jako donor elektronů spíše preferuje NADH než NADPH (Asada, 1999). DHAR redukuje dehydroaskorbát (DHA) na ASH, za využití GSH jako donoru elektronů (Ushimaru *et al*., 2006).

Rostlinné glutathiontransferasy, známé také jako glutathion-S-transferasy (GST, EC 2.5.1.18) jsou velkou skupinou enzymů, které katalyzují konjugaci elektrofilních xenobiotických substrátů s tripeptidem GSH. Uplatňují se při detoxifikaci herbicidů, udržování hormonální homeostázy, odstranění anthocyaninu z vakuol, metabolismu tyrosinu, detoxifikaci hydroxyperoxidu, regulaci apoptózy a při reakcích rostlin na biotické a abiotické stresy (Dixon *et al*., 2010). Noctor *et al.* (2002) uvádí, že GST jsou schopné odstranit cytotoxické nebo genotoxické sloučeniny, které mohou reagovat nebo poškozovat DNA, RNA a proteiny.

GSHPX jsou velkou skupinou izoenzymů, které využívají GSH k redukci H_2O_2 a organických a lipidových peroxidů a chrání rostlinné buňky před oxidačním stresem (Noctor *et al*., 2002).

Vedle enzymových systémů hrají důležitou roli v ochraně rostlinných buněk před oxidačním stresem také nízkomolekulární látky s významným antioxidačním účinkem. Nejrozšířenějším, ve vodě rozpustným antioxidantem, který zabraňuje nebo minimalizuje poškození způsobené ROS je ASH (Smirnoff, 2005; Khan a Ashraf, 2008). Objevuje se ve všech rostlinných pletivech, obvykle ve fotosyntetických buňkách a meristémech. Jeho koncentrace je nejvyšší v listech s plně vyvinutými chloroplasty a nejvyšším obsahem chlorofylu. ASH je považován za nejsilnějšího lapače ROS. Poskytuje ochranu membránám přímým vychytáváním O_2^{-}• a OH•. Violaxanthin de-epoxidasy, které v rámci xantofylového cyklu kontrolují hladinu zeaxanthinu, využívají jako kofaktor ASH, což pomáhá udržovat disipaci nadbytečné excitační energie (Smirnoff, 2000). Kromě významu v ASH-GSH cyklu hraje ASH také důležitou úlohu při zachování aktivit enzymů, které obsahují jako prostetické skupiny ionty přechodných kovů (Noctor a Foyer, 1998). Redoxní systém ASH se skládá z ASH, MDHA a DHA. Obě oxidované formy ASH jsou relativně nestabilní ve vodném prostředí, zatímco DHA může být chemicky redukován GSH na ASH (Foyer a Halliwell, 1976). GSH je tripeptid s aminokyselinovou sekvencí γ-1-glutamyl-1-cysteinylglycin, který ve většině rostlinných pletivech udržuje redoxní homeostázu. Existuje jak v redukovaném (GSH) tak oxidovaném stavu (GSSG), ve kterém jsou dvě molekuly GSH spojeny disulfidovou vazbou (Rouhier *et al*., 2008). Je prekurzorem fytochelatinů, což jsou polymery, které chelatují toxické kovy a transportují je do vakuoly (Grill *et al*., 1989). Studie ukázaly, že také přispívá k vyšší toleranci rostlin na těžké kovy nikl, kadmium, zinek, rtuť, hliník a arsen (Asgher *et al*., 2017). Dále se podílí na glutahionylaci, která způsobuje vznik disulfidové vazby mezi cysteinovými residui a GSH (Corpas *et al*., 2013). Na Obr. 5 jsou schematicky uvedeny reakce vedoucí k odstranění ROS za účasti antioxidačních enzymů.

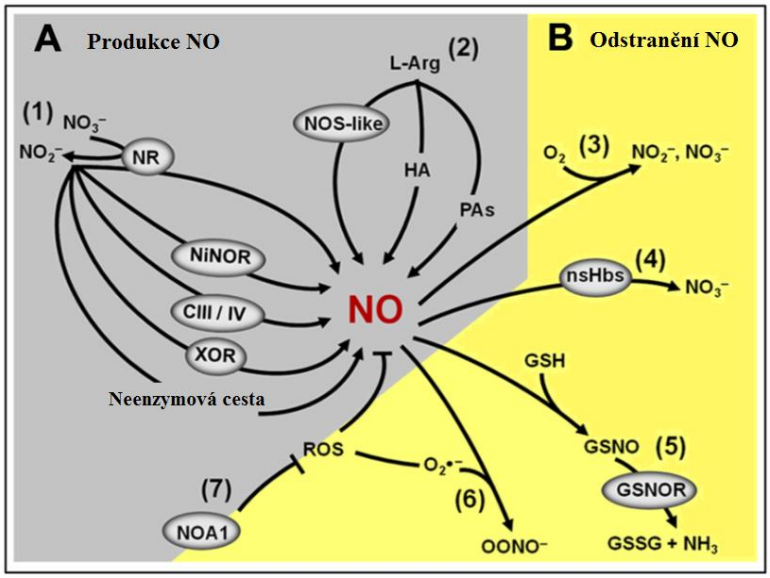


Obr. 5 Reaktivní formy kyslíku (ROS) a antioxidační obranný mechanismus při působení abiotického stresu. Superoxidové radikály (O_2^{-}•) vytvořené během abiotického stresu jsou za katalýzy superoxiddismutasy (SOD; EC 1.15.1.1) dismutovány na peroxid vodíku (H_2O_2). Tím se snižuje riziko tvorby hydroxylového radikálu (OH•) prostřednictvím kovem katalyzované Haber-Weissovy reakce. Katalasa (CAT; EC 1.11.1.6) katalyzuje dismutaci H_2O_2 na kyslík a vodu (H_2O). Během Fentonovy reakce z H_2O_2 vzniká OH•. Součástí askorbát-glutathionového cyklu je askorbátperoxidasa (APX; EC 1.11.1.11), která rozkládá H_2O_2 za využití askorbátu (ASH) jako donoru elektronů na H_2O a uvolní se monodehydroaskorbát (MDHA). Guajakolperoxidasa (GPX; EC 1.11.1.7) rozkládá H_2O_2 na H_2O a oxidovaný glutathion (GSSG). MDHA je činností monodehydroaskorbátreduktasy (MDHAR; EC 1.6.5.4) převeden zpět na ASH. Dehydroaskorbátreduktasa (DHAR; EC 1.8.5.1) využívá k redukci dehydroaskorbátu (DHA) na ASH glutathion (GSH). Glutathionreduktasa (GR; EC 1.6.4.2) převádí GSSG zpět na GSH (převzato a upraveno z Gill a Tuteja, 2010).

2.1.3 Reaktivní formy dusíku

RNS představují další skupinu vysoce reaktivních molekul a volných radikálů v rostlinných buňkách. Mezi RNS patří radikál NO, peroxidusitan ($ONOO^-$), S-nitrosothioly (RSNO), vyšší oxidy dusíku (NOx) a dinitrosyl-železné komplexy. U savců je NO syntetizován v reakci katalyzované enzymem NO syntasou (NOS, EC 1.14.13.39), která se vyskytuje ve třech izoformách: endoteliální (eNOS), neuronální (nNOS) a inducibilní (iNOS). NOS využívají jako substrát L-arginin, který je přeměněn za přítomnosti NADPH na L-citrulin a NO (Umbreen *et al.*, 2018). U vyšších rostlin nebyly nalezeny homology savčích NOS (Salgado *et al.*, 2017). Klíčovým enzymem produkce NO u rostlin je nitrátreduktasa (NR, EC 1.7.7.2) (Umbreen *et al.*, 2018). Dalším zdrojem může být enzym nitrit-NO oxidoreduktasa (Ni-NOR, EC 1.7.99.4 a EC 1.7.2.1) specifický zejména pro kořenové buňky. Nicméně na rozdíl od NR, Ni-NOR nepoužívá jako kofaktor NAD(P)H, ale jako donor elektronů

využívá cytochrom c a má poměrně snížené pH optimum (Neill *et al*., 2007). U vyšších rostlin může syntéza NO dále probíhat pomocí např. xanthinoxidoreduktasy (XOR, EC 1.1.1.204), oxidace hydroxylaminu či polyaminů a mitochondriálního transportu elektronů (Umbreen *et al*., 2018). Hladina NO musí být regulovaná. Přítomnost $O_2^{-\bullet}$, thiolů a molekul obsahující železo (nesymbiotické hemoglobiny (nsHbs)) pomáhá udržovat nebo snižovat hladiny NO (Obr. 6) (Simontacchi *et al*., 2015).



Obr. 6 Přehled tvorby a odstranění oxidu dusnatého (NO) u rostlin. 1) Produkce NO u rostlin závislá na dusitanu zahrnuje neenzymovou i enzymovou dráhu (nitrátreduktasa (NR), nitrit-NO oxidoreduktasa (Ni-NOR), mitochondriální přenos elektronů (CIII / IV) a xanthinoxidoreduktasa (XOR). 2) Tvorba NO závislá na L-argininu zahrnuje enzym podobný NO syntase (NOS) a jiné dvě stále ne zcela charakterizované cesty využívající hydroxylamin (HA) nebo polyaminy (PA) jako substráty. 3) Reakce NO s molekulárním kyslíkem vede k spontánní produkci dusitanů a dusičnanů. 4) NO může reagovat s nesymbiotickými hemoglobiny (nsHbs), což vede k tvorbě dusičnanů. 5) Alternativně může NO reagovat s redukovaným glutathionem (GSH) za vzniku S-nitrosoglutathionu (GSNO), který může být zase převeden na oxidovaný glutathion (GSSG) a amoniak (NH_3) aktivitou S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR). 6) NO může také reagovat se superoxidem ($O_2^{-\bullet}$), což vede k tvorbě peroxydusitanu ($ONOO^-$). 7) Ovlivňováním produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) protein NO-ASSOCIATED 1 (NOA1) nepřímo ovlivňuje hladinu NO v rostlinách (převzato a upraveno z Freschi, 2013).

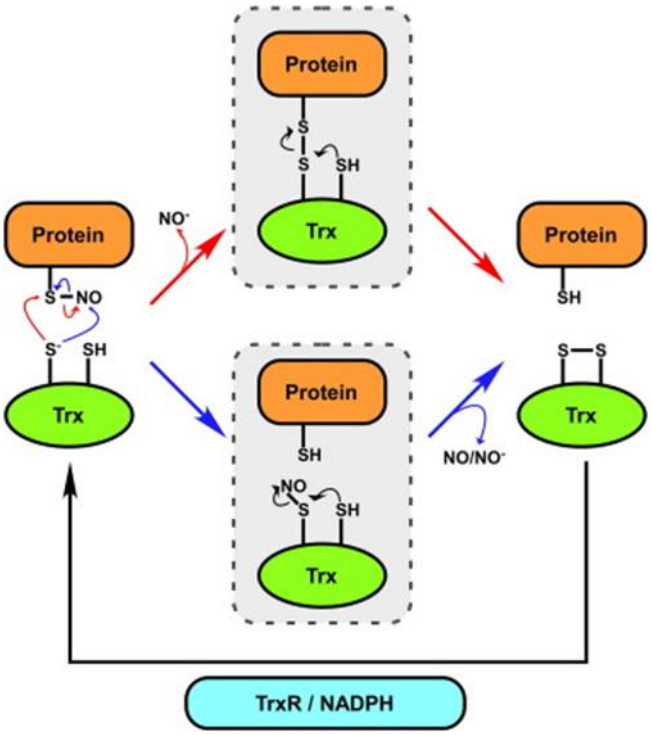
2.1.3.1 Enzymy podílející se na regulaci nitrosačního stresu

V přítomnosti kyslíku je NO nestabilní a z rostlinných pletiv může být odstraněn několika mechanismy. NO může být odstraněn reakcí se O_2^{-}• anionty, kdy vzniká $ONOO^-$. Dále může NO interagovat s rostlinnými proteiny, a to s nsHbs, což usnadňuje jeho oxidaci na dusičnan (Perazzolli *et al*., 2005). Nakonec může NO také reagovat s thiolovými proteiny a peptidy, což vede ke tvorbě RSNO. Jedním z nejobvyklejších RSNO s nízkou molekulovou hmotností je GSNO vznikající reakcí intracelulárního antioxidantu GSH s NO (Neill *et al*., 2007). GSNO slouží jako intracelulární zásobárna NO a může být také transportován mezi buňkami a hrát důležitou roli jako přenašeč signálu NO v rámci celé rostliny (Corpas *et al*., 2013). GSNO pak může spontánně uvolňovat NO v procesu S-nitrosylace za vzniku S-nitrosylovaných proteinů (SNO-proteiny) nebo být metabolizován enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR, EC 1.2.1.1) (Benhar, 2018).

GSNOR je enzym závislý na NADH, účinně a selektivně metabolizuje GSNO, čímž ovlivňuje buněčnou nitrosylační/denitrosylační rovnováhu. Jelikož jsou GSH/GSNO a protein-SH/protein-SNO prostřednictvím rychlé transnitrosylace v rovnováze, je aktivita GSNOR důležitá z hlediska reverse S-nitrosylace buněčných proteinů, a tím ovlivňuje řadu patofyziologických procesů (Benhar, 2015). S-nitrosylace jr důležitá pro regulaci redoxní rovnováhy v buňce. Za normálních fyziologických podmínek mění S-nitrosylace přechodně a reverzibilně funkci proteinů, což vede ke spuštění specifické buněčné odpovědi. Za určitých podmínek však mohou vzniknout abnormálně vysoké hladiny S-nitrosylovaných proteinů, což může narušit normální funkci řady proteinů a vést nakonec k buněčné smrti (Hess *et al*., 2005; Benhar, 2018). GSNOR, známá též jako alkoholdehydrogenasa 5, alkoholdehydrogenasa třídy III nebo formaldehyddehydrogenasa závislá na GSH, je všudypřítomně exprimovaný enzym závislý na NADH se schopností oxidovat alkoholy se středně dlouhým řetězcem, adukt GSH S-hydroxymethylglutathion (HMGSH) a redukovat GSNO. GSNO se redukuje za spotřeby NADH jako kofaktoru za vzniku meziproduktu N-hydroxysulfinamidu (GSNHOH), který může buď reagovat s GSH za vzniku GSSG a hydroxylaminu (NH_2OH), nebo se přeskupit a poté spontánně hydrolyzovat za vzniku kyseliny sulfinové (GSO_2H) a amoniaku (NH_3) (Jensen *et al*., 1998). Aktivita GSNOR může kontrolovat intracelulární hladinu GSNO a následně účinky NO v buňkách. Reduktasová aktivita GSNOR tedy může změnit transnitrosační rovnováhu mezi GSNO

a S-nitrosylovanými proteiny a v důsledku toho se účastní buněčné homeostázy NO (Leterrier *et al*., 2011).

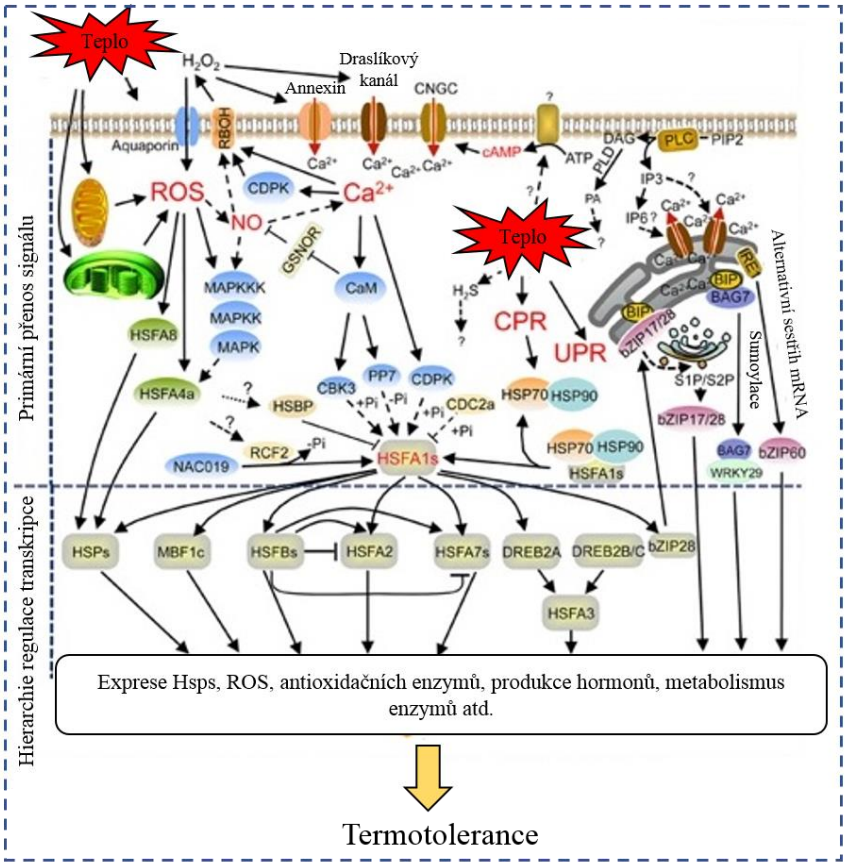
Druhou významnou drahou katabolismu RSNO je systém thioredoxin (Trx)/thioredoxinreduktasa (TrxR, EC 1.6.4.5) (Benhar, 2018). GSNOR a TrxR patří mezi denitrosylasy a ačkoli spolu funkčně souvisí, působí odlišnými mechanismy (Benhar, 2015). Trx jsou skupinou malých proteinů (<12 kDa) katalyzující thiol-disulfidové oxidoredukce pomocí redoxně aktivních cysteinových zbytků, které jsou přítomny v sekvenci Trp-Cys-Gly-Pro-Cys. V oxidovaném stavu Trx (Trx-S_2) je v aktivním místě disulfid a v redukovaném Trx [Trx-$(SH)_2$] odpovídající dithiol. Trx-$(SH)_2$ redukuje disulfidové vazby cílových proteinů a přechází do oxidované formy Trx-S_2, která je dále redukována pomocí thioredoxinreduktasy a NADPH opět na Trx-$(SH)_2$. Enzymy TrxR bakterií, hub a rostlin, patřící mezi selenoenzymy, se skládají ze dvou stejně velkých podjednotek (70 kDa), jejichž kofaktorem je FAD a aktivní místo je tvořeno cysteinovými zbytky. Oproti tomu savčí TrxR mají podjednotky o velikosti větší než 114 kDa a v jejich aktivním místě se nachází selenocysteinový zbytek umístěný na C-konci (Sengupta a Holmgren, 2013). U rostlin se nachází přibližně 19 isoforem TrxR (Schuermann a Buchanan, 2008). Systém Trx/TrxR hraje klíčovou roli v buněčné redoxní homeostáze a signalizaci. Trx a TrxR vykazují odlišnou buněčnou expresi, regulaci a subcelulární lokalizaci (Lee *et al*., 2013). Nejlépe charakterizovaným thioredoxinem je Trx1, který se nachází zejména v cytosolu, ale za určitých podmínek může migrovat do jádra nebo být sekretován do extracelulárního prostoru (Matsuo a Yodoi, 2013). V roce 1996 Nikitovic a Holmgren zjistili, že Trx nebo TrxR mohou redukovat GSNO, což značí novou funkční roli těchto proteinů a poukazuje na to, že denitrosylace je regulována endogenně specifickými redoxními enzymy. Trx společně s TrxR a NADPH přímo katalyzují denitrosylaci široké škály buněčných proteinů a mohou také redukovat různé RSNO s nízkou molekulovou hmotností (Obr. 7) (Nikitovic a Holmgren, 1996).



Obr. 7 Navržené alternativní mechanismy proteinové denitrosylace zprostředkované thioredoxinem (Trx). 1) Tvorba intermolekulárního disulfidového meziproduktu, ve kterém je Trx kovalentně spojen se substrátovým proteinem pomocí disulfidového můstku (červeně zbarvené dráhy), 2) Trans-denitrosylace, ve které je Trx přechodně S-nitrosylovaný (modře zbarvené dráhy) (převzato a upraveno z Benhar, 2015).

2.1.4 Úloha reaktivních forem kyslíku v obranných mechanismech rostlin v reakci na teplotní stres

V reakci na TS je aktivována řada signálních mechanismů, kde hrají významnou roli např. ROS, RNS, Hsp, Hsf a řada dalších molekul, jak je přehledně znázorněno na Obr. 8 (Li *et al*., 2018). V případě TS u rostlin byla prokázána zvýšená produkce ROS vedoucí k oxidačnímu poškození organismu, projevující se např. peroxidací lipidů (Larkindale a Knight, 2002). U takto stresovaných rostlin byla prokázaná zvýšená produkce enzymů s antioxidační aktivitou (Rainwater *et al*., 1996). Ukázalo se, že získaná termotolerance, tj. tolerance k vyšším teplotám indukovaná opakovaným vystavením rostlin subletálním teplotám, je částečně zprostředkována schopností aktivace antioxidačních systémů daného organismu. Jedná se o jednu z možných obranných odpovědí po spuštění signální kaskády v důsledku TS (Larkindale a Huang, 2004).

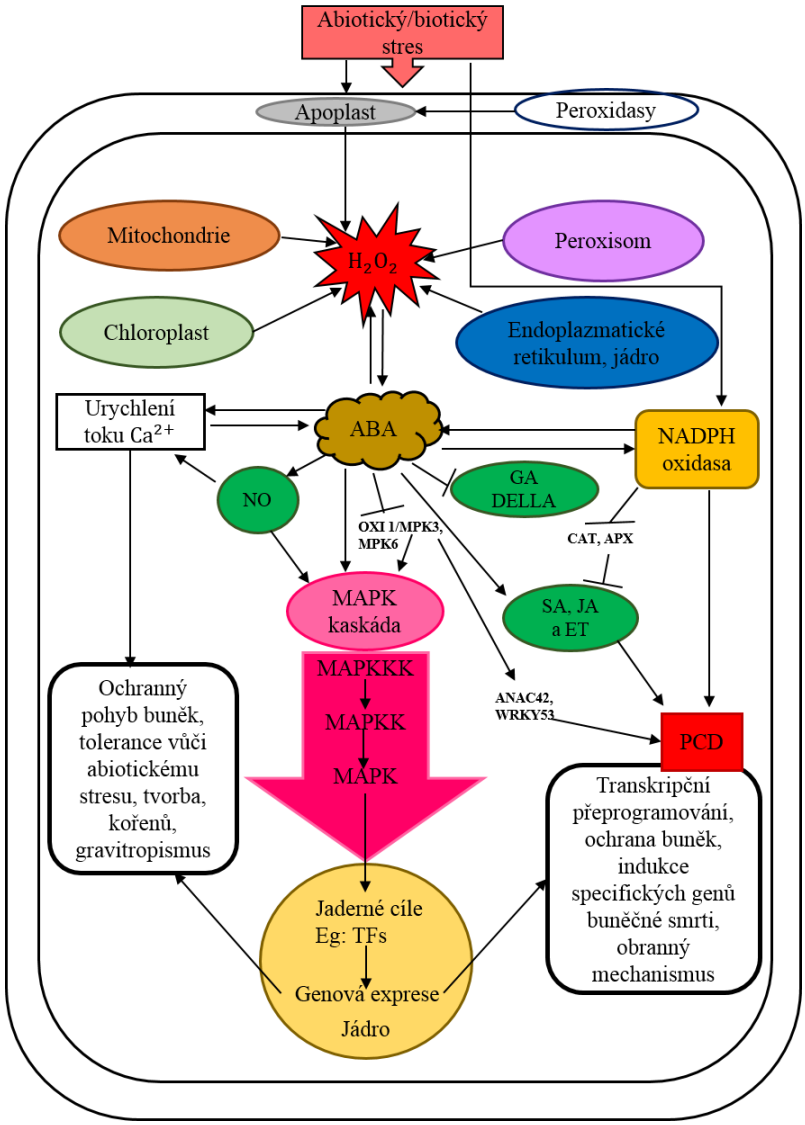


Obr. 8 Signální dráhy regulující reakce rostlin na teplotní stres. Teplotní stres může simultánně ovlivnit fluiditu membrány, způsobit poškození chloroplastů a mitochondrií a denaturovat proteiny v cytosolu nebo v endoplazmatickém retikulu. Výsledkem je zvýšený obsah vápenatých iontů (Ca^{2+}), reaktivních forem kyslíku (ROS) a hladiny oxidu dusnatého (NO) v cytosolu. V obranné reakci na stres jsou dále aktivovány proteiny CPR a UPR (Cytoplasmic Protein Response; Unfolded Protein Response). Ca^{2+}, ROS a NO mohou aktivovat řadu signálních drah vedoucí ke změnám aktivity heat shock faktorů (Hsf) prostřednictvím posttranslačních modifikací. HsfA1 jsou hlavní transkripční faktory ovlivňující reakce rostlin na teplotní stres. Aktivace HsfA1 stimuluje expresi řady transkripčních faktorů účastnících se transkripční regulační kaskády, která je základem pro získání termotolerance u rostlin (převzato a upraveno z Li *et al*., 2018).

Nedávné studie ukázaly, že v aktivaci obranných mechanismů před oxidačním poškozením vyvolaným TS jsou zapojeny Ca^{2+} ionty, ABA, ethylen a SA (Larkindale a Knight, 2002; Larkindale a Huang, 2004). Po předběžném ošetření Ca^{2+}, SA, ABA a aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinou (prekurzor ethylenu) se zvýšila míra přežití rostlin vystavených TS (Larkindale a Knight, 2002). Bylo prokázáno, že Ca^{2+}, ABA, SA a ethylen posilují aktivity řady antioxidačních enzymů v průběhu TS (Larkindale a Huang, 2004).

ROS hrají klíčovou roli při programované buněčné smrti. Pokud produkce ROS překročí prahovou hodnotu, buňky vstoupí do nekontrolovaného nekrotického procesu (De Pinto *et al*., 2006; De Gara *et al*., 2010). ROS působí jako biologický signál

modulující expresi řady genů, čímž regulují reakci rostliny na stres. Zvýšená hladina ROS vyvolává změny v genové expresi a přepíná transkripční faktory (Neill *et al*., 2002; Laloi *et al*., 2004). NADPH oxidasa společně s MAPK dráhami slouží k integraci signálů ROS a modulování šíření signálu (Gilroy *et al*., 2016). Tyto MAPK dráhy se účastní zpětné signalizace z chloroplastu do jádra (Vogel *et al*., 2014; Dietz *et al*., 2016). Jedním ze stěžejních rostlinných hormonů v reakci rostlin na TS je ABA, která se akumuluje jako odpověď na stresové podmínky (Sah *et al*., 2016). Bylo zjištěno, že signální dráha ABA je centrálním regulátorem odezvy rostlin na abiotický stres, což následně spouští změny v expresi genů a adaptivní fyziologické odpovědi rostlin (Obr. 9). Bylo prokázáno, že MAPK kaskády se podílejí na signalizaci ABA (Zhang *et al*., 2007; Saxena *et al*., 2016). Rodriguez *et al*. (2010) uvádí, že MAPK kaskáda je aktivována zvýšenou hladinou H_2O_2 přes hormony ABA, kyselinou jasmonovou (JA) a SA. MAPK kaskády překládají příchozí environmentální signály do PTM cílových proteinů, které nakonec mění genovou expresi a adaptaci na stres (Obr. 9) (Kovtun *et al*., 2000; Saxena *et al*., 2016). Nadprodukce ABA indukuje akumulaci H_2O_2, který zvyšuje např. uzavírání stomat aktivací Ca^{2+} kanálků v plazmatické membráně (Pei *et al*., 2000). Dále bylo zjištěno, že během oxidačního vzplanutí (zvýšená produkce ROS) může NADPH oxidasa ovlivnit Ca^{2+} a MAPK signální dráhy, ale stejně tak může potlačit přenos signálů hormonů SA, JA a ethylenu (Overmyer *et al*., 2003). Všechny tyto procesy vedou k transkripčnímu přeprogramování, které má za následek expresi cílových genů, specifických pro (programovanou) buněčnou smrt (zvýšená produkce nukleas, proteas, a proteinů podílejících se na tvorbě ROS, jako jsou NADPH oxidasy, SOD a extracelulární peroxidasy). Pro ochranu buněk je nezbytně nutná indukce produkce antioxidačních enzymů (např. CAT, APX), podílejících se na snížení a udržení fyziologické hladiny ROS (Gadjev *et al*., 2008). Ca^{2+} ionty jsou jedním z nejdůležitějších druhých poslů signalizace abiotického stresu a regulace homeostázy Ca^{2+} je jedním z hlavních cílů signalizace H_2O_2. Regulace svěracích buněk při otevírání stomat je intenzivně studovaným procesem zahrnujícím signalizaci ABA, Ca^{2+}, ROS a NO (Allen *et al*., 2000; Hossain *et al*., 2015). Zvýšení koncentrace intracelulárních Ca^{2+} vede k účinné detoxifikaci H_2O_2 v důsledku zvýšení hladiny antioxidačních enzymů. Zároveň syntéza H_2O_2 vyžaduje kontinuální přítok cytoplazmatických Ca^{2+} iontů, které aktivují NADPH oxidasu na plazmatické membráně (Lamb a Dixon, 1997; Hossain *et al*., 2015).



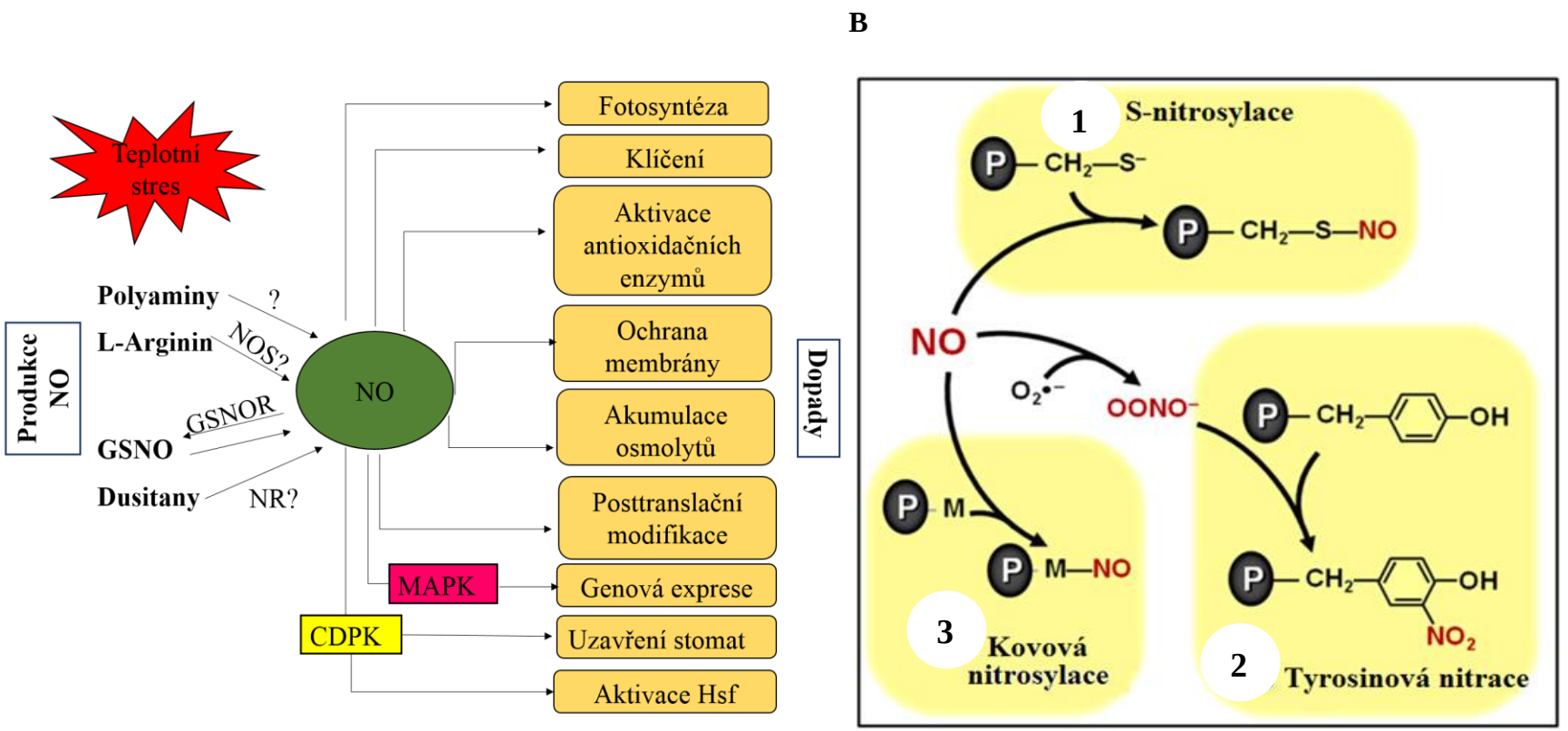
Obr. 9 Schematické znázornění produkce peroxidu vodíku (H_2O_2) a jeho zapojení v rámci signálních drah spojených s regulací obrany genové exprese v rostlinných buňkách. Kyselina abscisová (ABA) je svázána se širokou škálou abiotických stresových signálů a ovlivňuje růstové a vývojové procesy rostlin. Na rozdíl od ABA, mají jiné fytohormony, jako je kyselina salicylová (SA), kyselina jasmonová (JA) a ethylen, významnou roli v rámci aktivace obranných mechanismů v důsledku působení biotických stresových faktorů. ABA je důležitou signální molekulou ovlivňující produkci H_2O_2 a aktivaci MAPK kaskády (mitogenem aktivované proteinkinasy) interakcí s jinými rostlinnými hormony (převzato a upraveno z Saxena *et al*., 2016).

2.1.5 Úloha reaktivních forem dusíku v obranných mechanismech rostlin v reakci na teplotní stres

NO je velice důležitou signální molekulou a funguje jako pozitivní i negativní regulátor stresových reakcí. NO, díky svým hydrofobním vlastnostem, snadno prochází biologickými membránami difúzí bez jakéhokoli specializovaného membránového transportéru (Fancy *et al*., 2017). V závislosti na koncentracích NO a ROS, je NO schopen aktivovat nebo inhibovat produkci ROS a je klíčovou molekulou k udržení buněčné redoxní homeostázy (Cassia *et al*. 2018). NO přímo vychytává ROS, nicméně reakce NO s ROS, hlavně s O_2^{-}•, může vytvářet jiné RNS a jejich nadbytek způsobuje tzv. nitrosační stres (Lamattina *et al*., 2003; Corpas *et al*., 2011). Reakcí NO s O_2^{-}• vzniká silný oxidant $ONOO^-$ (Uppu, 2006). Dále může NO interagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku oxidu dusičitého. Při nízkých koncentracích je schopen NO zachytávat OH• a vysokovalenční kovové komplexy, což mu dodává antioxidační vlastnosti. Dále inhibuje peroxidaci lipidů a oxidaci proteinů (Fancy *et al*., 2017). NO se účastní řady fyziologických procesů rostlin, včetně klíčení semen, senescence a spouští genovou expresi obranných proteinů v reakci na stres (Obr. 10A) (Parankusam *et al*., 2017). Aby se zabránilo toxicitě nitrosačního stresu, ukládá se NO v buňce v podobě GSNO (Cassia *et al*., 2018).

Důležitou vlastností NO je účast na posttranslačních modifikacích, jako je S-nitrosylace a nitrace proteinů. V případě S-nitrosylace dochází k vazbě molekuly NO na SH skupinu cysteinu za vzniku RSNO. Tato PTM je zapojena v procesech fotosyntézy, zpracování genetické informace, ochrany před oxidačním stresem, v rámci obranných reakcí vyvolaných působením biotických a abiotických stresových faktorů a hormonální signalizace. Při nitraci zprostředkované zejména peroxydusitany dochází k vazbě nitroskupiny ($-NO_2$) na tyrosin (Freschi, 2013). Kromě S-nitrosylace a tyrosinové nitrace zahrnuje PTM také nitrosaci kovů, kdy se NO váže na většinu přechodných kovů v jejich iontové formě, a to zejména na železo (Fe^{2+} nebo Fe^{3+}), měď (Cu^{2+}) nebo zinek (Zn^{2+}) za vzniku komplexů kovových nitrosylů (Obr. 10B). Nitrosace kovů může účinně blokovat peroxidaci kovů, čímž zabraňuje produkci ROS (Leitner *et al*., 2009; Fancy *et al*., 2017). NO má vyšší afinitu k Fe^{2+} než k Fe^{3+} iontům a jeho interakce se železem v hemové skupině je významnou biologickou interakcí (Cooper, 1999; Fancy *et al*., 2017). Tyto chemické modifikace představují centrální mechanismus, kterým NO ovlivňuje signální dráhy odpovědné za kontrolu vývoje

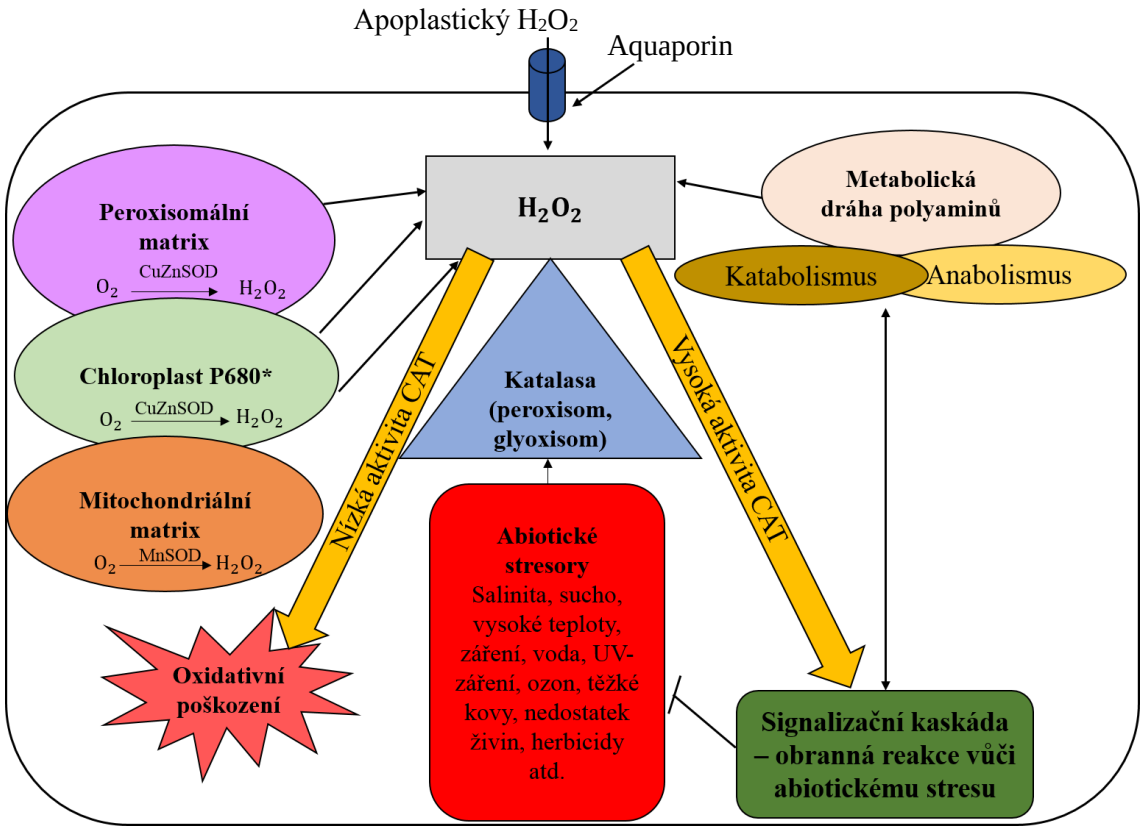
rostlin a jejich metabolismu. Vliv NO na produkci hormonů na základě PTM reakcí může být realizován prostřednictvím tří odlišných mechanismů. První mechanismus zahrnuje modifikace proteinů závislých na NO (např. transkripční faktory, regulační proteiny a kanály), jejichž funkce nemusí být přímo spojena s metabolismem, distribucí nebo signalizací rostlinného hormonu, ale naopak mohou ovlivňovat množství jiných proteinů zapojených do těchto specifických rolí. Naproti tomu druhá a přímá cesta zahrnuje PTM proteinů NO přímo spojených s produkcí, degradací, konjugací, transportem, percepcí nebo signálním přenosem rostlinných hormonů. Například v prvním mechanismu NO může modifikovat transkripční faktor, který stimuluje produkci hypotetického enzymu zodpovědného za degradaci hormonů, zatímco ve druhém mechanismu by NO přímo ovlivňoval a modifikoval aktivitu, stabilitu anebo buněčnou lokalizaci tohoto degradačního enzymu. Třetí možnost, která byla nedávno popsána, zahrnuje přímou chemickou reakci mezi deriváty NO (např. peroxydusitanem) a určitými hormony (např. zeatinem), vedoucí k tvorbě produktů se změněnou biologickou aktivitou (Freschi, 2013).



Obr. 10 Role oxidu dusnatého (NO) a jeho účast na posttranslačních modifikacích. A) Přehled produkce NO a její vliv na rostliny během teplotního stresu. Teplotní stres spouští akumulaci NO převážně zatím neobjasněnou dráhou NOS (NO syntasa) či dráhou závislou na dusitanech (NR, nitrátreduktasa). NO může být také vytvořen z polyaminů anebo reverzibilní regulací S-nitrosoglutathionu (GSNO) působením S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR). Hladiny NO mají vliv v rostlinných buňkách při působení teplotního stresu zejména na fotosyntetické procesy, klíčení, aktivaci antioxidačních enzymů, ochranu membrány, akumulaci osmolytů a posttranslační modifikace. Signální dráhy NO zprostředkované CDPK (proteinkinasy závislé na vápníku) či MAPK (mitogenem aktivované proteinkinasy) ovlivňují genovou expresi, uzvírání stomat či aktivaci Hsf (heat shock faktory). (převzato a upraveno z Parankusam *et al*., 2017). B) Posttranslační modifikace závislé na NO. 1) S-nitrosylace cysteinových zbytků, 2) nitrace tyrosinu, 3) nitrosylace kovů (převzato a upraveno z Freschi, 2013).

2.1.6 Úloha polyaminů v obranných mechanismech rostlin v reakci na abiotický stres

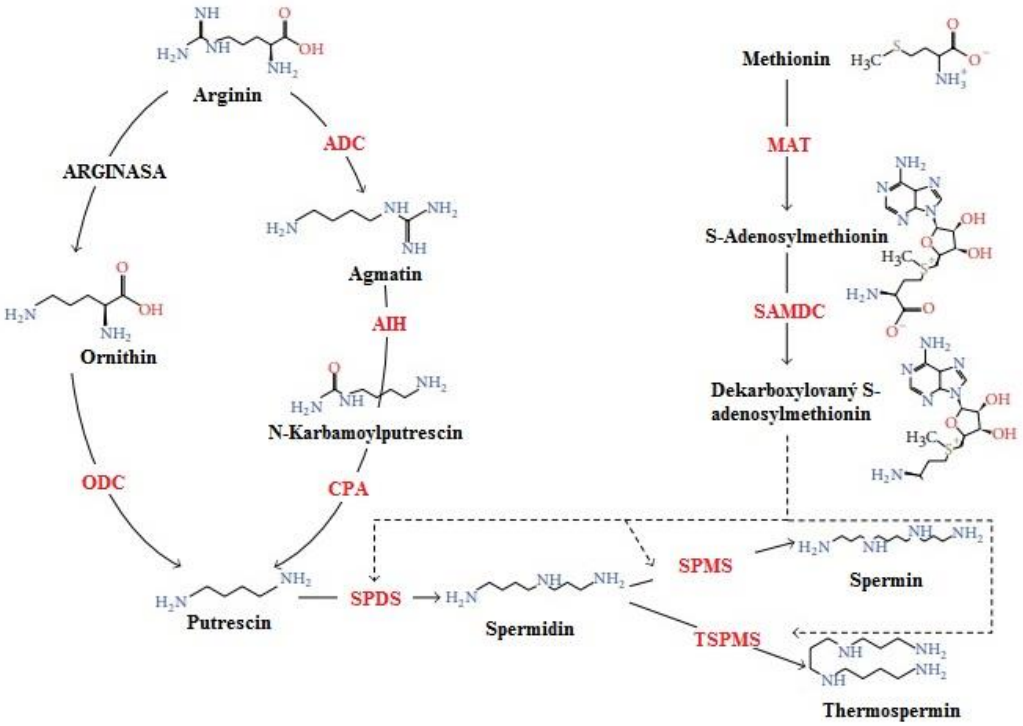
PA jsou alifatické organické sloučeniny s variabilními uhlovodíkovými řetězci a dvěma nebo více aminoskupinami. Nejčastějšími zástupci PA jsou putrescin (Put), spermidin (Spd), spermin (Spm), kadaverin (Cad) a thermospermin (tSpm) (Sequera-Mutiozabal *et al*., 2017). V buňkách jsou PA přítomné jak ve volné, tak vázané formě s fenolickými kyselinami nebo mohou interagovat elektrostatickými vazbami s řadou buněčných makromolekul, jako jsou DNA, RNA a proteiny, a tak ovlivnit jejich stabilizaci či destabilizaci (Groppa a Benavides, 2008; Alcázar *et al*., 2010; Asthir a Kumari, 2017). PA ovlivňují životní cyklus rostlin, včetně buněčného dělení, elongace, morfogeneze, klíčení semen, kvetení a senescence. Také jsou významně zapojeny v reakcích rostlin na různé biotické a abiotické stresy. Příčinou zvýšené tolerance rostlin vůči stresu při fyziologickém pH může být polykationtová povaha PA (Diao *et al*., 2016). PA stabilizují biologické membrány a buněčné struktury přímou vazbou na membránové fosfolipidy (Roychoudhury *et al*., 2011; Asthir a Kumari, 2017). Podílejí se na procesech replikace, transkripce, translace a regulují genomovou aktivitu (Gupta *et al*., 2013). Za stresových podmínek se mění obsah PA a dochází k jejich katabolismu pomocí diaminoxidas (DAO, EC 1.4.3.22) a polyaminoxidas (PAO, EC 1.5.3.11) za současného uvolnění H_2O_2 (Asthir a Kumari, 2017). Oxidace PA je také podstatná pro signální mechanismy spojené s adaptací rostlin na abiotický stres a odpovědi na odolnost vůči onemocnění. Tvorba H_2O_2 oxidačními cestami PA je úzce spojena se zvýšenou odolností vůči patogenům a tolerancí vůči abiotickému stresu. Vytvořený H_2O_2 může indukovat expresi různých obranných nebo stresových genů (Neill *et al*., 2002). Klíčovým enzymem, který reguluje hladinu H_2O_2 je enzym CAT. Studie ukázaly, že CAT může za 1 minutu rozložit na H_2O a O_2 asi šest milionů molekul H_2O_2. Tento enzym je tak jedním z hlavních enzymů podílejících se na detoxikaci H_2O_2. PA mají přímý nebo nepřímý vliv na hladinu CAT během působení abiotického stresu, čímž tvoří provázanou síť tolerance vůči stresu (Obr. 11) (Gupta *et al*., 2016).



Obr. 11 Vzájemný vztah mezi buněčným peroxidem vodíku (H_2O_2), metabolismem polyaminů (PA) a různými formami abiotických stresů s důrazem na úlohu antioxidačního enzymu katalasy (CAT) (převzato a upraveno z Gupta *et al*., 2016).

2.1.6.1 Biosyntéza polyaminů

Biosyntéza PA je zahájena tvorbou diaminu Put. U savců a hub je Put tvořen z ornitinu v reakci katalyzované ornitindekarboxylasou (ODC, 4.1.1.17). U rostlin a bakterií, existuje však alternativní cesta, kdy je Put syntetizován z argininu v reakci katalyzované arginindekarboxylasou (ADC, 4.1.1.19), následované dvěma po sobě jdoucími kroky katalyzované agmatiniminohydrolasou (AIH, EC 3.5.3.12) a N-karbamoylputrescinamidohydrolasou (CPA, EC 3.5.1.53) (Slocum *et al*., 1984; Alcázar *et al*., 2010). ADC je limitujícím krokem v biosyntéze Put v rostlinách (Alcázar *et al*., 2005). Triaminy (Spd) a tetraaminy (Spm a tSpm) jsou syntetizovány aminopropyltransferasami (APT, EC 2.5.1.16), které přenášejí aminopropylové zbytky na akceptory aminů (Put nebo Spd), čímž vzniká Spd, Spm nebo jejich izomery. Donorem aminopropylových skupin je dekarboxylovaný S-adenosylmethionin (dSAM), který je vytvořen v reakci katalyzované SAM dekarboxylasou (SAMDC, EC 4.1.4.50). 5'-Methylthioadenosin (MTA) pocházející z dSAM je obnoven po biosyntéze Spd nebo Spm přes methioninový cyklus, který vede k SAM (Obr. 12) (Shao *et al*., 2012; Tiburcio *et al*., 2014).



Obr. 12 Biosyntetická dráha polyaminů. ADC arginindekarboxylasa (EC 4.1.1.19), AIH agmatiniminohydrolasa (EC 3.5.3.12), CPA N-karbamoylputrescinamidohydrolasa (EC 3.5.1.53), MAT S-adenosylmethioninsynthetasa nebo methioninadenosyltransferasa (EC 2.5.1.6), ODC ornithindekarboxylasa (EC 4.1.1.17), SAMDC S-adenosylmethiondekarboxylasa (EC 4.1.4.50), SPDS spermidinsyntasa (EC 2.5.1.16), SPMS sperminsyntasa (EC 2.5.1.22), TSPMS thermosperminsyntasa (EC 2.5.1.79) (převzato a upraveno z Rangan *et al*., 2014).

2.1.7 Enzymy podílející se na regulaci hladiny polyaminů a aminoaldehydů

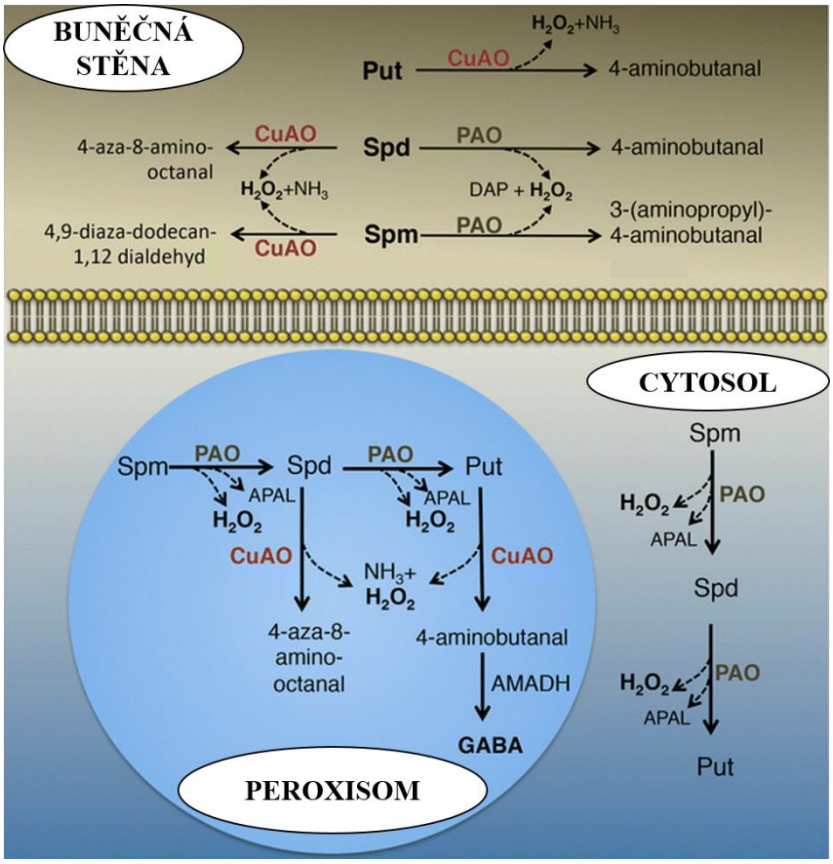
2.1.7.1 Aminoxidasy

PA jsou oxidačně deaminovány aminoxidasami (AO) za vzniku příslušného aminoaldehydu a H_2O_2. Na základě rozdílného kofaktoru jsou AO klasifikovány jako AO obsahující měď (CuAO, EC 1.4.3.6) a FAD-dependentní polyaminoxidasy (PAO, EC 1.5.3.3), které se liší jak podle typu preferovaného substrátu, tak mechanismu jeho oxidace a buněčné lokalizace (Tiburcio *et al*., 2014).

CuAOs jsou homodimerní enzymy s vysokou afinitou pro oxidaci primárních aminoskupin Put a Cad a nižší afinitou k Spd a Spm (Moschou *et al*., 2012). Jako produkt vzniká 4-aminobutanal (ABAL), který spontánně cyklizuje na Δ^1-pyrrolin a dále může být přeměněn na aminokyselinu γ-aminomáselnou (GABA) aminoaldehyddehydrogenasou (AMADH, EC 1.2.1.19 nebo 1.2.1.54) (Obr. 13) (Šebela

et al., 2000; Petřivalský *et al*., 2007). Rostlinné CuAOs se vyskytují ve vysokých hladinách u čeledi bobovitých rostlin (*Fabaceae*) a volně se sdružují s buněčnými stěnami (Cona *et al*., 2006). Modelová rostlina *A. thaliana* nese deset předpokládaných genů kódujících CuAO, z nichž čtyři (*ATAO1* a *AtCuAO1-3*) byly charakterizovány. Exprese genů *CuAO* je diferencovaně modulována během vývoje, mechanického poškození a aplikace hormonů nebo elicitorů. CuAO proteiny se také liší v lokalizaci, přičemž AtCuAO1 a ATAO1 jsou apoplastické, zatímco AtCuAO2 a AtCuAO3 jsou peroxisomální (Møller a McPherson, 1998; Planas-Portell *et al*., 2013).

PAO katalyzují oxidaci Spm a Spd na ABAL (cyklizace za vzniku 1-pyrrolinu) nebo 1-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal (APBAL) (cyklizace za vzniku 1,5-diazabicyklo[4.3.0]nonanu), propan-1,3-diamin a peroxid vodíku (Obr. 13) (Šebela *et al*., 2001a). PAO byly zatím nalezeny u rostlin a bakterií. Ve velkém množství jsou přítomny u rostlin patřících do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Tyto enzymy byly nalezeny u kukuřice (*Zea mays*), ječmene (*Hordeum vulgare*), pšenice (*Triticum aestivum*) a žita (*Secale cereale*) (Šebela *et al*., 2001a). Z jednoděložných rostlin, které nepatří do této čeledi, byly PAO objeveny u vodního hyacintu (*Eichhornia crassipes*) (Yanagisawa *et al*., 1987) a lilie (*Lilium longiflorum*) (Yanagisawa *et al*., 1996). U dvouděložných rostlin byla aktivita PAO detekována u vojtěšky (*Medicago sativa*), nicméně podrobné vlastnosti enzymu nejsou objasněny (Bagga *et al*., 1991). Oxidace PA pomocí AO nejen přispívá k regulaci homeostázy PA, ale také vytváří katabolické produkty spojené s biologickými funkcemi. H_2O_2 vytvořený během reakcí katalyzovaných AO přispívá k otevření stomat a programované smrti buněk a GABA produkovaná terminální oxidací Put a Spd hraje roli ve stresové signalizaci (Cona *et al*., 2006; Angelini *et al*., 2010; Tiburcio *et al*., 2014).

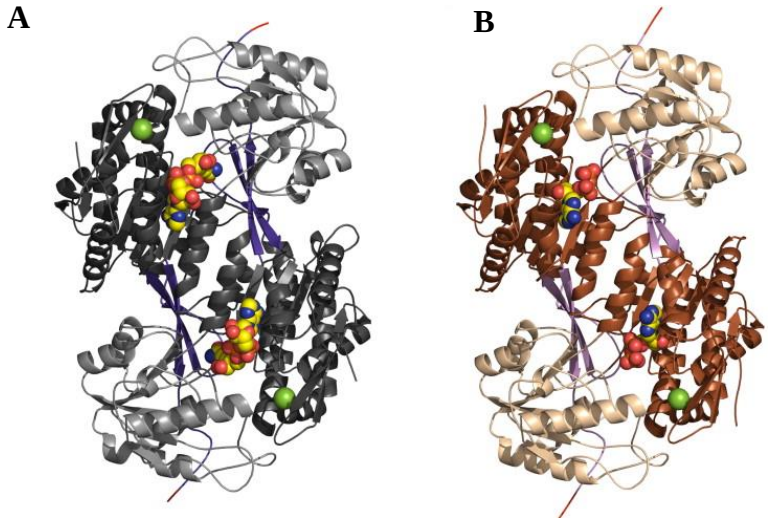


Obr. 13 Oxidační dráhy polyaminů (PA) v cytosolu, apoplastu a peroxisomech. PA jsou oxidačně deaminovány aminoxidasami obsahující měď (CuAO, EC 1.4.3.6) a FAD-dependentními polyaminoxidasami (PAO, EC 1.5.3.3) na peroxid vodíku (H_2O_2) a odpovídající aminoaldehydy. CuAO katalyzují oxidaci putrescinu (Put) na 4-aminobutanal a spermidinu (Spd) a sperminu (Spm) na 4-aza-8-amino-oktanal nebo 4,9-diaza-dodekan-1,12 dialdehyd. PAO katalyzují terminální oxidaci Spd nebo Spm za tvorby 4-aminobutanalu nebo 3- (aminopropyl) -4-aminobutanalu (APBAL). Zpětnou konverzí Spm na Spd a Spd na Put za účastí PAO je tvořen APBAL. AMADH aminoaldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.19), DAP diaminopropan, GABA kyselina γ-aminomáselná (převzato a upraveno z Tiburcio *et al*., 2014)

2.1.7.2 Aminoaldehyddehydrogenasa

AMADH patří k velké skupině aldehyddehydrogenas (ALDH) a to konkrétně k rodině ALDH9. Rodina ALDH9 propojuje tři nesouvisející metabolické dráhy – metabolismus PA, cholinu a lysinu. Na základě substrátové specificity lze řadit ALDH9 do různých skupin: 4-aminobutyraldehyddehydrogenasy (ABALDH, EC 1.2.1.19), 4-guanidinobutyraldehyddehydrogenasy (GBALDH, EC 1.2.1.54), betainaldehyddehydrogenasy (BADH, EC 1.2.1.8) a 4-trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasy (TMABALDH, EC 1.2.1.47). ABALDH a GBALDH patří mezi AMADH, které katalyzují oxidaci ω-aminoaldehydů odvozených od PA na odpovídající ω-aminokyseliny za využití NAD^+ jako kofaktoru (Tylichová *et al*., 2010). Oxidačním štěpením PA Spd a Spm rostlinnými PAO se

vytváří ABAL a APBAL za současné tvorby 1,3-diaminopropanu a H_2O_2 (Šebela *et al*., 2000; Missihoun *et al*., 2011). Další oxidací 1,3-diaminopropanu vzniká 3-aminopropionaldehyd (APAL), přímý prekurzor β-alaninu, který může být zase trimetylován za vzniku osmoprotektivního β-alaninbetainu (Duhazé *et al*., 2002). ABAL je oxidován na GABA, která je při fyziologických hodnotách pH vysoce rozpustná ve vodě (Shelp *et al*., 1999). GABA působí v rámci osmotické regulace, detoxikace reaktivních kyslíkových radikálů, konverze Put na prolin a intracelulární signální transdukci (Kinnersley a Turano, 2000; Bouche a Fromm, 2004). AMADH jsou součástí katabolismu PA a podílejí se na reakci rostlin vystavených působení stresových faktorů právě produkcí GABA (Cona *et al*., 2006; Petřivalský *et al*., 2007). V hrachu byly nalezeny dvě isoformy AMADH PsAMADH1 a PsAMADH2, které jsou tvořené 503 aminokyselinami a z 80 % jsou sekvenčně identické (Šebela *et al*., 2000; Brauner *et al*., 2003). Oba izoenzymy jsou dimerní a každý monomer má oligomerizační, koenzymovou vazebnou a katalytickou doménu. Každá podjednotka váže NAD^+ jako koenzym, obsahuje rozpoznávací C-terminální peroxisomální cílový signál a kation vázaný v dutině blízko vazebného místa NAD^+ (Obr. 14) (Tylichová *et al*., 2010).



Obr. 14 Struktura dvou isoforem aminoaldehyddehydrogenasy izolované z *Pisum sativum* (PsAMADH). A) Isoforma PsAMADH1, katalytická doména – světle šedá, koenzymová vazebná doména – černá, oligomerizační doména – modrá. B) Isoforma PsAMADH2; katalytická doména – béžová, koenzymová vazebná doména – hnědá, oligomerizační doména – fialová. Kovový ion – zelená, koenzym NAD^+ - barevné značení atomů, peroxizomální signální sekvence na C-konci – červená (převzato a upraveno z Tylichová *et al*., 2010).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

V experimentální části diplomové práce byly použity dva kultivary hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč, *P. sativum* cv. Twinset) (Obr. 15). *P. sativum* cv. Twinset vykazuje odolnost vůči padlí, fusariovému vadnutí a k viru hrachové mozaiky PSbMV (Pea Seed-borne Mosaic Virus) (SEMO a.s., ©2019). *P. sativum* cv. Kudrnáč je naopak k těmto chorobám citlivý. Osivo bylo dodáno společností SEMO a.s. zabývající se šlechtěním, produkcí a prodejem osiv zeleniny, květin, léčivých a aromatických rostlin.

Obr. 15 Kultivary hrachu setého. A) *Pisum sativum* cv. Kudrnáč B) *Pisum sativum* cv. Twinset

3.1.2 Chemikálie

AppliChem (Německo): dodecylsíran sodný (SDS)

Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo): 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát (BCIP), nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+), nitrotetrazoliová modř (NBT), Tween-20

Bio-Rad (USA): Precision Plus Protein Dual Xtra Standard

Cell Signaling (USA): anti-myší sekundární protilátka značená alkalickou fosfatasou

Duchefa Biochemie (Nizozemsko): kyselina L-askorbová

Fluka (Švýcarsko): dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na^+ EDTA), pefabloc ® SC

Ing. Petr Švec – PENTA (Česká republika): dihydrogenfosforečnan draselný, peroxid vodíku

Lach-Ner (Česká republika): ethanol, hydrogenfosforečnan draselný, kyselina chlorovodíková, methanol,

Messer (Česká republika): dusík kapalný

Serva (Německo): křenová peroxidasa

Sigma-Aldrich (Německo): akrylamid (AA), 1-amino-3,3-diethoxypropan (APAL), 4-amino5-methylamino-2′,7′-difluorofluoresceindiacetát (DAF-FM DA), beta-merkaptoethanol, bromfenolová modř, 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H_2DCF DA), dihydrochlorid putrescinu, dithiotreitol (DTT), glycerol, glycin, hovězí sérový albumin (BSA), kozí anti-králičí sekundární protilátka značená alkalickou fosfatasou, n-butanol, N,N'-methylenbisakrylamid (BIS), N,N,N′,N′-tetramethylethylendiamin (TEMED), 2-methoxyfenol (guajakol), myší monoklonální protilátka anti-Hsp70, persíran amonný (APS), poly(vinylpolypyrrolidon) (PVPP), Ponceau S, sušené mléko (Skim milk Powder), tris(hydroxymethyl)aminomethanu (TRIS)

Unilever (Česká republika): SAVO

3.1.3 Přístroje a zařízení

Analytické předvážky (Radwag, Polsko); analytické váhy (Denver instrument, USA); automatické pipety (Eppendorf, Německo), blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA); blotovací systém Trans-Blot semi-dry transfer cell (Bio-Rad, USA); detekční zařízení Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA); digitální předvážky (KERN, Německo); digitální pH metr (Multical WTW, Německo); centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); exsikátor (Kavalierglass, Česká republika); fluorescenční mikroskop BX50 (Olympus, Japonsko); inkubátor Memmert IF (Verkon, Česká republika); minicentrifuga MPW-15 (Verkon, Česká republika); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mrazicí box (Electrolux, Švédsko); mrazící box (SANYO, Japonsko); nitrocelulosová membrána 0,45 μm (Bio-Rad, USA); polyvinylidendifluoridová membrána 0,2 μm (Bio-Rad, USA); spektrofotometr Synergy HT (Biotek, USA); termoblok (Biosan, Lotyšsko); třepačka 3D (BioSan, Litva); vortex (Biosan, Lotyšsko); zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (Bio-Rad, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Příprava rostlinného materiálu

Semena hrachu setého byla sterilizována 2 minuty v 3% (v/v) roztoku SAVO Original a poté 10x promyta vodou. Po 24 h bobtnání byla semena přenesena do čtvercových Petriho misek na navlhčený filtrační papír a ponechána 3 dny klíčit při teplotě 25 °C. Poté byla naklíčená semena přesazena do hydroponie s ¼ Hoaglandovým roztokem (Tab. 2). Rostliny byly pěstovány 7 dní ve fytotronu za podmínek světelného režimu

12 h světlo/12 h tma a teploty 25 °C. 7denní rostliny hrachu setého byly vystaveny působení zvýšené teploty 45 °C. Pro studium vlivu krátkodobého TS byla část rostlin vystavena teplotě 45 °C pouze po dobu 2 h a poté byly rostliny pěstovány za standardních podmínek při 25 °C. V časových intervalech 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 a 24 h po zahájení experimentu byly odebírány rostliny pěstované za stálého TS a rostliny vystavené pouze krátkodobému (2 h) TS. Byla oddělena kořenová část od nadzemní části a vzorky byly zamraženy při -80°C. Kořeny a nadzemní část byly také odebrány kontrolním nestresovaným rostlinám pěstovaným za standardních podmínek při 25 °C.

Tab. 2 Příprava Hoaglandova roztoku. KNO_3 dusičnan draselný, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ tetrahydrát dusičnanu vápenatého, $NH_4H_2PO_4$ dihydrogenfosforečnan amonný, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ heptahydrát síranu hořečnatého, H_3BO_3 kyselina boritá, KCl chlorid draselný, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ pentahydrát síranu manganatého, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ heptahydrát síranu zinečnatého, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ pentahydrát síranu měďnatého, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ tetrahydrát molybdenanu amonného, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ heptahydrát síranu železnatého, Na_2EDTA sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, FeEDTA železita sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové.

Chemická látka	**Koncentrace zásobního roztoku [mmol·l^{-1}]**	**Molekulová hmotnost [g·mol^{-1}]**	**Objem [ml·l^{-1}]**	**Výsledná koncentrace [µmol·l^{-1}]**
KNO_3	1000	101,1	1,5	1500
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	1000	236,16	1	1000
$NH_4H_2PO_4$	1000	115,08	0,5	500
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1000	246,49	0,25	250
H_3BO_3	25	61,84	0,5	12,5
KCl	50	74,5	1	50
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	2	241,08		2
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2	287,55		2
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,5	249,75		0,5
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,5	1235,95		0,5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (FeEDTA)	20	278,02	1	20
Na_2EDTA (FeEDTA)	20	372,24		20

3.2.2 Zpracování rostlinného materiálu

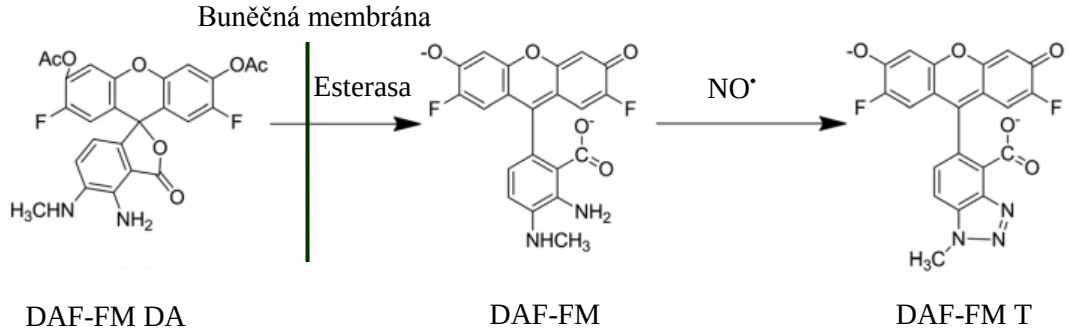
Ze zmražených vzorků rostlin byl připraven homogenizací v tekutém dusíku směsný vzorek, který byl po 250 mg rozdělen do mikrozkumavek a uchováván v mrazicím boxu při -80°C pro další práci. Směsný vzorek kořenové i nadzemní části pro každý časový interval byl připraven z 5-7 rostlin. Pro extrakci byl použit pufr o složení: 0,1 $mol \cdot l^{-1}$ K-fosfátový pufr, 1% (w/v) PVPP, 2 $mmol \cdot l^{-1}$ DTT, 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$ pefabloc, 2 $mmol \cdot l^{-1}$ EDTA v poměru 1:2. Suspenze byla ponechána 20 minut na ledu za stálého protřepávání a poté byla centrifugována 20 minut při 16 000 *g* a teplotě 4 °C.

3.2.3 Histochemická detekce reaktivních forem dusíku a kyslíku využitím fluorescenčních sond

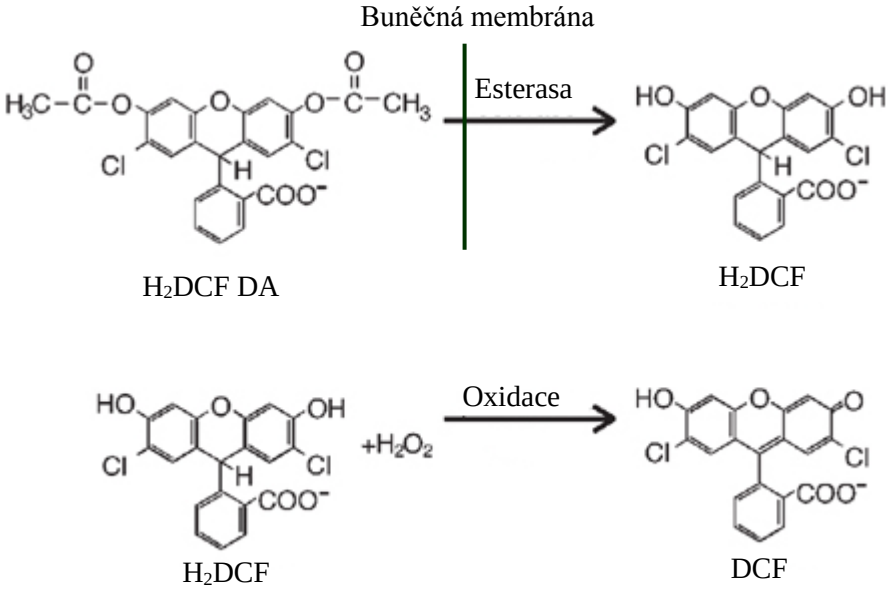
Pro histochemickou detekci NO se používá membránově propustný 4-amino-5-methylamino-2´,7´-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA), který je intracelulárními esterasami hydrolyzován na nepropustný DAF-FM (Obr. 16). Po reakci s NO je detekován fluorescenční signál (λ_{exc} - 495 nm, λ_{em} - 515 nm) (Kojima *et al*., 1999).

Pro detekci RNS a ROS lze využít fluorescenční sondu 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H_2DCF DA), která má schopnost procházet přes buněčné membrány. Intracelulární esterasy přeměňují H_2DCF DA na H_2DCF, který se oxiduje v přítomnosti H_2O_2, $OH^{\bullet}$, $ROO^{\bullet}$, $NO^{\bullet}$ a NOO^- na fluorescenční DCF (Obr. 17). Po reakci je detekován fluorescenční signál (λ_{exc} - 498 nm, λ_{em} - 522 nm) (Kojima *et al*., 1999).

V daný časový interval byl z kontrolních a teplotně stresovaných rostlin obou kultivarů hrachu setého odříznut vzrostný vrchol postranního kořene o délce 0,5 cm, který byl vložen na 1 resp. 2 min do 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$ H_2DCF DA, resp. DAF-FM DA. Po 3x promytí v destilované vodě byly vzorky přeneseny do 50% (v/v) glycerolu na podložním skle a mikroskopovány (detekce zelené fluorescence).



Obr. 16 Reakce flourescenční sondy 4-amino-5-methylamino-2´,7´-difluorofluorescein diacetátu (DAF-FM DA), který je intracelulárními esterasami hydrolyzován na nepropustný 4-amino-5-methylamino-2´,7´-difluorofluorescein (DAF-FM). NO oxid dusnatý (převzato a upraveno z Mainz *et al*., 2012).



Obr. 17 Reakce fluorescenční sondy 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetátu (H_2DCF DA), který je intracelulárními esterasami přeměňován na 2,7-dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF), který se oxiduje na fluorescenční dichlorofluorescein (DCF) (převzato a upraveno z Hensley *et al*., 2003).

3.2.4 Spektrofotometrické stanovení proteinových S-nitrosothiolů

Stanovení celkového obsahu S-nitrosothiolů (RSNO) je založeno na detekci a kvantifikaci reaktivních oxidů dusíku NO^+ uvolněných rozkladem RSNO v přítomnosti rtuťnatých solí (Savillova metoda). Vzniklý dusitan reagující s modifikovaným Griessovým činidlem je detekován tvorbou diazoniové soli, která kopuluje s N-(naftylethylen)diaminem (NED) za tvorby azobarviva, které lze detekovat spektrofotometricky při 540 nm. Pro kalibraci se používá GSNO (Saville, 1958).

Byla připravena kalibrační řada standardů GSNO v 0,5 $mol \cdot l^{-1}$ HCl o koncentracích 5, 10, 25, 50, 75, a 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 µl standardu/vzorku. Jako blank byla v případě standardu použita 0,5 $mol \cdot l^{-1}$ HCl a pro vzorky byl použit extrakční pufr. Dále bylo přidáno 100 µl činidla A (3,5% (w/v) sulfanilamid v 0,5 $mol \cdot l^{-1}$ HCl) nebo B (3,5% (w/v) sulfanilamid v 0,5 $mol \cdot l^{-1}$ HCl a 1% (w/v) $HgCl_2$) a směs byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo napipetováno 100 µl činidla NED (0,1% (w/v) NED v deionizované vodě) a po pětiminutové inkubaci při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 540 nm vůči blanku. Koncentrace RSNO byla poté odečtena z rovnice lineární regrese sestavené z měření kalibračních standardů GSNO.

3.2.5 Detekce aminoaldehyddehydrogenasy metodou Western blot

SDS-PAGE je biochemická metoda, která se využívá k separaci proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti. SDS je anionaktivní detergent, který maskuje individuální náboj proteinů, a vznikají záporně nabité denaturované částice, jejichž náboj je přímo úměrný jejich hmotnosti. Pohyblivost molekul závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekul, podmínkách prostředí a síle elektrického pole (Laemmli, 1970).

Do aparatury pro přípravu gelu byla upevněna skla, která byla předem očištěna 96% ethanolem. Dle Tab. 3 byl nejprve připraven 10% dělící polyakrylamidový gel, který byl po přídavku 10% APS zahajujícího polymeraci, rychle nanesen do prostoru mezi skly. Následně byl převrstven n-butanolem a 15 minut ponechán tuhnout. Po zatuhnutí dělícího gelu byl n-butanol odstraněn a povrch gelu byl opláchnut destilovanou vodou, jejíž zbytek se odsál pomocí filtračního papíru. Poté byl dělící gel převrstven 4% zaostřovacím gelem připraveným dle Tab. 3 a do gelu byl vložen hřebínek pro vytvoření jamek. Po zatuhnutí zaostřovací gelu (30 minut) byla skla s gely umístěna do elektroforetické komůrky. Vnitřní prostor komůrky byl naplněn elektrodovým pufrem (0,025 $mol \cdot l^{-1}$ Tris-HCl; 0,192 $mol \cdot l^{-1}$ glycin; 0,1% (w/v) SDS) a z gelu byl vytažen hřebínek. Po nanesení vzorků do jamek byla komůrka vložena do elektroforetické vany, byl doplněn elektrodový pufr po značku na vaně. Elektroforetická separace zpočátku probíhala při konstantním napětí 120 V v zaostřovacím gelu, následně bylo napětí zvýšeno na 200 V.

Vzorky byly připraveny smícháním rostlinného extraktu s 4x koncentrovaným Laemmliho vzorkovacím pufrem (40% (v/v) glycerol; 240 $mmol \cdot l^{-1}$ Tris-HCl, pH 6,8;

8% (w/v) SDS; 0,04% (w/v) bromfenolová modř; 5% (v/v) beta-merkaptoethanol) v poměru 3:1 a inkubovány 10 minut při teplotě 95°C. Poté byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu a naneseny do jamek. Do první jamky bylo napipetováno 5 µl komerčního standardu molekulové hmotnosti Precision Plus Protein Dual Xtra Standard a do následujících jamek 15 µl připravených vzorků.

Následně byla provedena metoda přenosu proteinů z gelu na membránu, tzv. semi-dryblotting. Byly připraveny nitrocelulosová (NC) nebo polyvinylidendifluoridová (PVDF) membrána a blotovací papír o rozměrech 8,5x7 cm, které byly ponořeny do blotovacího pufru (0,025 $mol \cdot l^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,3; 0,192 $mol \cdot l^{-1}$ glycin, 20% (v/v) methanol). Na spodní elektrodu (anodu) byl umístěn blotovací papír, membrána, gel a blotovací papír v uvedeném pořadí. Po přiložení druhé elektrody (katoda) byla blotovací kazeta připojena ke zdroji napětí. Přenos proteinů probíhal při konstantním proudu 192 mA po dobu 2 h. Poté byla membrána promyta destilovanou vodou a 10 minut inkubována s barvivem Ponceau S pro vizualizaci přenosu proteinů z gelu na membránu. Po odbarvení membrány v destilované vodě byla přenesena do blokovacího roztoku, tj. 5% (w/v) roztoku sušeného mléka nebo 5% (w/v) roztoku BSA v TBST pufru. Po 1 h blokování byla membrána přes noc inkubována v roztoku primární králičí polyklonální protilátky anti-AMADH v 5% (w/v) roztoku sušeného mléka nebo 5% (w/v) roztoku BSA (ředění 1:500 - 1:1500 v rámci optimalizace experimentu). Primární polyklonální protilátka anti-AMADH byla připravena metodou intradermální aplikace purifikovaného rekombinantního proteinu AMADH z *P. sativum* (Tylichová *et al.*, 2008).

Následně byla membrána promyta čtyřikrát po 15 minutách roztokem TBST a následně přenesena do roztoku kozí anti-králičí sekundární protilátky značené alkalickou fosfatasou v 5% (w/v) roztoku sušeného mléka nebo 5% (w/v) BSA (ředění 1:2500). Po 2h inkubaci byla membrána opět čtyřikrát promyta roztokem TBST a následně byl přidán barvící roztok NBT-BCIP (10 ml alkalického fosfatasového pufru (AP), 33 µl NBT roztoku a 33 µl BCIP roztoku). Po vyvinutí tmavě fialového zbarvení detekovaných bandů se reakce zastavila propláchnutím destilovanou vodou, membrána se usušila, zdokumentovala a vyhodnotila v programu ImageJ.

Tab. 3 Objemy roztoků pro přípravu 10% dělícího a 4% zaostřovacího polyakrylamidového gelu. Rozpis je uveden pro 4 gely o tloušťce 0,75 mm. AA/BIS akrylmid/bisakrylamid, SDS dodecylsíran sodný, APS persíran amonný, TEMED tetramethylethylendiamin.

Gel (% T)	**H_2O (ml)**	**AA/BIS (T 30%, C 2,67%) (ml)**	**1,5 mol·l^{-1} Tris/HCl; pH 8,8 (ml)**	**0,5 mol·l^{-1} Tris/HCl; pH 6,8 (ml)**	**10% (w/v) SDS (ml)**	**TEMED (ml)**	**APS (ml)**
4%	6,1	1,3	2,5	-	0,1	0,01	0,1
10%	8,2	6,6	-	5	0,2	0,02	0,2

Složení použitých roztoků:

AA/BIS roztok (T 30%, C 2,67%): 9,2% (w/v) AA, 0,8% (w/v) BIS, destilovaná voda

TBS, pH 7,5: 20 mmol·l^{-1} Tris-HCl; 0,5 mmol·l^{-1} NaCl

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

AP pufr: 100 mmol·l^{-1} Tris-HCl, pH 9,5; 5 mmol·l^{-1} $MgCl_2$; 100 mmol·l^{-1} NaCl

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

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

3.2.6 Detekce heat shock proteinů 70 metodou Western blot

Příprava vzorků pro detekci Hsp70 a separace proteinů pomocí SDS-PAGE s následným Western blotem za použití NC membrány byla provedena stejným způsobem uvedeným v kapitole 3.2.5 Detekce aminoaldehyddehydrogenasy metodou Western blot. Pro zablokování nespecifických míst byl jako blokovací roztok použit 5% (w/v) roztok sušeného mléka, poté byla membrána přenesena do roztoku primární myší monoklonální protilátky anti-Hsp70 v 5% (w/v) roztoku sušeného mléka o ředění 1:1000 a po jejím promytí v TBST byla přenesena do roztoku anti-myší sekundární protilátky značené alkalickou fosfatasou v 5% (w/v) roztoku sušeného mléka o ředění 1:2500.

3.2.7 Stanovení aktivity aminoaldehyddehydrogenasy

Rostlinné diaminoxidasy (DAO) katalyzují přeměnu propan-1,3-diaminu na 3-aminopropionaldehyd (APAL), který je oxidován NAD-dependentní aminoaldehyddehydrogenasou (AMADH) na β-alanin za současné redukce NAD^+ na NADH. Tvorbu NADH lze měřit spektrofotometricky jako nárůst absorbance při

340 nm. Hodnota molárního absorpčního koeficientu NADH je 6220 $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ (Šebela *et al*., 2000).

Aktivita AMADH byla stanovena spektrofotometricky na mikrodestičkovém readeru na základě změny absorbance při 340 nm za časovou jednotku. Do jamek mikrotitrační destičky bylo nejprve napipetováno 165 µl 150 $mmol \cdot l^{-1}$ Tris-HCl pufru o pH 9, následně 10 µl NAD^+, 15 µl neředěného rostlinného extraktu, 10 µl 0,2 $mol \cdot l^{-1}$ HCl v případě blanku a enzymová reakce byla odstartována přídavkem 10 µl 20 $mmol \cdot l^{-1}$ APAL. Nárůst absorbance při 340 nm byl měřen po dobu 11 minut při 30 °C.

3.2.8 Stanovení aktivity diaminoxidasy

Putrescin je za katalýzy DAO oxidován na aminoaldehyd a jako vedlejší produkt je uvolňován H_2O_2, který ve spřažené reakci využívá peroxidasa k oxidaci guajakolu za vzniku 3,3´-dimethoxyfenyl-4,4´-bifenochinonu. Vznikající žlutohnědé zbarvení lze pak spektrofotometricky měřit při 436 nm. Hodnota molárního absorpčního koeficientu je 4500 $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ (Medda *et al*., 1995).

Aktivita DAO byla stanovena spektrofotometricky na mikrodestičkovém readeru na základě změny absorbance při 436 nm za časovou jednotku. Reakční směs byla složena z 15 ml 100 $mmol \cdot l^{-1}$ K-fosfátového pufru o pH 7, 250 µl 35 $mmol \cdot l^{-1}$ guajakolu a 250 µl 0,01% (w/v) křenové peroxidasy. Do jamek mikrotitrační destičky bylo nejprve napipetováno 155 µl reakční směsi, 15 µl neředěného rostlinného extraktu, 5 µl destilované vody v případě blanku a reakce byla odstartována přídavkem 5 µl 87,5 $mmol \cdot l^{-1}$ putrescinu. Nárůst absorbance při 436 nm byl měřen po dobu 5 minut při 30 °C.

3.2.9 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy

V reakci katalyzované APX je H_2O_2 redukován na vodu za současné oxidace askorbátu (ASH) na monodehydroaskorbát (MDHA). Úbytek ASH lze měřit spektrofotometricky jako pokles absorbance při 290 nm. Hodnota molárního absorpčního koeficientu je 2800 $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ (Nakano a Asada, 1981).

Aktivita APX byla stanovena spektrofotometricky na mikrodestičkovém readeru na základě změny absorbance při 290 nm za časovou jednotku. Do jamek mikrotitrační destičky pro měření v UV oblasti bylo nejprve napipetováno 125 µl 100 $mmol \cdot l^{-1}$ K-fosfátového pufru o pH 6, poté 72 µl 1,75 $mmol \cdot l^{-1}$ kyseliny askorbové, 15 µl 2,5x ředěného rostlinného extraktu ve 100 $mmol \cdot l^{-1}$ K-fosfátovém pufru o pH 6, 38 µl destilované vody v případě blanku a enzymová reakce byla odstartována přídavkem

38 µl 10 mmol·l^{-1} H_2O_2. Pokles absorbance při 290 nm byl měřen po dobu 5 minut při 30 °C.

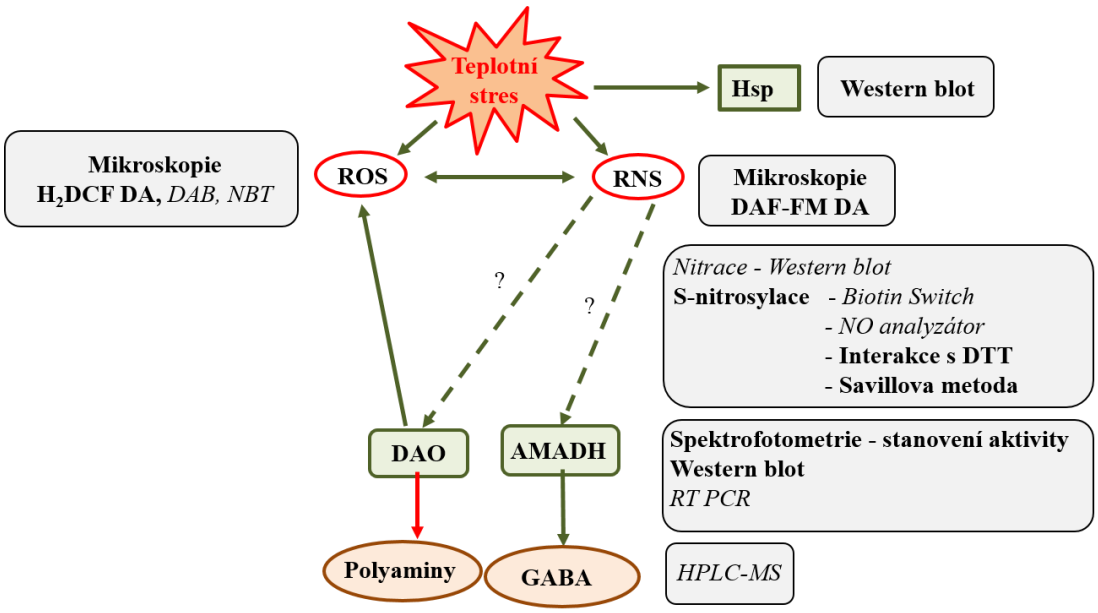
3.2.10 Stanovení proteinů metodou Bradforda

Stanovení koncentrace proteinů je založeno na interakci proteinů s barvivem Coomasie Brilliant Blue G-250 v kyselém prostředí za vzniku modrého zbarvení, které lze spektrofotometricky změřit při 595 nm (Bradford, 1976).

Do jamek mikrotitrační destičky bylo nejprve napipetováno 45 µl destilované vody, 5 µl blanku, extraktu nebo standardu BSA a 200 µl Bradfordova činidla, které bylo připraveno ředěním zásobního roztoku destilovanou vodou v poměru 1:4. Po pětiminutové inkubaci byla změřena absorbance při 595 nm. Koncentrace proteinů byla stanovena z rovnice lineární regrese optimalizované sestavením kalibrační řady BSA. Koncentrace jednotlivých standardů BSA byla 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 mg·ml^{-1}. Zásobní roztok Bradfordova činidla byl připraven rozpuštěním 50 mg Coomasie Brilliant Blue G-250 v 25 ml methanolu a 50 ml 85% (v/v) kyseliny fosforečné a vše bylo doplněno destilovanou vodou na celkový objem 100 ml.

4 VÝSLEDKY

V předložené diplomové práci jsem se zaměřila na studium obranných mechanismů u rostlin vystavených působení teplotnímu stresu (TS). Porovnala jsem reakci rostlin na krátkodobý TS, tj 2 h při 45 °C, a rostlin, které byly vystaveny teplotě 45 °C po celou dobu experimentu. Kontrolní rostliny byly pěstovány vždy za standardních podmínek při teplotě 25°C. Modelovou rostlinou byl v řešeném projektu hrach setý (*Pisum sativum*). Byly vybrány dva kultivary (*P. sativum* cv. Kudrnáč, *P. sativum* cv. Twinset). Hrách setý kultivar Twinset vykazuje odolnost vůči padlí, fusariovému vadnutí a k viru hrachové mozaiky PSbMV (Pea Seed-borne Mosaic Virus), naopak hrách setý kultivar Kudrnáč je k těmto chorobám citlivý. Předložená práce je součástí projektu zaměřeného na studium zapojení a regulace enzymů metabolismu polyaminů v obranných reakcích rostlin (Obr. 18). Byly studovány změny aktivity dvou klíčových enzymů degradace polyaminů v závislosti na teplotních podmínkách. Jedná se o enzym s AMADH a DAO aktivitou. V návaznosti na současně probíhající studie, poukazující na možnost regulace aktivity AMADH S-nitrosylací, byly provedeny orientační experimenty, jako je Savillova metoda nebo reakce s dithiothreitolem (DTT) poukazující na možnost uplatnění tohoto typu regulace enzymové aktivity i u AMADH hrachu setého vystaveného působení TS. Pro jednoznačné potvrzení regulace AMADH S-nitrosylací bude nutné dosažené výsledky dále doplnit experimenty uvedenými kurzívou v Obr. 18, jako je např. metoda biotin switch.



Obr. 18 Návrh experimentů v rámci studia možnosti regulace aktivity enzymů degradace polyaminů S-nitrosylací. Tučně jsou vyznačeny experimenty realizované v diplomové práci, kurzívou navazující experimenty. AMADH aminoaldehydehydrogenasa, DAB 3,3'-diaminobenzidin, DAF-FM DA 4-amino-5-methylamino-2´,7´-difluorofluorscein diacetát, DAO diaminoxidasa, DTT dithiothreitol, H_2DCF DA 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát, HPLC-MS vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, Hsp heat shock proteiny, GABA kyselina γ-aminomáselná, RNS reaktivní formy dusíku, ROS reaktivní formy kyslíku, NBT nitrotetrazoliová modř.

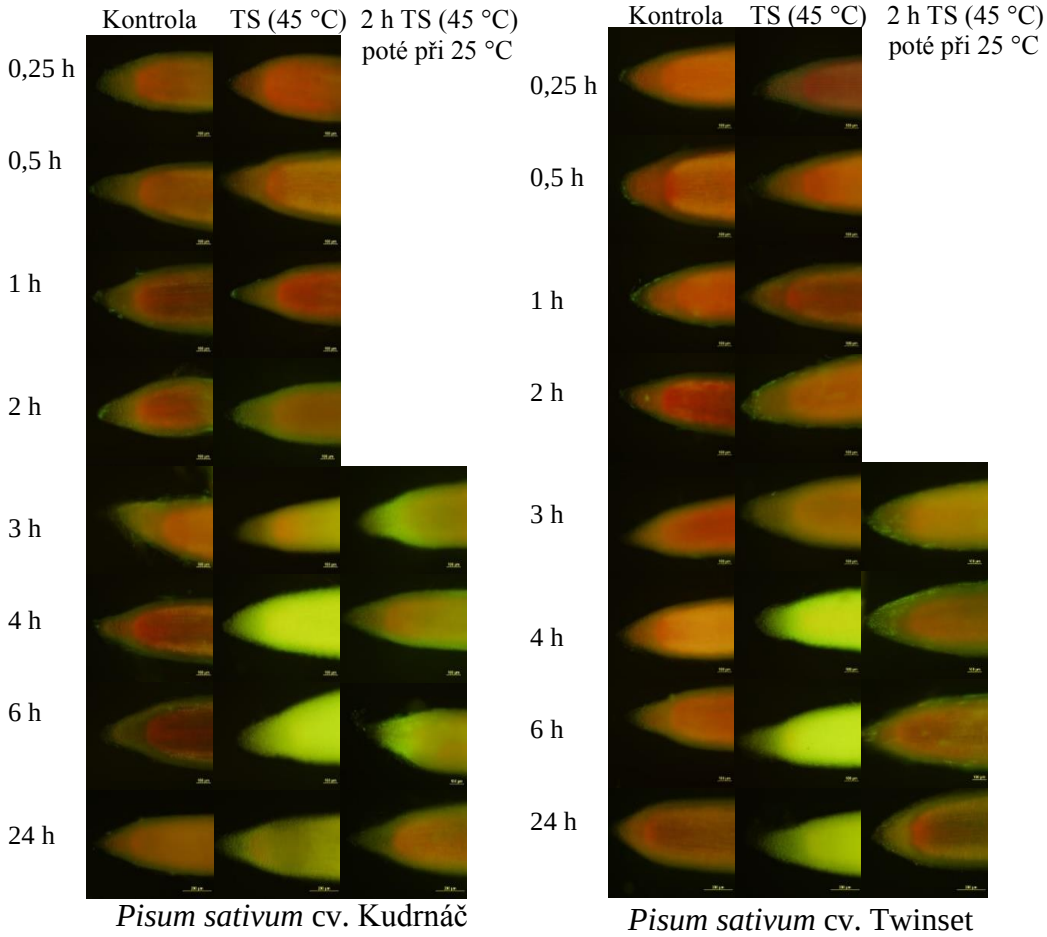
4.1 Mikroskopická detekce reaktivních forem dusíku a kyslíku

4.1.1 Stanovení produkce reaktivních forem dusíku

Jak již bylo uvedeno v teoretické části v reakci na působení stresových faktorů je často zaznamenána zvýšená produkce RNS, která má významnou roli v aktivaci obranných mechanismů u rostlin (Yu *et al.*, 2014). V rámci diplomové práce byla studována změna produkce NO s využitím fluorescenční sondy DAF-FM DA. Produkce NO byla detekována v apikálních částech kořenů obou kultivarů hrachu setého (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset) po vystavení rostlin krátkodobému a stálému TS pomocí fluorescenční mikroskopie (Obr. 19). Jako kontrolní vzorky sloužily nestresované rostliny.

U obou kultivarů byla vyšší intenzita signálu (zelené zbarvení), detekující zvýšenou produkci NO, zaznamenána po 2 h vystavení rostlin teplotě 45 °C. Pokud rostliny byly kultivovány stále při 45 °C, produkce NO významně vzrostla a byla nejvyšší cca 4-6 h po zahájení experimentu. V případě pouze krátkodobého (tj. 2h) stresu se produkce NO i po ukončení stresu zvýšila, ale změny nebyly tak intenzivní jako v případě dlouhodobého působení zvýšené teploty. Produkce NO byla intenzivnější v apikálních

částech kořene hrachu setého kultivaru Kudrnáč v porovnání s kultivarem Twinset a to zejména v případě působení krátkodobého TS. U kultivaru Kudrnáč je pozorován 24 h po zahájení experimentu v obou realizovaných variantách pokles hladiny NO v porovnání s detekovaným stavem 6 h po zahájení experimentu.



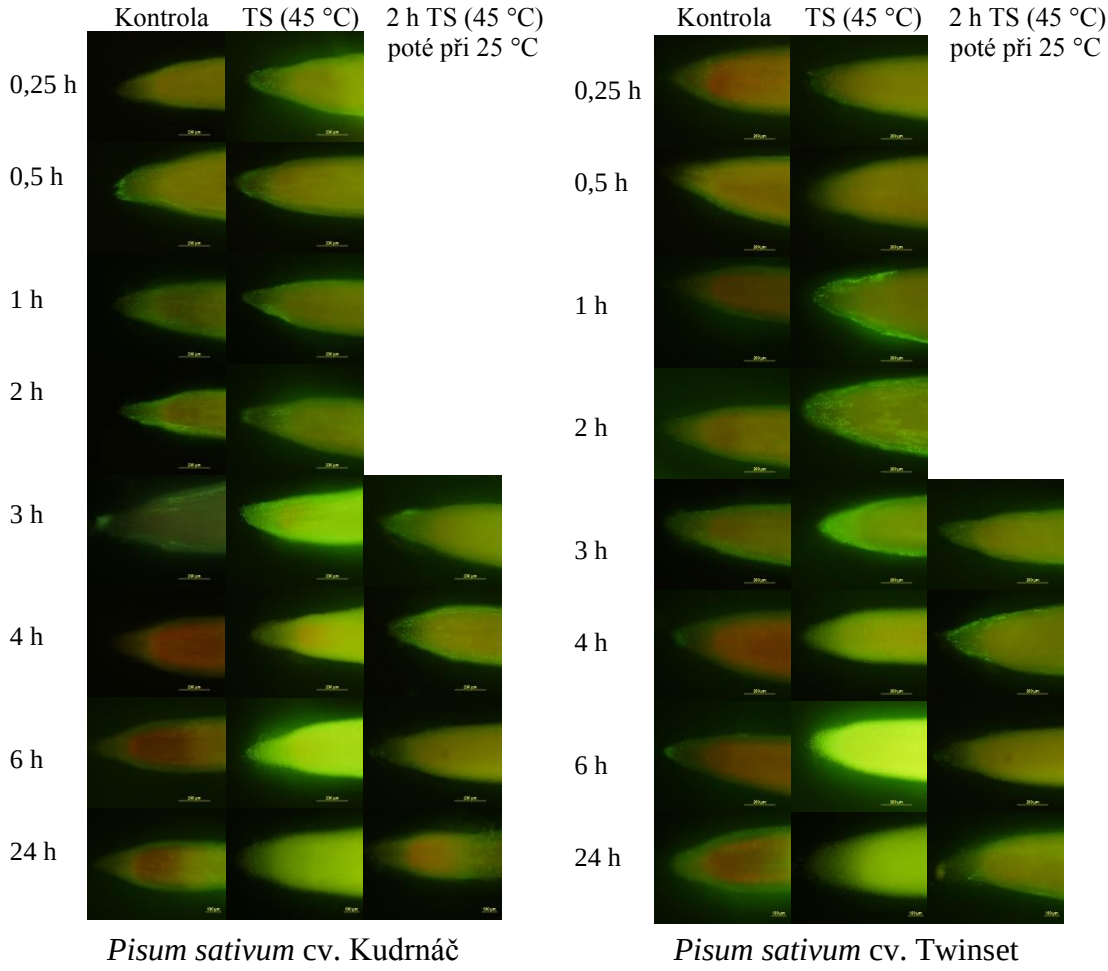
Pisum sativum cv. Kudrnáč *Pisum sativum* cv. Twinset

Obr. 19 Porovnání produkce oxidu dusnatého (NO) v apikální části kořene u dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset) v reakci na krátkodobý (2 h TS) a stálý teplotní stres (TS) – teplota 45 °C. Produkce NO byla stanovena v časových intervalech 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 a 24 h po zahájení experimentu. Jako kontrola sloužily nestresované rostliny. Byla použita fluorescenční sonda DAF-FM DA o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Měřítko 100 μm.

4.1.2 Stanovení produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku

Kromě zvýšené produkce RNS narůstá v rostlinách v reakci na abiotický stres koncentrace ROS, které mají důležitou signalizační funkci a hrají významnou roli ve vývoji rostliny (Miller *et al,* 2008). Pro detekci H_2O_2 byla velmi často v řadě publikovaných studiích používána fluorescenční sonda H_2DCF DA (Gomes *et al*., 2005). V současné době je známo, že tato fluorescenční sonda detekuje přítomnost ROS i RNS (Chen *et al*., 2011). Produkce ROS a RNS byla detekována v apikálních částech kořene obou kultivarů hrachu setého (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset) po vystavení rostlin krátkodobému a stálému TS pomocí fluorescenční mikroskopie (Obr. 20). Jako kontrolní vzorky sloužily nestresované rostliny.

U obou kultivarů hrachu setého byla detekována zvýšená hladina ROS a RNS zejména od 3 h po zahájení experimentu. Nejintenzivnější signál v případě stálého stresu (rostliny kultivovány při 45 °C) byl zaznamenán 6 h po zahájení experimentu. U rostlin, vystavených zvýšené teplotě pouze po dobu 2 h, byla po přenesení do kultivačního prostředí s teplotou 25 °C rovněž detekována zvýšená produkce ROS a RNS, ale intenzita signálu byla významně nižší v porovnání s rostlinami vystavenými stálému působení zvýšené teploty. Při krátkodobém TS nebyly mezi kultivary pozorovány významné rozdíly. U hrachu setého kultivar Twinset byla jednoznačně zvýšená aktivita signálu již 1 h po vystavení teplotě 45 °C. U hrachu setého kultivar Kudrnáč je prokazatelný rozdíl v intenzitě signálu mezi stresovanou a kontrolní rostlinou zaznamenán až 3 h po zahájení experimentu.



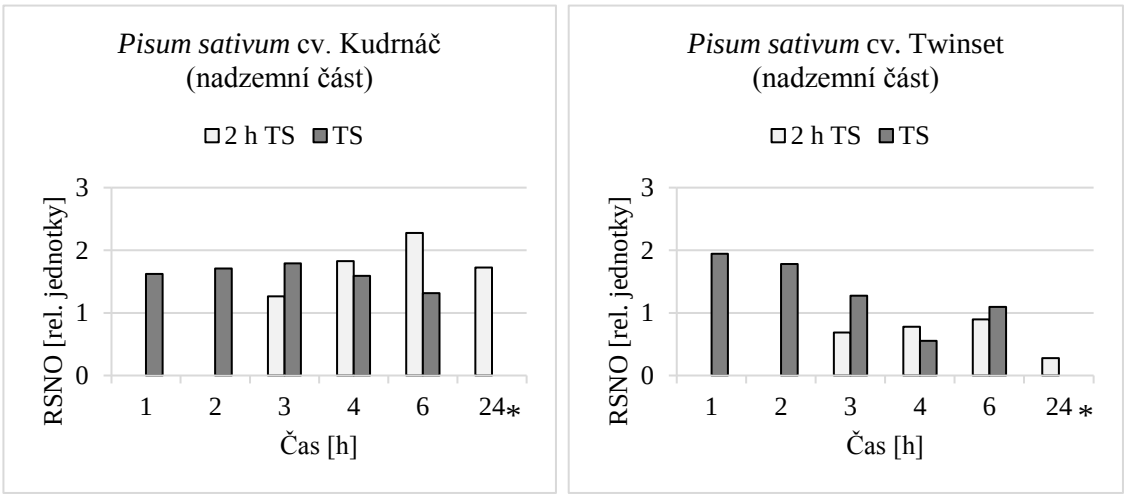
Pisum sativum cv. Kudrnáč *Pisum sativum* cv. Twinset

Obr. 20 Porovnání produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) v apikální části kořene u dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset) v reakci na krátkodobý (2 h TS) a stálý teplotní stres (TS) – teplota 45 °C. Produkce ROS a RNS byla stanovena v časových intervalech 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 a 24 h po zahájení experimentu. Jako kontrola sloužily nestresované rostliny. Byla použita fluorescenční sonda H_2DCF DA o koncentraci 10 μmol·l^{-1}. Měřítko 100 μm.

4.2 Stanovení S-nitrosothiolů Savillovou metodou

V rámci obranných reakcí vyvolaných působením stresových faktorů je NO jednou z klíčových molekul podílející se na PTM S-nitrosylaci proteinů, která reguluje aktivitu řady proteinů zapojených v obranných mechanismech rostlin, např. se jedná o významné enzymy metabolismu ROS a RNS (Astier *et al*. 2012). RSNO byly stanoveny spektrofototometricky metodou podle Savilla. U obou kultivarů hrachu setého byla po vystavení rostlin krátkodobému a stálému TS v nadzemní části sledována přítomnost RSNO v časových intervalech 1, 2, 3, 4, 6 a 24 h. Detekovatelné změny v obsahu RSNO byly získány pro nadzemní část rostlin. Obsah RSNO u rostlin vystavených TS byl vztažen k hodnotě hladiny RSNO detekované u kontrolních nestresovaných rostlin pěstovaných při 25 °C (Obr. 21).

U hrachu setého kultivar Kudrnáč byla zaznamenána zvýšená produkce RSNO po celou dobu působení vysoké teploty v porovnání s kontrolními rostlinami. Nejvyšší změny byly detekovány 3 h po zahájení experimentu. V čase 24 h po vystavení rostlin vysoké teplotě, v důsledku destrukce rostlinného pletiva, nebylo možné rostliny již použít pro detekci RSNO a dalších stanovovaných parametrů. V případě krátkodobého TS byl nejvyšší nárůst hladiny RSNO detekován u kultivaru Kudrnáč 6 h po zahájení experimentu (více než dvojnásobné zvýšení). U hrachu setého kultivar Twinset při dlouhodobě zvýšené teplotě bylo nejvyšší zvýšení RSNO detekováno již 1 h po vystavení rostlin TS. Se vzrůstajícím časem (2, 3 a 4 h po zahájení experimentu) byl zaznamenán postupný pokles obsahu RSNO ve stresovaných rostlinách. Na rozdíl od kultivaru Kudrnáč, byl v kultivaru Twinset po krátkodobém působení TS zaznamenán pokles RSNO v porovnání s kontrolními rostlinami.

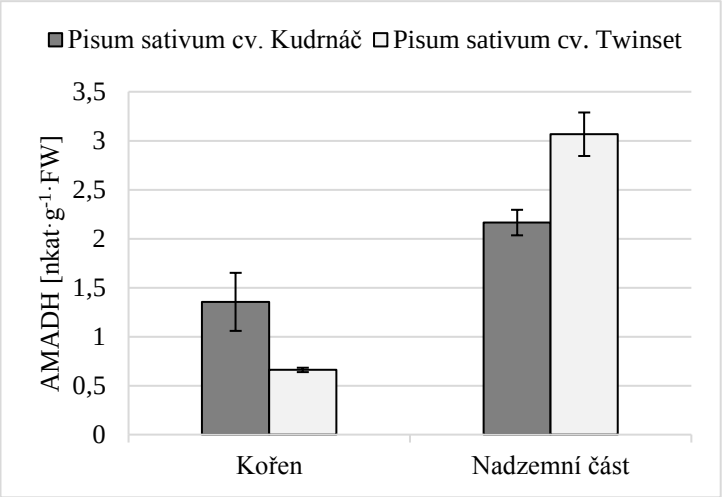


Obr. 21 Porovnání produkce S-nitrosothiolů (RSNO) u dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset) v nadzemní části v reakci na krátkodobý (2 h TS) a stálý teplotní stres (TS). Hladina RSNO byla stanovena u v časových intervalech 2, 3, 4, 6 a 24 h po zahájení experimentu. Obsah RSNO u rostlin vystavených TS byl vztažen k hodnotě hladiny RSNO detekované u kontrolních nestresovaných rostlin pěstovaných při 25 °C (relativní jednotky). Byl realizován pouze jeden orientační experiment (biologický replikát). (* vzorky 24 h po kultivaci rostlin při 45 °C, v důsledku destrukce rostlin působením zvýšené teploty, nebyly odebírány).

4.3 Regulace aktivity aminoaldehyddehydrogenasy v reakci na teplotní stres u hrachu setého

4.3.1 Aktivita aminoaldehyddehydrogenasy u hrachu setého kultivaru Kudrnáč a Twinset

Kromě změny aktivity enzymu AMADH za stresových podmínek byla paralelně stanovena aktivita tohoto enzymu v kořenové a nadzemní části u 7denních rostlin hrachu setého kultivaru Kudrnáč a Twinset za fyziologických podmínek, tj pěstování při 25 °C (Obr. 22). Aktivita AMADH byla přepočtena na 1 g čerstvé váhy (nkat·g^{-1} FW). Vyšší aktivita AMADH byla detekována v nadzemní části. U kultivaru Kudrnáč je rozdíl mezi aktivitou v kořeni a nadzemní části významně nižší (přibližně o 30 %). V případě kultivaru Twinset je v nadzemní části aktivita AMADH 5x vyšší v porovnání s aktivitou v kořeni. V kořenové části u hrachu setého kultivar Kudrnáč byla zaznamenána přibližně dvojnásobná aktivita enzymu AMADH oproti kultivaru Twinset.

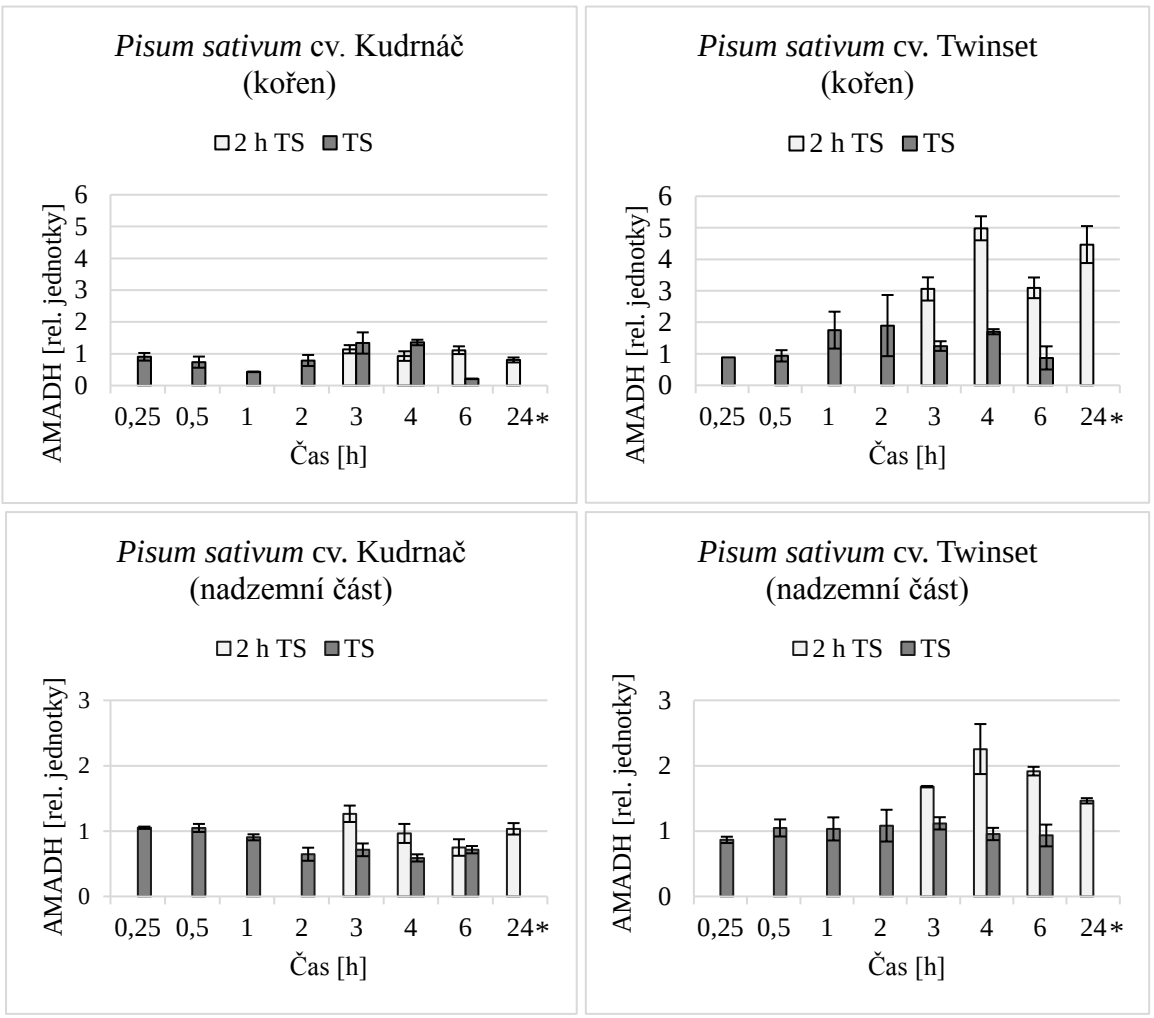


Obr. 22 Porovnání aktivity aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) u dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset) v kořenové a nadzemní části za fyziologických podmínek při 25 °C. Aktivita AMADH byla přepočtena na 1 g čerstvé váhy (nkat·g^{-1}·FW). Byly realizovány 2-3 nezávislé experimenty (biologické replikáty).

4.3.2 Vliv teplotního stresu na aktivitu aminoaldehyddehydrogenasy

Součástí obranného mechanismu rostlin v reakci na stresové podmínky může být aktivace enzymu AMADH, který se podílí na katabolismu PA. Účinkem enzymu AMADH dochází k oxidaci ω-aminoaldehydů, vzniklých v reakci katalyzované DAO, na příslušné ω-aminokyseliny (Šebela *et al.*, 2000). Jedním z konečných produktů je také kyselina γ-aminomáselná (GABA), jejíž významná role v obranných mechanismech rostlin byla již prokázaná (Bown a Shelp, 1997). U obou kultivarů hrachu setého byla po vystavení TS (stálého nebo krátkodobého po dobu 2 h) v kořenové a nadzemní části sledována aktivita AMADH v časových intervalech 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 a 24 h. Aktivita AMADH byla přepočtena na 1 gram čerstvé váhy (nkat·g^{-1}·FW) a poté vztažena ke stanovené hodnotě AMADH u kontrolního nestresovaného vzorku rostlin inkubovaných při 25 °C.

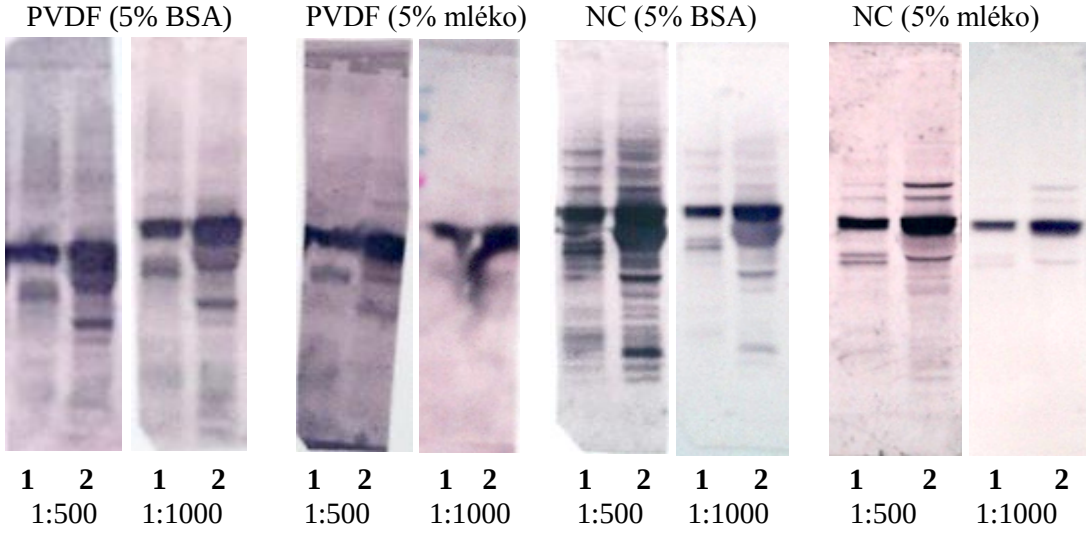
Studované kultivary hrachu setého se významně liší ve změnách aktivity AMADH v důsledku působení TS (Obr. 23). U hrachu setého kultivar Kudrnáč byla 0,5-2 h po vystavení stresu v kořenové části detekována snížená aktivita AMADH v porovnání s kontrolními rostlinami. Mírně zvýšená aktivita byla poté zaznamenána 3. a 4. h při stálém TS. Po 6 h byl detekovaný významný pokles AMADH aktivity a po 24 h kultivace při 45 °C nebyla aktivita již měřena vzhledem k devastačnímu efektu zvýšené teploty na rostlinu. V nadzemní části hrachu setého kultivar Kudrnáč byl zaznamenán stálý pokles aktivity AMADH po 1 h od zahájení experimentu. V případě aplikace pouze krátkodobého TS nebyly v kořenové části detekovány významné změny. V nadzemní části došlo pouze 1 h po ukončení TS k mírnému zvýšení aktivity AMADH. Následně byla aktivita v kontrolních rostlinách a rostlinách vystavených krátkodobému stresu srovnatelná. V případě hrachu setého kultivar Twinset bylo detekováno významné navýšení aktivity AMADH v reakci rostliny na krátkodobý TS a to jak v kořenové části (přibližně pětinásobné zvýšení), tak i v nadzemní části (přibližně dvojnásobné). Největší změny byly detekované 2 h po ukončení aplikace TS. V případě stálého vystavení rostlin TS nebyly zaznamenány u tohoto kultivaru významné změny v aktivitě AMADH v nadzemní části. V kořenech byla aktivita 1 - 4h po zahájení experimentu zvýšena.



Obr. 23 Porovnání aktivity aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) u dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset) v kořenové a nadzemní části v reakci na krátkodobý (2 h TS) a stálý teplotní stres (TS). Vzorky byly odebírány v časových intervalech 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 a 24 h po zahájení experimentu. Jako kontrola sloužily nestresované rostliny. Relativní jednotky - aktivita AMADH byla přepočtena na 1 g čerstvé váhy a poté vztažena ke kontrolnímu nestresovanému vzorku pro daný časový interval. Byly realizovány 2-3 nezávislé experimenty (biologické replikáty). (* vzorky 24 h po kultivaci rostlin při 45 °C, v důsledku destrukce rostlin působením zvýšené teploty, nebyly odebírány).

4.4 Detekce aminoaldehyddehydrogenasy metodou Western blot

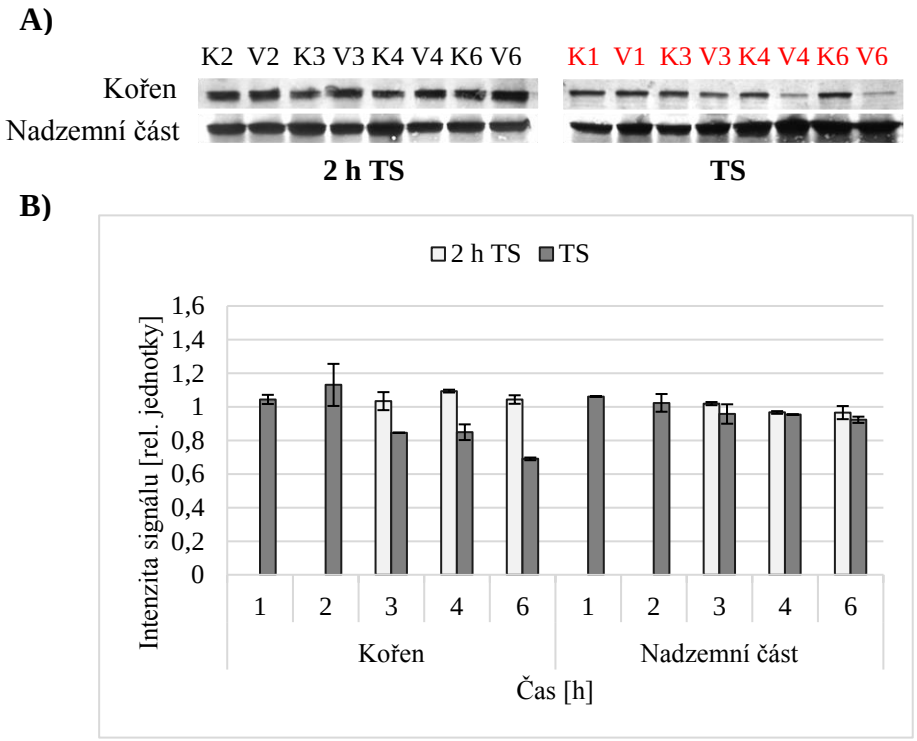
Před stanovením změn AMADH na proteinové úrovni v nadzemní a kořenové části u obou kultivarů hrachu setého po aplikaci TS, bylo nutné optimalizovat podmínky pro imunodetekci AMADH metodou Western blot (Obr. 24). Byly testovány dva typy membrán pro přenos proteinů: NC a PVDF membrána, dva typy blokačních roztoků připravených ze sušeného mléka nebo BSA a dvě koncentrace primární protilátky proti AMADH připravené imunizací králíka. Nejlepší variantou realizace metody Western blot se ukázalo v testovacích experimentech provedení na NC membráně, s 5% (w/v) sušeným mlékem jako blokovacím roztokem a s ředěním primární protilátky 1:1000. V následujících experimentech bylo použito ředění primární protilátky 1:1500.



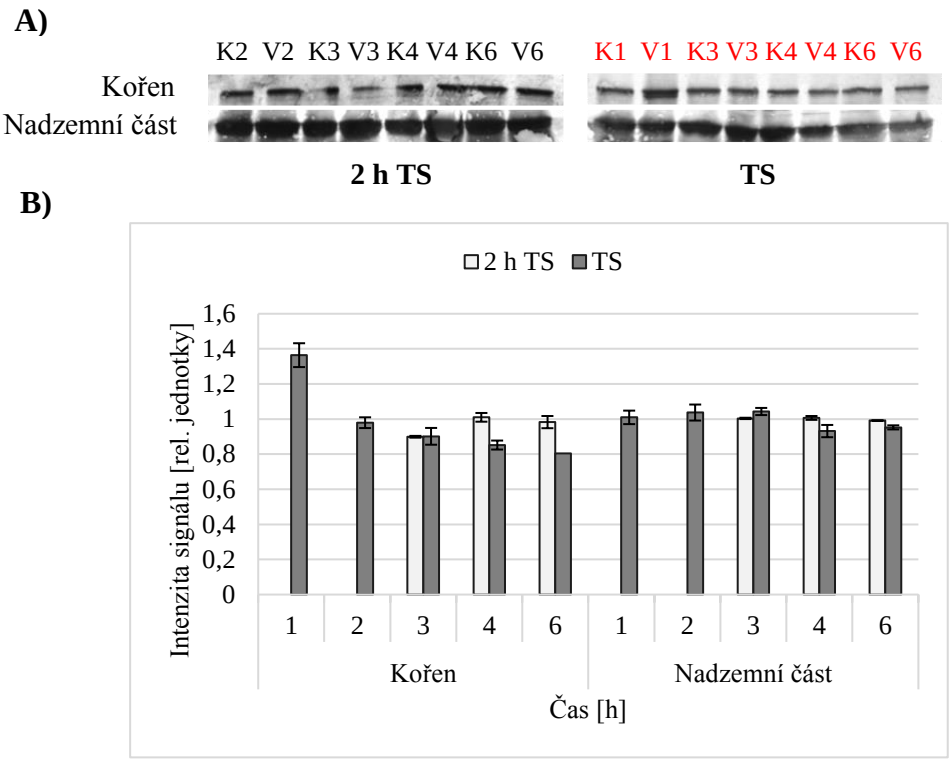
Obr. 24 Optimalizace detekce aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) u hrachu setého kultivaru Kudrnáč (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč) v kořenové (1) a nadzemní části (2) metodou Western blot. Byly testovány nitrocelulosová (NC) a polyvinylidendifluoridová (PVDF) membrána, 5% roztok sušeného mléka a hovězího sérového albuminu (BSA) jako blokovací roztok s vhodným ředěním primární protilátky 1:500 a 1:1000. V extraktu kořenové části byla koncentrace proteinů 1 $mg \cdot ml^{-1}$, v nadzemní části 2,75 $mg \cdot ml^{-1}$.

Pro analýzu změn AMADH na proteinové úrovni v důsledku TS byly použity kořenové a nadzemní části odebírané v časových intervalech 1, 2, 3, 4 a 6 h z rostlin vystavených TS a současně rostlin kontrolních. Detekce byla realizována paralelně ve dvou opakováních. Bylo provedeno denzitometrické vyhodnocení intenzity bandů pomocí programu ImageJ. Data získaná pro stresované rostliny byla vztažena vždy ke kontrolním vzorkům v daném časovém intervalu (Obr. 25 a Obr. 26).

V kořenové a nadzemní části hrachu setého kultivaru Kudrnáč a Twinset nebyly detekovány téměř žádné změny AMADH na proteinové úrovni se vzrůstajícím časem při krátkodobém TS (2, 3, 4 a 6 h). Při stálém TS byl zaznamenán u obou kultivarů v nadzemní části mírný pokles (přibližně 5%) intenzity bandů reprezentujících AMADH protein. V kořenové části byl naopak 6 h po zahájení experimentu detekován 20% pokles u kultivaru Twinset a až 30% u kultivaru Kudrnáč.



Obr. 25 Detekce aminoaldehydehydrogenasy (AMADH) u hrachu setého kultivaru Kudrnáč (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč) v kořenové a nadzemní části v reakci na krátkodobý (2 h TS) a stálý teplotní stres (TS). Vzorky byly odebírány v časových intervalech 1, 2, 3, 4 a 6 h po zahájení experimentu A) Imunochemická detekce AMADH. B) Denzitometrické vyhodnocení intenzity bandů AMADH pomocí programu ImageJ. K – kontrola, V - vzorek (stresovaná rostlina) odebírané v uvedený časový interval. Černé označení – krátkodobý TS, červené označení – dlouhodobý TS.



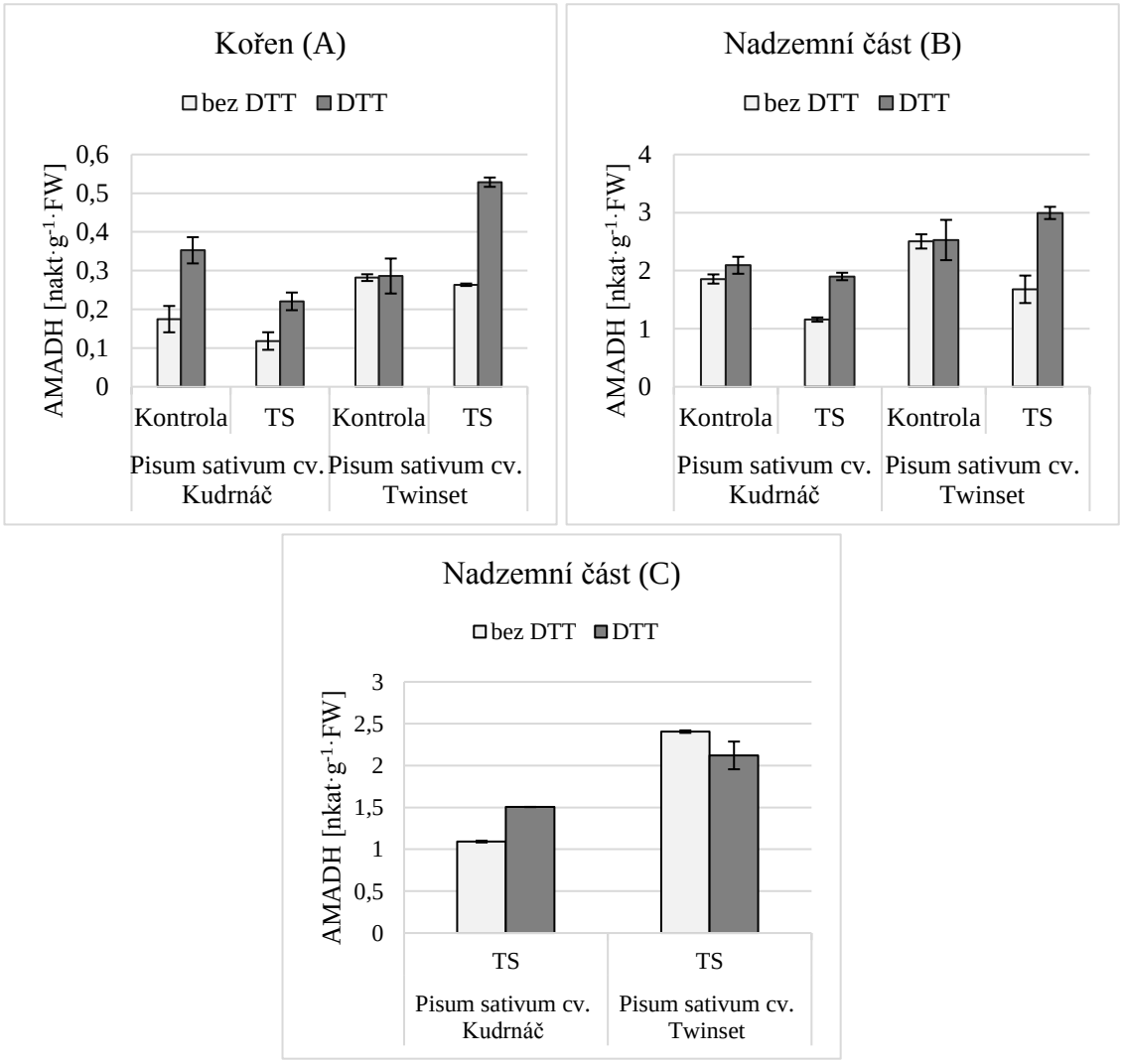
Obr. 26 Detekce aminoaldehydehydrogenasy (AMADH) u hrachu setého kultivaru Twinset (*Pisum sativum* cv. Twinset) v kořenové a nadzemní části v reakci na krátkodobý (2 h TS) a stálý teplotní stres (TS). Vzorky byly odebírány v časových intervalech 1, 2, 3, 4 a 6 h po zahájení experimentu A) Imunochemická detekce AMADH. B) Denzitometrické vyhodnocení intenzity bandů AMADH pomocí programu ImageJ. K – kontrola, V - vzorek (stresovaná rostlina) odebírané v uvedený časový interval. Černé označení – krátkodobý TS, červené označení – dlouhodobý TS.

4.5 Vliv dithiothreitolu na aktivitu aminoaldehyddehydrogenasy

Pro orientační experimentální ověření možnosti regulace aktivity AMADH S-nitrosylací v důsledku TS byl realizován experiment s využitím DTT. DTT jako silné redukční činidlo může zrušit vazbu NO na SH skupinu cysteinu AMADH a tím ovlivnit aktivitu AMADH, za předpokladu, že dochází k regulaci aktivity prostřednictvím právě S-nitrosylace. Pro analýzu byla použita kořenová a nadzemní část obou kultivarů hrachu setého odebrané z kontrolních rostlin a rostlin po ukončení 2h TS, kdy byl zaznamenán pokles AMADH aktivity. U obou kultivarů byla jak v kořenové, tak v nadzemní části stresovaného vzorku pozorována po přídavku DTT k extraktům významně vyšší aktivita (Obr. 27A a Obr. 27B). U kontrolních vzorků nebyly detekovány žádné významné změny po aplikaci DTT s výjimkou kořenové části kultivaru Kudrnáč, kdy po přidání DTT byla zaznamenána přibližně dvojnásobně vyšší aktivita AMADH.

Vliv DTT na aktivitu AMADH byl dále testován na vzorcích nadzemní části rostlin 4 h po ukončení TS u hrachu setého kultivar Kudrnáč, kdy byl zaznamenám maximální pokles AMADH aktivity a 2 h po ukončení TS u hrachu setého kultivar Twinset, kdy

bylo naopak detekováno několikanásobné navýšení aktivity AMADH (Obr. 23). Protože nebyla zaznamenána významná zaměna na proteinové úrovni AMADH (Obr. 25 a Obr. 26), lze předpokládat zapojení regulačního mechanismu, ovlivňujícího aktivitu AMADH, kterým může být např. S-nitrosylace. V nadzemní části kultivaru Kudrnáč byl 4 h po ukončení TS po přídavku DTT zaznamenán nárůst aktivity AMADH, zatímco u kultivaru Twinset došlo po aplikaci DTT k extraktům získaným 2 h po ukončení TS ke snížení aktivity AMADH (Obr. 27C). U kontrolních rostlin obou kultivarů nebyly detekovány žádné významné změny po přidání DTT.

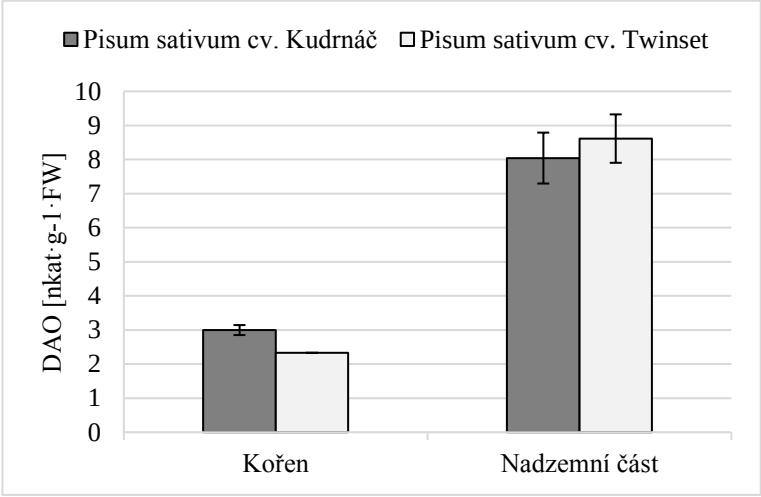


Obr. 27 Porovnání aktivity aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) bez a po přidání dithiothreitolu (DTT) u kořenové a nadzemní části dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset). AMADH aktivita byla stanovena u kontrolních rostlin a rostlin vystavených 2h působení teploty 45 °C. A – kořen 2 h po ukončení 2h teplotního stresu (TS), B – nadzemní část 2 h po ukončení 2h TS, C – nadzemní část kultivaru Kudrnáč 4 h po ukončení 2h TS a kultivaru Twinset 2 h po ukončení 2h TS. Směrodatná odchylka je vyhodnocena ze tří technických replikátů.

4.6 Regulace aktivity diaminoxidasy v reakci na teplotní stres u hrachu setého

4.6.1 Aktivita diaminoxidasy u hrachu setého kultivaru Kudrnáč a Twinset

Kromě změny aktivity enzymu DAO za stresových podmínek byla paralelně stanovena aktivita tohoto enzymu v kořenové a nadzemní části u 7denních rostlin hrachu setého kultivaru Kudrnáč a Twinset za fyziologických podmínek, tj pěstování při 25 °C (Obr. 28). Aktivita DAO byla přepočtena na 1 g čerstvé váhy (nkat·g^{-1}·FW). Vyšší aktivita DAO byla detekována v nadzemní části. U kultivaru Kudrnáč byla aktivita DAO v nadzemní části přibližně trojnásobně vyšší než aktivita v kořenu, u kultivaru Twinset byla aktivita až přibližně čtyřnásobně vyšší než v kořenové části. Rozdíly v aktivitě DAO ve studovaných kultivarech hrachu setého nebyly významné.

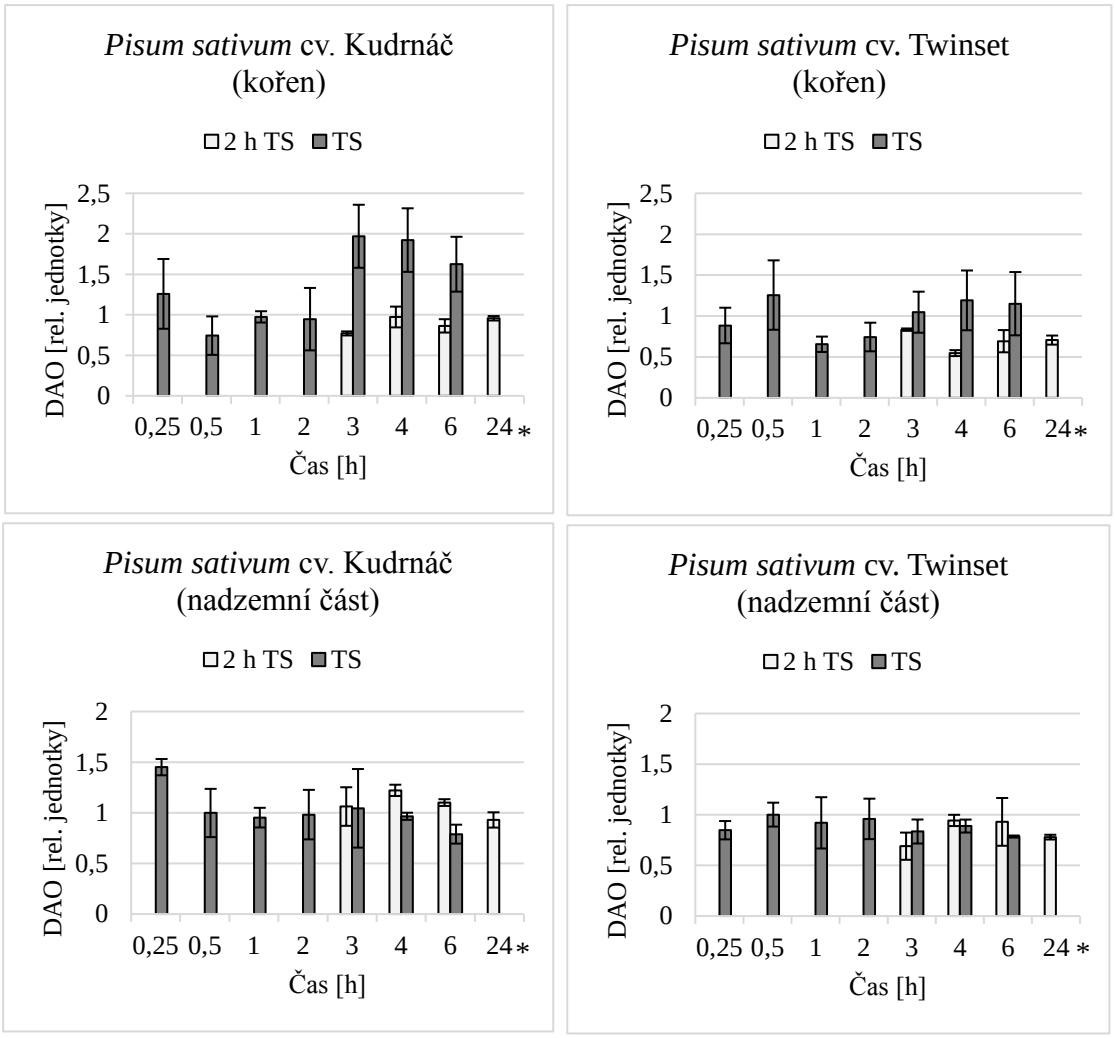


Obr. 28 Porovnání aktivity diaminoxidasy (DAO) u dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset) v kořenové a nadzemní části za fyziologických podmínek při 25 °C. Aktivita DAO byla přepočtena na 1 g čerstvé váhy (nkat·g^{-1}·FW). Byly realizovány 2-3 nezávislé experimenty (biologické replikáty).

4.6.2 Vliv teplotního stresu na aktivitu diaminoxidasy

Katabolismus PA je spojen s DAO aktivitou. DAO katalyzují oxidaci Put na ABAL za současné tvorby NH_3 a H_2O_2 (Moschou *et al*., 2008). U obou kultivarů hrachu setého byla po vystavení krátkodobého a stálého TS v kořenové a nadzemní části sledována aktivita DAO v časových intervalech 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 a 24 h. Aktivita DAO byla přepočtena na 1 gram čerstvé váhy (nkat·g^{-1} FW) a poté vztažena ke stanovené hodnotě DAO u kontrolního nestresovaného vzorku rostlin inkubovaných při 25 °C.

Aktivita DAO se u studovaných kultivarů hrachu setého v důsledku působení TS lišila (Obr. 29). Při stanovení aktivity DAO byla zaznamenána poměrně velká variabilita v biologickém opakování. U hrachu setého kultivar Kudrnáč byla po ukončení krátkodobého TS (2 h při 45 °C) detekována mírně snížená aktivita DAO v kořenové části v porovnání s kontrolními rostlinami. U kultivaru Twinset je tento pokles výraznější. Naopak v reakci rostlin na dlouhodobé působení teploty 45 °C bylo 3 - 6 h od zahájení experimentu zaznamenáno významné zvýšení DAO aktivity u kultivaru Kudrnáč. Změny v DAO aktivitě v důsledku TS nebyly u obou kultivarů v nadzemní části významné, pouze v případě kultivaru Twinset byl po 3 h od zahájení experimentu pozorován mírný pokles DAO aktivity.

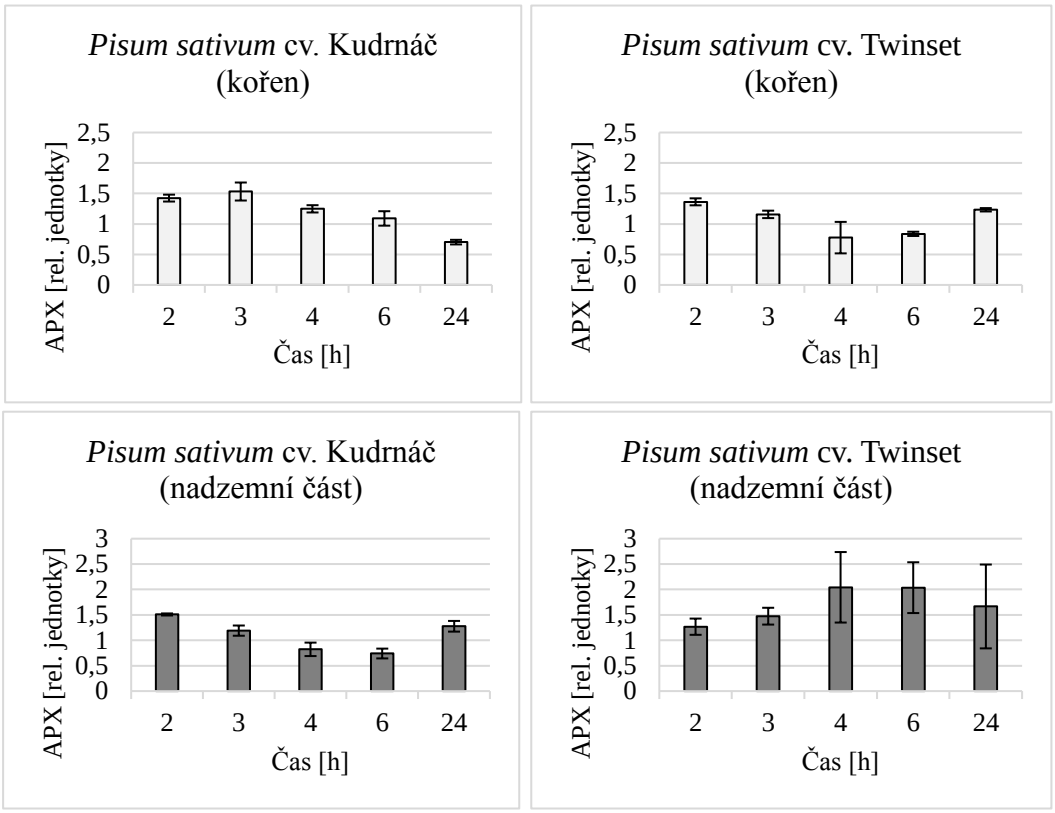


Obr. 29 Porovnání aktivity diaminoxidasy (DAO) u dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset) v kořenové a nadzemní části v reakci na krátkodobý (2 h TS) a stálý teplotní stres (TS). Vzorky byly odebírány v časových intervalech 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 a 24 h po zahájení experimentu. Jako kontrola sloužily nestresované rostliny. Relativní jednotky - aktivita DAO byla přepočtena na 1 g čerstvé váhy a poté vztažena ke kontrolnímu nestresovanému vzorku pro daný časový interval. Byly realizovány 2 - 3 nezávislé experimenty (biologické replikáty). (* vzorky 24 h po kultivaci rostlin při 45 °C, v důsledku destrukce rostlin působením zvýšené teploty, nebyly odebírány).

4.7 Vliv teplotního stresu na aktivitu askorbátperoxidasy

Důležitou roli v obranné reakci rostlin na stresové podmínky hrají antioxidační enzymy, které rostliny chrání před oxidačním poškozením způsobeným vysokou produkcí ROS. V rámci diplomové práce byla sledována aktivita enzymů nezbytných pro eliminaci ROS a to APX, která je nedílnou součástí ASH-GSH cyklu (Das a Roychoudhury, 2014). U obou kultivarů hrachu setého byla z časových důvodů stanovena APX aktivita pouze po vystavení rostlin krátkodobému TS (pouze 2h) (Obr. 30). Aktivita APX byla přepočtena na 1 gram čerstvé váhy (nkat·g^{-1} FW) a poté vztažena ke stanovené hodnotě APX u kontrolního nestresovaného vzorku rostlin inkubovaných při 25 °C.

V kořenové části hrachu setého kultivar Kudrnáč byla 2. - 4. h po zahájení experimentu aktivita APX vyšší v porovnání s kontrolními rostlinami. Po 6 h byla aktivita srovnatelná s kontrolními rostlinami, po 24 h byl zaznamenán pokles aktivity. V nadzemní části tohoto kultivaru byl detekován 1 h po ukončení TS pokles APX aktivity. U hrachu setého kultivar Twinset byla aktivita APX v kořenu nejvyšší 2 h po zahájení experimentu (tzn. v okamžiku ukončení působení vysoké teploty), poté se aktivita APX snižovala. V nadzemní části tohoto kultivaru byl detekován nárůst aktivity, kdy po 4 a 6 h i přes vysoké směrodatné odchylky byla zaznamenána až dvojnásobně zvýšená aktivita v porovnání s kontrolními rostlinami.



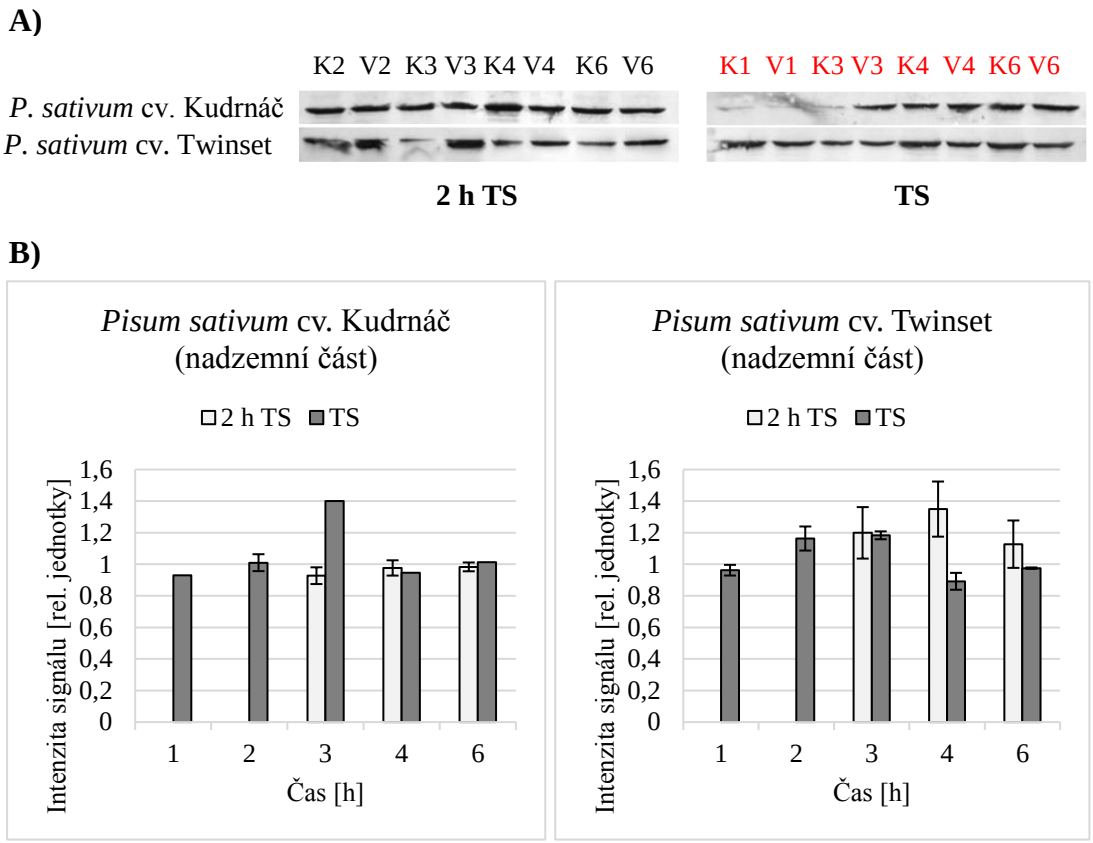
Obr. 30 Porovnání aktivity askorbátperoxidasy (APX) u dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset) v kořenové a nadzemní části v reakci na krátkodobý (2 h TS) teplotní stres. Vzorky byly odebírány v časových intervalech 2, 3, 4, 6 a 24 h po zahájení experimentu. Jako kontrola sloužily nestresované rostliny. Relativní jednotky - aktivita APX byla přepočtena na 1 g čerstvé váhy a poté vztažena ke kontrolnímu nestresovanému vzorku pro daný časový interval. Byly realizovány 2-3 nezávislé experimenty (biologické replikáty).

4.8 Detekce heat shock proteinů 70 metodou Western blot

Jedním z typických obranných mechanismů v rámci reakce rostlin na TS je zvýšená produkce Hsp. Hsp byly v rámci diplomové práce detekovány pomocí metody Western blot. Na proteinové úrovni byly analyzovány změny Hsp70 u obou kultivarů v kořenové i nadzemní části v časových intervalech 1, 2, 3, 4 a 6 h u rostlin vystavených TS a současně rostlin kontrolních. Detekce byla realizována paralelně ve dvou opakováních. Bylo provedeno denzitometrické vyhodnocení intenzity bandů pomocí programu ImageJ. Data získaná pro stresované rostliny byla vztažena vždy ke kontrolním vzorkům v daném časovém intervalu (Obr. 31).

Jelikož v kořenové části byl zaznamenán velice slabý signál, je v diplomové práci uvedeno grafické vyhodnocení změn detekce Hsp70 pouze v nadzemní části. V nadzemní části hrachu setého kultivar Twinset byla po působení krátkodobého TS detekována zvýšená produkce Hsp70 na rozdíl od kultivaru Kudrnač, u kterého TS neaktivoval produkci Hsp70 (s výjimkou 3 h po vystavení TS, výsledek je nutné

opakovaně ověřit, zda nedošlo k chybě při přípravě vzorku nebo při jeho nanášení na gel).



Obr. 31 Detekce heat shock proteinu 70 (Hsp70) u dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset) v nadzemní části v reakci na krátkodobý (2 h TS) a stálý teplotní stres (TS). Vzorky byly odebírány v časových intervalech 1, 2, 3, 4 a 6 h po zahájení experimentu A) Imunochemická detekce Hsp70. B) Denzitometrické vyhodnocení intenzity bandů Hsp70 pomocí programu ImageJ. K – kontrola, V - vzorek (stresovaná rostlina) odebírané v uvedený časový interval. Černé označení – krátkodobý TS, červené označení – dlouhodobý TS.

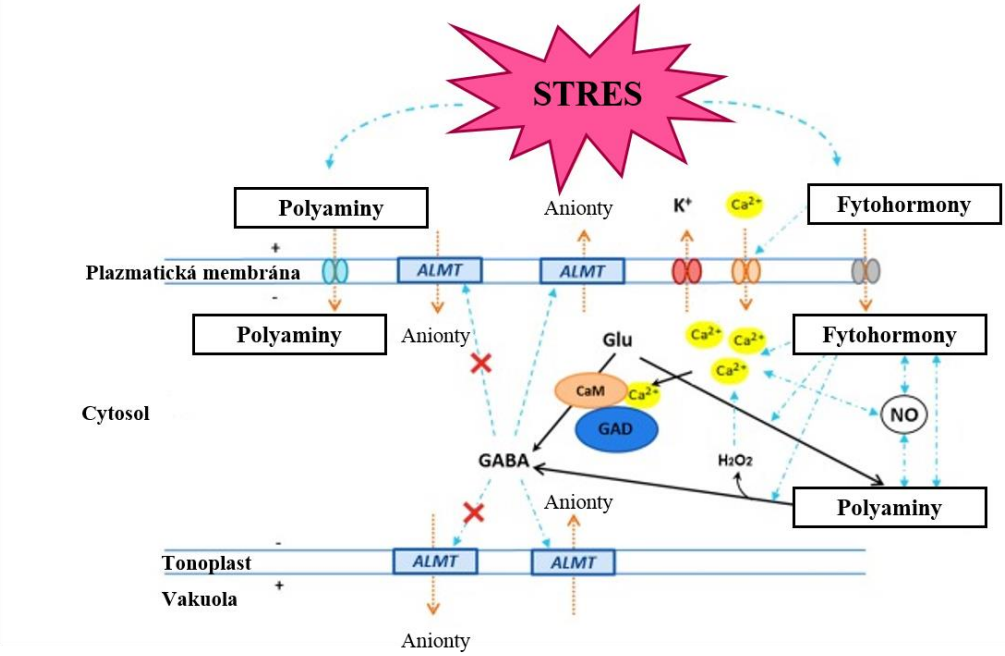
5 DISKUZE

Teplotní stres (TS) je jeden z významných abiotických stresů, který negativně ovlivňuje jak vegetativní, tak reprodukční růst rostlin. TS je často doprovázen dalšími abiotickými stresovými faktory, jako je sucho a salinita (Bita a Gerats, 2013). Vysoké teploty vedou k fyziologickému poškození rostliny, např. spalování listů a stonků, opadání listů a senescence, inhibice růstu výhonků a kořenů nebo poškození plodů, což následně vede k nízké produktivitě v zemědělství (Vollenweider a Günthardt-Goerg, 2005). TS snižuje růst rostlin tím, že ovlivňuje rychlost asimilace a tím celkovou hmotnost sušiny (Wahid *et al*., 2007). Vyšší rostliny vystavené nadměrnému teplu, minimálně 5 °C nad jejich optimální teplotu růstu, vykazují charakteristický soubor buněčných a metabolických odpovědí, které jsou důležité pro přežití rostlin za vysoké teploty. Dochází ke změnám v organizaci buněčných struktur, včetně organel a cytoskeletu, a membránové funkce, což je spojeno s nízkou syntézou proteinů a urychlenou transkripcí a translací Hsp, produkcí fytohormonů (ABA), antioxidantů a dalších ochranných molekul (Bita a Gerats, 2013). Zvýšení teploty v závislosti na intenzitě a době působení se může podílet na zrychlení růstu rostlin, fotosyntéze, dýchání, změnách v aktivitách enzymů, ale pouze po určitou dobu, poté mohou následovat negativní dopady na vývoj a schopnost přežití rostliny. Při zvýšení teploty o 10 °C se průměrná rychlost enzymových reakcí zvýší až dvojnásobně. Optimální teplota pro strukturální integritu a aktivitu většiny enzymů se pohybuje v rozmezí 30-45 °C. Naopak při teplotách vyšších než 60 °C s výjimkou teplomilných organismů je řada enzymů nevratně denaturována a inaktivována (Hasanuzzaman *et al*., 2013).

V reakci rostlin na různé biotické a abiotické stresové faktory byla prokázána zvýšená hladina polyaminů (PA). Nejrozšířenější jsou Put, Spm a Spd a jsou zapojeny do řady základních buněčných procesů jako je tranksripce, modifikace RNA, syntéza proteinů a modulace enzymových aktivit. Úlohou Spm při napadení rostliny patogenem je modulace aktivity kationtových kanálů a tvorba H_2O_2 (Takahashi a Kakehi, 2009). Klíčovým enzymem při syntéze Put je arginindekarboxylasa (ADC). U *A. thaliana* se nachází dva geny kódující ADC (*ADC1* a *ADC2*), které se v reakci na abiotický stres exprimují odlišně (Alcázar *et al*., 2006). Exprese *ADC2* je silně indukována v reakci na sucho, salinitu a mechanické poškození (Perez-Amador *et al*., 2002), zatímco *ADC1* je indukována hlavně chladem (Hummel *et al*., 2004). U rostlin vystavených suchu, je exprese některých genů (*ADC2*, gen pro sperminsyntasu (*SPMS*), gen pro S-adenosylmethionindekarboxylasu 2 (*SAMDC2*)) zapojených do biosyntézy PA závislá

na ABA (Urano *et al*., 2003). Za stresových podmínek zvýšená exprese genů nezbytných pro biosyntézu PA ve většině případů nekoreluje s nárůstem všech PA. Paralelně s pozitivní regulací transkripce *ADC1* nebo *ADC2* byla v reakci na různé formy abiotického stresu detekována produkce Put, který neovlivňuje hladinu Spd a Spm společně s geny zapojenými do jejich biosyntézy (*SAMDC2*, gen pro spermidinsyntasu 2 (*SPDS2*), *SPMS*). Důvodem může být regulace SAMDC, klíčového enzymu pro biosyntézu PA (Cona *et al*., 2006). U rostlin tabáku došlo k akumulaci Put nadměrnou expresí ornithindekarboxylasy (ODC), která zvýšila toleranci vůči zasolení (Kumria a Rajam, 2002). Klíčovou roli v obsahu PA v rostlinách mají enzymy podílející se na jejich degradaci, jako jsou DAO a PAO, které katalyzují reakci vedoucí k produkci reaktivních a cytotoxických aminoaldehydů, jako je 3-aminopropionaldehyd (APAL) a 4-aminobutanal (ABAL) a za současného vzniku H_2O_2. Oxidace aminoaldehydů AMADH končí tvorbou netoxických metabolitů β-alaninu a GABA. Protože rostlinné AMADH vykazují 35 až 39% sekvenční identitu s bakteriálními, plísňovými, rybími nebo savčími AMADH, byly v poslední době zařazeny do samostatné rodiny aldehyddehydrogenas 10 (ALDH10) (Kopečný *et al*., 2013). AMADH byla původně nalezena v rostlinách čeledi *Fabaceae* a *Poaceae* společně s aminoxidasami (AO) (Flores a Filner, 1985). Vlastnostmi jsou AMADH blízké k betainaldehyddehydrogenasam (BADH), které reagují na sucho, zasolení a TS (Fitzgerald *et al*., 2009; Šebela *et al*., 2001b). Ve špenátových listech v reakci na vysokou koncentraci soli (300 $mmol \cdot l^{-1}$ NaCl) se aktivita BADH ztrojnásobila (Weretilnyk a Hanson, 1989). Nedávná studie poukázala na to, že AMADH je schopna podobně jako BADH v reakci na salinitní stres u rýže a ječmene využívat jako substrát betainaldehyd. Glycinbetain zajišťující toleranci vůči abiotickému stresu tak nemusí být produkován pouze aktivitou BADH (Fitzgerald *et al*., 2009). Byly provedeny detailní studie AMADH *P. sativum*. Byly identifikovány dvě izoformy PsAMADH1 a PsAMADH2, které se skládají z 503 aminokyselin s 80% sekvenční identitou (Šebela *et al*., 2000; Tylichová *et al*., 2010). Nejlepší substrátovou specifitu vykazuje AMADH k APAL. Bylo prokázáno, že i přes podobnost s BADH, AMADH izolovaná z *P. sativum* není schopna jako substrát využít betainaldehyd a nepřispívá tak k akumulaci glycinbetainu (Šebela *et al*., 2000). V semenáčcích *P. sativum* pěstovaných za tmy byla aktivita AMADH v kořenové špičce vyšší než v nadzemní části. Po mechanickém poškození (6. den) rostlin *P. sativum* byla detekována významně vyšší aktivita AMADH a DAO v porovnání s kontrolními neporaněnými rostlinami.

U sazenic *P. sativum* pěstovaných za tmy byl nejvyšší nárůst aktivity AMADH zaznamenán druhý den po poranění. (Petřivalský *et al.*, 2007). Hlavním cílem diplomové práce bylo studium vlivu krátkodobého (2 h) a dlouhodobého TS (vystavení teplotě 45 °C) na změny aktivity AMADH a DAO a možnosti regulace jejich aktivity a to u dvou kultivarů hrachu setého (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset) lišících se odolností vůči patogenním organismům. Po expozici rostlin TS byly zaznamenány významně rozdílné odpovědi u obou kultivarů, a to zejména v reakci rostlin na působení krátkodobého TS. U hrachu setého kultivar Twinset vyznačující se odolností vůči patogenům byla jak v kořenové, tak v nadzemní části detekována několikanásobně zvýšená aktivita AMADH v reakci rostliny na krátkodobý TS v porovnání s citlivým kultivarem Kudrnáč, u kterého v kořenové části nebyly detekovány významnější změny a v nadzemní části byl naopak pozorován pokles AMADH aktivity. V případě dlouhodobého vystavení rostlin TS nebyly v nadzemní části kultivaru Twinset pozorovány mezi jednotlivými časovými intervaly změny v aktivitě AMADH, zatímco u kultivaru Kudrnáč došlo k poklesu aktivity. Výsledky poukazují na schopnost aktivace obranných mechanismů spojených se zvýšením aktivity AMADH u hrachu setého cv. Twinset, vykazujícího odolnost na patogeny.



Obr. 32 Schéma znázorňující funkci hormonů, polyaminů a kyseliny γ-aminomáselné (GABA) v reakci rostliny na stresové faktory. Spojité modré šipky značí metabolické dráhy, přerušované modré a oranžové značí regulaci a trasnport. ALMT hliníkem aktivovaný malátový transportér, CaM kalmodulin, GAD glutamátdekarboxylasa, Glu L-Glutamát, H_2O_2 peroxid vodíku, NO oxid dusnatý (upraveno a převzato z Podlešáková *et al.*, 2018).

Zvýšení aktivity AMADH vede ke zvýšení koncentrace GABA v rostlině. GABA je čtyřuhlíková neproteinogenní aminokyselina. Jednou z jejich hlavní rolí je kontrola reakcí rostliny na stresové podmínky (Shelp *et al*., 1999). Bylo zjištěno, že změna v její endogenní koncentraci významně ovlivňuje růst rostlin. Exogenní aplikace GABA zvyšuje toleranci vůči stresu modulací exprese genů zapojených do signalizace rostlin, regulace transkripce, biosyntézy hormonů, produkce ROS a metabolismu PA (Podlešáková *et al*., 2018). Je spojena s různými fyziologickými procesy - regulace cytosolického pH, tok uhlíku do Krebsova cyklu, odpuzování hmyzu, ochrana před oxidačním stresem a signalizační funkce (Bouche a Fromm, 2004). GABA je syntetizována hlavně z L-glutamátu glutamátdekarboxylasou (GAD, EC 4.1.1.15). Jak již bylo zmíněno, reakce rostlin na abiotický stres je spojena se syntézou a katabolismem PA. Za stresových podmínek k produkci GABA přispívá oxidace Put a Spd AO. Exprese AO je vysoce indukovatelná v reakci na stres a vykazuje opačné chování než GAD (Shelp *et al*., 2012), což potvrzuje vzájemnou vazbu mezi PA a GABA během vystavení rostlin stresu (Obr. 32) (Podlešáková *et al*., 2018). Například 39% akumulace GABA v kořenech sóji za salinitního stresu bylo přičítáno oxidaci PA v důsledku zvýšené aktivity DAO (Xing *et al*., 2007). Změny v dostupnosti O_2 a buněčné redoxní rovnováze v důsledku stresu mohou přímo ovlivnit aktivity DAO a GAD, čímž je omezena tvorba GABA (Shelp *et al*., 2012).

Kromě aktivity AMADH byla v reakci na TS sledována také aktivita DAO, které společně s PAO katalyzují katabolismus PA. DAO obsahují jako kofaktor měď, proto se označují také jako CuAO. Kofaktorem PAO je FAD (Cona *et al*., 2006). Aktivitou DAO a PAO dochází k produkci ROS, což jsou důležité signální molekuly v programované buněčné smrti rostlin. DAO se vyskytuje ve vysokých koncentracích u dvouděložných rostlin, zejména v hrachu, cizrně, čočce a sóje (Moschou *et al*., 2008). U *A. thaliana* bylo popsáno 10 isoforem CuAO (Tiburcio *et al*., 2014). U *P. sativum* byly nalezeny dva izoenzymy DAO (Luhová *et al*., 2003). Je známo, že aktivita DAO je u hrachu modulována světlem. Zvyšuje se u semenáčků hrachu pěstovaných za tmy a nejvyšší hladina byla zaznamenána v nadzemní části. Po mechanickém poškození rostlin hrachu došlo k nárůstu aktivity DAO. Se zvýšenou aktivitou DAO dochází k vysoké produkci H_2O_2 a aminoaldehydů, kdy AMADH zde může působit jako detoxikační enzym (Petřivalský *et al*., 2007). U dvou kultivarů cizrny (*Cicer arietinum*) lišících se citlivostí vůči napadení nekrotrofní houbou *Ascochyta rabiei* byla zaznamenána různá exprese DAO. U rezistentního kultivaru Sultano byla hladina

exprese DAO vyšší než u citlivého kultivaru Calia (Angelini *et al*., 1993). Dále bylo prokázáno, že obranná reakce kultivaru Sultano během interakce s *A. rabiei* je silně narušena 2-bromethylaminem, účinným, selektivním inhibitorem DAO (Rea *et al*., 2002). V reakci na napadení ječmene padlím *Blumeria graminis* f sp. *hordei* se zvýšila aktivita DAO a PAO společně s peroxidasami využívající jako substrát H_2O_2 (Cowley a Walters, 2002). Výsledky experimentální části diplomové práce poukazují na nepříliš významné změny v DAO aktivitě u obou kultivarů vystavených krátkodobému TS. Pouze téměř dvojnásobné navýšení DAO aktivity bylo detekováno 3. - 6. h při dlouhodobém vystavení teplotě 45 °C v kořenové části u hrachu setého kultivar Kudrnáč. V kořenové části hrachu setého kultivar Twinset za stejných kultivačních podmínek byla aktivita DAO také zvýšena nicméně v porovnání s kultivarem Kudrnáč byly změny menší. Je zajímavé, že vliv TS na změny aktivity enzymů DAO a AMADH, které se v následných reakcích podílejí na degradaci PA, je velmi rozdílný, což lze dokumentovat na reakci hrachu setého kultivaru Twinset, kdy po 2 h TS a následné kultivaci při 25 °C je AMADH aktivita významně zvýšena, naopak byl detekován pokles DAO aktivity. V rámci navazující studie bude nutné nalézt pro tuto skutečnost vhodné zdůvodnění. Bude nutné ověřit změny i na úrovni obsahu PA a GABA.

Jednou z otázek položených v rámci řešení diplomové práce bylo, zda pozorované zvýšení aktivity AMADH souvisí s expresí genů AMADH a následným zvýšením proteinového zastoupení AMADH nebo se bude jednat o regulaci enzymové aktivity např. posttranslační modifikací (PTM) struktury enzymu. Pomocí metody Western blot bylo prokázáno, že ke zvýšení aktivity u kultivaru Twinset po krátkodobém TS nedochází v důsledku většího zastoupení enzymu v rostlině. V následujících experimentech bude vhodné potvrdit tyto výsledky ještě na úrovni RNA (metodou RT PCR). Při stálém TS byl pozorován pokles proteinového zastoupení AMADH u obou kultivarů, a to zejména v kořenové části, což může souviset s destrukčním efektem dlouhodobého působení TS.

Otázkou zůstává, zda a jak může být AMADH případně DAO aktivita regulována. Izoenzymy hrachové AMADH mají ve struktuře 11-12 cysteinů a dle predikčních programů pro určení pravděpodobnosti S-nitrosylace byly určeny SH skupiny cysteinu, které by mohly regovat s NO. Pravděpodobnost S-nitrosylace u DAO je výrazně menší v porovnání s AMADH (nepublikované výsledky - bakalářská práce 2019 Kateřina Vrbová). Možnost regulace aktivity AMADH S-nitrosylací byla potvrzena v bakalářské práci Kateřiny Vrbové (2019), kdy bylo zjištěno, že po aplikaci donoru NO dochází

k inhibici AMADH, naopak aktivita DAO není ovlivněna. V předložené práci byla možnost regulace aktivity AMADH v důsledku vystavení rostlin TS testována experimentem s DTT. DTT je silné redukční činidlo, odstraňující NO z vazby s thiolovou skupinou cysteinů v proteinové struktuře. Pro orientační stanovení možnosti regulace AMADH aktivity S-nitrosylací, byly vybrány rostliny 2 h po zahájení experimentu vystavené krátkodobému (tj. 2h) TS, u kterých byl detekován pokles AMADH aktivity. Po přídavku DTT k extraktům z kořenové i nadzemní části rostlin byla u obou kultivarů hrachu setého aktivita AMADH významně vyšší. Aplikace DTT k extraktům připraveným z kontrolních nestresovaných vzorků aktivitu AMADH nezvýšila (s vyjímkou kořenu hrachu setého kultivar Kudrnáč). Pro potvrzení předpokládané možnosti regulace aktivity AMADH S-nitrosylací v důsledku TS byl stanoven vliv DTT i v extraktu nadzemní části hrachu setého kultivar Kudrnáč 4. h po ukončení 2h TS, kdy byla zaznamenána snížená aktivita AMADH. V případě hrachu setého kultivar Twinset byla do experimentu vybrána nadzemní část odebraná 2. h po aplikaci 2h TS, kdy bylo stanoveno naopak dvojnásobné navýšení aktivity AMADH. Po aplikaci DTT ke vzorkům kultivaru Kudrnáč bylo detekováno zvýšení aktivity AMADH, což může poukazovat na možnost regulace aktivity AMADH S-nitrosylací, která ale musí být následně potvrzena např. metodou biotin-switch detekující S-nitrosylované proteiny. Naopak u kultivaru Twinset byl zaznamenán po přídavku DTT k extraktům mírný pokles aktivity AMADH. Lze předpokládat, že u tohoto kultivaru vlivem TS k S-nitrosylaci AMADH nedochází. Zvýšení aktivity AMADH v důsledku TS u hrachu setého kultivar Twinset, který vykazuje odolnost k patogenům, bude souviset se schopností tohoto kultivaru aktivovat obranné mechanismy, které mohou být spojené i s úlohou zvýšené koncentrace GABA (produkt AMADH reakce) v obranných reakcích rostliny. Protože nebyly detekované změny na proteinové úrovni AMADH zůstává otázkou, jak je aktivita AMADH u tohoto kultivaru regulovaná. Současně by bylo vhodné stanovit produkci ROS a RNS(NO) nejenom v kořenové části, ale i v nadzemní části rostliny. Pro stanovení změn hladin NO v důsledku TS lze využít NO analyzátor. Toto stanovení nebylo realizováno z časových důvodů.

Důležitou roli v reakci na abiotický stres hrají RNS. U různých rostlinných druhů byl popsán vliv NO na obranné mechanismy aktivované působením abiotických stresových faktorů (Corpas *et al*., 2008). NO se podílí také na řadě metabolických a vývojových procesů (Lamattina *et al*., 2003). Jedním z dílčích cílů této diplomové práce bylo analyzovat vliv TS na změnu hladiny RNS. V publikaci Corpas *et al*., (2008) provedli

studii, kdy v řezech listů hrachu setého po vystavení TS (1 h při 30 °C poté 1 h při 35 °C a nakonec 38 °C po dobu 4 h) byla pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM) studována změna produkce NO. V porovnání s kontrolními rostlinami byl v cévních svazcích stresovaných rostlin (hlavní místo produkce endogenního NO) zaznamenán pokles NO. U *M. sativa*, při vystavení teplotě 37 °C po dobu 2 h byla detekována vysoká produkce NO, naopak v listech *P. sativum* a semenáčcích *Chrysanthemum morifolium* byla pozorována nízká produkce NO při expozici 38 °C po dobu 4 h (Corpas *et al*., 2008; Chaki *et al*., 2011). Při krátkodobém působení 45 °C se hladina NO v listech *M. sativa* a *Nicotiana tabacum* zvýšila (Gould *et al*., 2003; Parankusam *et al*., 2017). V diplomové práci byly změny v hladině NO v důsledku TS detekovány histochemicky v apikálních částech postranních kořenů. Bylo prokázáno, že vlivem TS dochází v apikálních částech kořene k intenzivní produkci NO, která byla významně vyšší při dlouhodobém působení vysoké teploty (45 °C) v porovnání s pouze 2 h TS. Vyšší intenzitu produkce NO vykazoval citlivý kultivar hrachu setého Kudrnáč.

Pro NO je charakteristická interakce s thiolovými skupinami přítomnými v proteinových nebo peptidových cysteinových zbytcích za vzniku RSNO (Gaston, 1999; Carver *et al*., 2005). V současné době existuje řada důkazů, že S-nitrosylace proteinů může mít důležitou roli v regulaci aktivity proteinů u rostlin (Lindermayr *et al*., 2006; Wang *et al*., 2006). RSNO slouží jako zásobní a transportní NO v buňkách, a proto mohou zprostředkovávat také vzájemný přenos nitroso- skupin, tzv. trans S-nitrosylace (Wang *et al*., 2006). S-nitrosylace, PTM způsobená NO, ovlivňuje aktivitu řady antioxidačních enzymů, jako je CAT, SOD, peroxiredoxiny (Prx, EC 1.11.1.15) a enzymů ASH-GSH cyklu za stresových podmínek (Santisree *et al*., 2015). U *P. sativum* bylo popsáno, že S-nitrosylace cytosolické APX, která se podílí na regulaci buněčného H_2O_2, zvyšuje aktivitu APX (Shigeoka *et al*., 2002). Ortega-Galisteo *et al*. (2012) uvádí, že za použití GSNO jako nitrosylačního činidla bylo jako potenciální cíl S-nitrosylace identifikováno šest peroxisomálních enzymů z listů hrachu. Čtyři z nich hydroxypyruvátreduktasa, glykolátoxidasa, serin-glyoxylátaminotransferasa a aminotransferasa 1, se účastní fotorespirace, což znamená, že NO má význam na regulaci této metabolické dráhy (Astier *et al*., 2012). Dále bylo prokázáno, že u *A. thaliana* po napadení bakterií *Pseudomonas syringae* pv. tomato podléhá PrxII E S-nitrosylaci, která má za následek inhibici aktivity (Romero-Puertas *et al*., 2007; Romero-Puertas *et al*., 2008). Dalším enzymem regulovaným NO je NADPH oxidasa.

U *A. thaliana* je známo 10 genů RBOH, a mezi nimi se nachází *AtRBOHD*, který řídí syntézu ROS v reakci na patogeny, jako je *P. syringae* pv. tomato (Torres *et al*., 2002). Yun *et al*. (2011) provedli studii, podle které zjistili, že prostřednictvím S-nitrosylace dochází k inhibici aktivity NADPH oxidasy, což znamená, že produkce ROS může být kontrolována NO. Corpas *et al*. (2008) uvádí, že celkový obsah RSNO stanovený chemiluminiscenční metodou byl u hrachu setého po vystavení zvýšené teplotě (1 h při 30 °C poté 1 h při 35 °C a nakonec 38 °C po dobu 4 h) oproti kontrolním rostlinám až trojnásobně zvýšený. V experimentální části předložené diplomové práce byl v nadzemní části obou kultivarů hrachu setého lišící se odolností vůči patogenům stanoven obsah RSNO při krátkodobé i dlouhodobé expozici 45 °C. Významně zvýšenou produkci RSNO při krátkodobém i stálém TS vykazoval citlivý kultivar hrachu setého Kudrnáč. Zatímco u hrachu setého kultivar Twinset byla zvýšená hladina RSNO pouze v průběhu prvních dvou hodin po zahájení experimentu. Naopak u rostlin vystavených po TS zpětně 25 °C byl zaznamenán pokles hladiny. Změny v produkci RSNO v souvislosti se změnami v aktivitě AMADH u obou kultivarů poukazují na možnost regulace AMADH S-nitrosylací s možným dopadem na schopnost aktivovat obranné mechanismy rostliny. V případě citlivého kultivaru Kudrnáč detekovaná zvýšená hladina RSNO koreluje s prokázanou sníženou aktivitou AMADH, v důsledku možného inhibičního efektu S-nitrosylací. U odolného kultivaru byla pozorována opačná závislost.

V reakci na stresové faktory dochází ke zvýšené produkci ROS včetně $^1O_2$, $O_2^{-}\bullet$, H_2O_2 a OH•, které způsobují oxidační poškození (Mittler, 2002). V rostlinných buňkách jsou ROS produkovány kontinuálně v intracelulárních organelách (mitochondrie, chloroplasty, peroxisomy) jako vedlejší produkty různých metabolických drah (Apel a Hirt, 2004). Mezi hlavní účinky ROS patří peroxidace membránových lipidů a pigmentů, modifikace membránové permeability a funkcí (Hasanuzzaman *et al*., 2012). Vysoká koncentrace ROS způsobuje poškození buněčné struktury (Mittler *et al*., 2004). Ukazatelem poškození buněčných membrán ROS je malondialdehyd (MDA) (Hasanuzzaman *et al*., 2013). U fazole (*Phaseolus vulgaris*), byl zvýšený obsah H_2O_2 pozorován při vystavení rostliny teplotě 46 - 48 °C, což vedlo k peroxidaci membránových lipidů a ke zvýšené produkcei MDA (Nagesh Babu a Devaraj, 2008). U rostlin cizrny vystavené teplotě 40/30 °C (den/noc) se příznaky TS objevily v podobě chlorózy listů, poškození membrány a ztráty životaschopnosti tkání. K nejintenzivnějšímu poškození rostlin však došlo při teplotě 45/35 °C, kdy největší

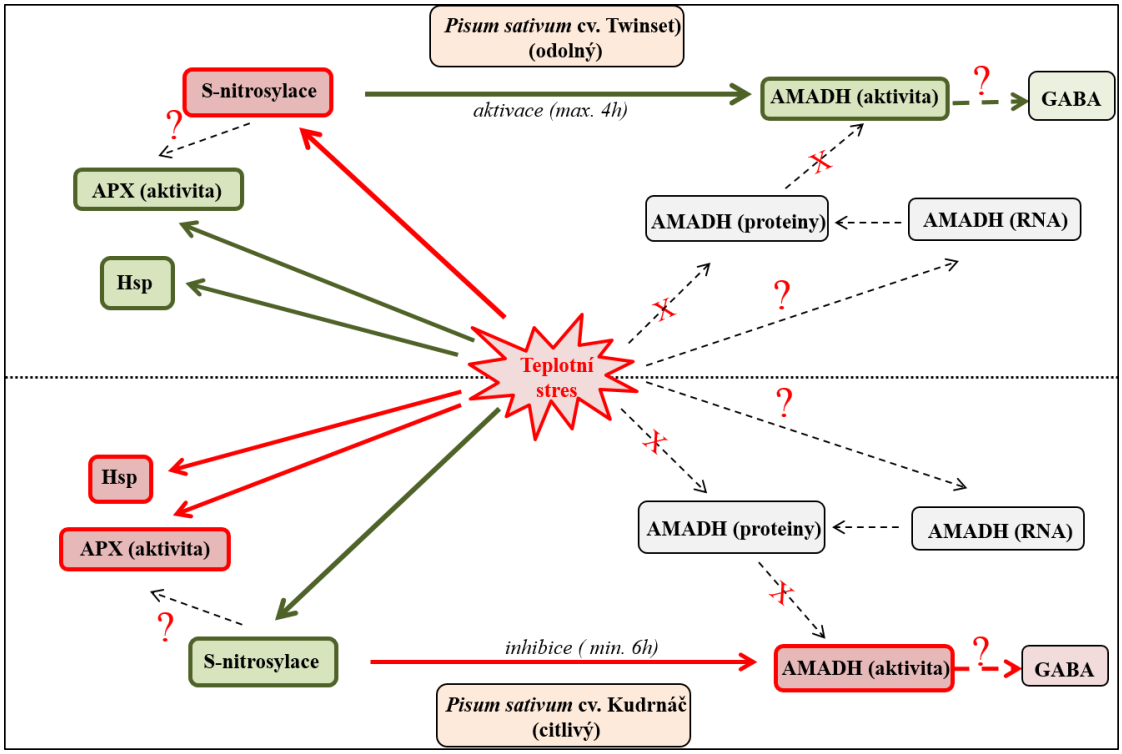
obsah H_2O_2 byl zaznamenán v kultivarech citlivých na teplo (Kumar *et al.*, 2011). Savicka a Škute (2010) zkoumali vliv dlouhodobého působení vysoké teploty (24 h při 42 °C) na oxidační poškození sazenic pšenice s ohledem na změnu v produkci O_2^{-}• a obsahu MDA. Největší změna produkce O_2^{-}• byla zaznamenána v kořenových částech ve všech vývojových fázích, naopak koncentrace MDA v kořenech stresovaných a kontrolních semenáčků se významně nelišila. Inhibice růstu kořenového systému může být spojena se silným oxidačním stresem, o čemž svědčí výrazný nárůst produkce kyslíku v kořenových buňkách (68 %) v časných fázích vývoje sazenic a nevýznamný nárůst produkce O_2^{-}• (6 %) 2 dny po expozici TS v porovnání s kontrolními sazenicemi. Zvýšení produkce O_2^{-}• bylo také pozorováno v kořenech v pozdních stádiích vývoje a stejný trend byl detekován 2 dny po expozici TS (6 a 42 %). Produkce O_2^{-}• po 2 dnech v pozdních stádiích byla navíc intenzivnější než v raných fázích vývoje (79 % a 22 %) (Savicka a Škute, 2010). V diplomové práci s využitím fluorescenční sondy H_2DCF DA bylo zjištěno, že vlivem TS dochází v apikálních částech kořene k intenzivní produkci ROS a RNS, která byla nejvyšší při dlouhodobém působení vysoké teploty (45 °C) a to zejména 6 h od zahájení experimentu. Mezi kultivary hrachu setého Kudrnáč a Twinset nebyly pozorovány významné rozdíly. Pro stanovení ROS bude vhodné v navazujících experimentech využít histochemickou detekci O_2^{-}• pomocí nitrotetrazoliové modři (NBT) a H_2O_2 pomocí 3,3'-diaminobenzidinu (DAB).

Tolerance vůči TS je spojena se zvýšenou aktivitou antioxidačních enzymů. V rostlinách *P. vulgaris* byla při vysokém TS pozorována zvýšená aktivita glutathionreduktasy (GR), peroxidasy (POX) a ASH (Nagesh Babu a Devaraj, 2008). Chakraborty a Pradhan (2011) u čočky při vzrůstu teploty z 20 °C na 50 °C zaznamenali zvýšení aktivity CAT, APX a SOD. Teplotně tolerantní kultivary cizrny vykazovaly větší aktivitu APX a GR, což pravděpodobně ovlivňuje teplotní toleranci dané rostliny (Kumar *et al.*, 2011). Teplotně tolerantní kultivar pšenice C306 vykazoval vyšší aktivitu SOD, APX, CAT, GR a POX, zatímco u teplotně citlivého kultivaru PBW 343 byl zaznamenán významný pokles CAT, GR a POX aktivity v reakci na TS (Almeselmani *et al.*, 2009). Získaná termotolerance u kultivarů pšenice koreluje s vyšší aktivitou antioxidantů (CAT, SOD, ASH) a s menším oxidačním poškozením (Sairam *et al.*, 2000). Jak již bylo uvedeno výše, aktivita řady antioxidačních enzymů může být regulována S-nitrosylací (Santisree *et al.*, 2015). V diplomové práci jsme pozorovali podobný trend rozdílné odpovědi na TS na úrovni změn aktivity antioxidačních enzymů u kultivarů s rozdílnou odolností. V důsledku krátkodobého TS jsme zaznamenali

zvýšení APX aktivity u hrachu setého kultivaru Twinset odolného na řadu patogenů, naopak snížená APX aktivita byla pozorována u citlivého hrachu setého kultivaru Kudrnáč.

S produkcí ROS jsou úzce spojeny Hsp, které v obranných mechanismech rostlin napomáhají k získání tolerance vůči stresu (Suzuki a Mittler, 2006). V důsledku TS dochází k chybnému skládání nově syntetizovaných proteinů a denaturaci existujících proteinů. Jednotlivé rostlinné druhy a kultivary v rámci jednoho druhu se v expresi Hsp liší (Bita a Gerats, 2013). Hsp jsou exprimovány i za fyziologických podmínek, ale jejich exprese se zvyšuje v reakci na stresové podmínky (Robert, 2003). V jedné studii byla sledována interakce mezi Hsp70 a ABA, která spouští antioxidační odpověď při vystavení rostlin kukuřice na stres v kombinaci sucha a tepla. Bylo zjištěno, že po aplikaci 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$ ABA se zvyšuje aktivita SOD, APX, GR a CAT, exprese Hsp70 a produkce H_2O_2 za stresových podmínek. Produkce H_2O_2 indukovaná ABA tak zvyšuje syntézu Hsp70 a reguluje aktivitu antioxidačních enzymů, což vede k eliminaci ROS (Hu *et al*., 2010). Chen *et al*. (2008) analyzovali expresi genů Hsp70 po infekci a tepelném ošetření tabáku (*Nicotiana benthamiana*). Bylo prokázáno, že exprese šesti genů Hsp70 *N. benthamiana* je indukována po tepelném ošetření a virové infekci, která byla účinkem vysoké teploty zvýšena. Zvýšená produkce Hsp70 byla zaznamenána pouze v nadzemní části hrachu setého kultivaru Twinset odolného na řadu patogenů.

Dosažené dílčí výsledky studia vlivu TS na aktivaci obranných mechanismů u hrachu setého, realizované na dvou kultivarech lišících se odolností vůči patogenním mikroorganismům, jsou přehledně shrnuty na Obr. 33. Výsledky se týkají vyhodnocení stanovovaných parametrů v nadzemní části rostlin po aplikaci krátkodobého TS. Odolný kultivar Twinset v reakci na TS aktivuje produkci Hsp, aktivuje APX (antioxidační systém), produkci GABA (aktivitu AMADH). Na Obr. 18 jsou kurzívou uvedeny experimenty, které by bylo vhodné realizovat pro potvrzení úlohy AMADH a její regulace v reakci hrachu setého na TS.



Obr. 33 Schéma znázorňující výsledné parametry v nadzemní části dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *Pisum sativum* cv. Twinset) získané v rámci studia krátkodobého teplotního stresu. Červené čáry značí inhibici, zelené čáry značí aktivaci. AMADH aminoaldehyddehydrogenasa, APX askorbátperoxidasa, GABA kyselina γ-aminomáselná, Hsp heat shock proteiny.

6 ZÁVĚR

V teoretické části předložené diplomové práce byla vypracována literární rešerše, kde byla popsána úloha reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) a heat shock proteinů (Hsp) při abiotickém stresu se zaměřením na teplotní stres (TS). Byl uveden vliv NO v reakci na TS se zaměřením na regulaci aktivity proteinů posttranslační modifikací S-nitrosylací. Dále byly shrnuty poznatky týkající se úlohy polyaminů v reakci na abiotický stres. Hlavní část práce byla věnována charakterizaci enzymů aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) a aminoxidas (polyaminoxidasy (PAO) a diaminoxidasy (DAO)) podílejících se na katabolismu polyaminů.

V experimentální části diplomové práce byl u dvou kultivarů hrachu setého (*P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset) s rozdílnou odolností vůči patogenům studován vliv krátkodobého a dlouhodobého zvýšení teploty 45 °C na aktivitu dvou enzymů AMADH a DAO klíčových pro degradaci polyaminů. Za předpokladu možné regulace aktivity AMADH S-nitrosylací byla stanovena hladina S-nitrosothiolů (RSNO). Dále byl sledován vliv TS na aktivitu askorbátperoxidasy (APX) nezbytné pro eliminaci ROS za stresových podmínek.

Z dosažených výsledků lze vyvodit následující dílčí závěry:

1. Dlouhodobé vystavení teplotě 45 °C způsobilo intenzivní nárůst hladiny RNS i ROS, což vede k nitrosačnímu a oxidačnímu stresu.
2. Po vystavení rostlin krátkodobému TS (2 h) byly změny v produkci RNS i ROS významně nižší v porovnání s dlouhodobým TS. Vyšší produkci NO vykazoval hrách setý kultivar Kudrnáč.
3. Teplotní stres způsobil v nadzemní části rostlin nárůst hladiny RSNO. V reakci na krátkodobý stres byla u hrachu setého kultivaru Kudrnáč detekována následně (po ukončení teplotního stresu) zvýšená hladina RSNO, naopak u kultivaru Twinset byl zaznamenán pokles hladiny RSNO.
4. V rámci obranné reakce na krátkodobý TS došlo k významnénu nárůstu aktivity AMADH v kořenové a nadzemní části hrachu setého kultivaru Twinset, což koresponduje s nižší hladinou RSNO a nižší produkcí NO. Naopak u kultivaru Kudrnáč byla aktivita AMADH nižší, což je opět v souladu s vyšší produkcí NO a vysokou hladinou RSNO.

5. Při krátkodobém působení zvýšené teploty 45 °C nebyly detekovány změny v hladině AMADH na proteinové úrovni. V případě stálého vystavení rostlin teplotě 45 °C byl u obou kultivarů zaznamenán pokles hladiny proteinů AMADH.
6. Experiment s dithiothreitolem (DTT), 2. případně 4. h po ukončení krátkodobého TS, poukazuje na regulaci aktivity AMADH S-nitrosylací (pouze u hrachu setého kultivar Kudrnáč po aplikaci DTT byl detekován nárust aktivity AMADH).
7. Změny v DAO aktivitě v důsledku TS byly pozorovány v kořenové části, a to zejména u hrachu setého kultivar Kudrnáč u stálého TS. V navazujících experimentech by bylo vhodné nalézt souvislosti mezi změnou DAO aktivity, hladinou PAO, ROS produkcí a lipidickou peroxidací.
8. Zvýšení aktivity APX a produkce Hsp byly detekované pouze u hrachu setého kultivaru Twinset.

Zobecňující závěry předložené práce lze shrnout do dvou bodů:

1. U hrachu setého kultivar Twinset (zvýšená odolnost na patogeny) na rozdíl od kultivaru Kudrnáč (citlivý kultivar) v reakci na krátkodobý TS (2h při 45°C) byla zaznamenána aktivace obranných mechanismů, tj zvýšená aktivita APX, produkce Hsp, zvýšená aktivita AMADH vedoucí k produkci GABA.

2. Výsledky experimentů s DTT a korelace detekované hladiny RSNO se změnami v aktivitách AMADH v důsledku krátkodobého TS poukazují na možnost regulace aktivity AMADH S-nitrosylací. Toto tvrzení je nutné následně dále prokázat např. metodou biotin-switch.

7 LITERATURA

Alcázar R., García-Martínez J.L., Cuevas J.C., Tiburcio A.F., Altabella T. (2005): Overexpression of ADC2 in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *The Plant Journal* **43**, 425-436.

Alcázar R., Marco F., Cuevas J.C., Patron M., Ferrando A., Carrasco P., Tiburcio A.F., Altabella T. (2006): Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology letters* **28**, 1867-1876.

Alcázar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcio A.F. (2010): Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* **231**, 1237-1249.

Allen G.J., Chu S.P., Schumacher K., Shimazaki C.T., Vafeados D., Kemper A., Hawke S.D., Tallman G., Tsien R.Y., Harper J.F., Chory J., Schroeder J.I. (2000): Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis* det3 mutant. *Science* **289**, 2338

Almeselmani M., Deshmukh P., Sairam R. (2009): High temperature stress tolerance in wheat genotypes: role of antioxidant defence enzymes. *Acta Agronomica Hungarica 57*, 1-14.

Amako K., Chen G.X., Asada K. (1994): Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology* **35**, 497-504.

Angelini R., Bragaloni M., Federico R., Infantino A., Porta-Pugua A. (1993): Involvement of polyamines, diamine oxidase and peroxidase in resistance of chickpea to *Ascochyta rabiei*. *Journal of Plant Physiology* **142**, 704-709.

Angelini R., Cona A., Federico R., Fincato P., Tavladoraki P., Tisi A. (2010): Plant amine oxidases "on the move": an update. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 560-564.

Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-399.

Asada K. (1992): Ascorbate peroxidase–a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* **85**, 235-241.

Asada K. (1999): The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology* **50**, 601-639.

Asgher M., Per T.S., Anjum S., Khan M.I.R., Masood A., Verma S., Khan N.A. (2017): Contribution of glutathione in heavy metal stress tolerance in plants. In: *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress.* (Khan M., Khan N., eds.), Springer, Singapore, 297-313.

Asthir B., Kumari M. (2017): Modulation of antioxidant defense system and polyamine catabolism in rice leaves under two planting conditions. *Cereal Research Communications* **45**, 57-67.

Astier J., Kulik A., Koen E., Besson-Bard A., Bourque S., Jeandroz S., Lamotte O., Wendehenne D. (2012): Protein S-nitrosylation: what's going on in plants?. *Free Radical Biology and Medicine* **53**, 1101-1110.

Bagga S., Dharma A., Phillips G.C., Kuehn G.D. (1991): Evidence for the occurrence of polyamine oxidase in the dicotyledonous plant *Medicago sativa* L.(alfalfa). *Plant cell reports* **10**, 550-554.

Baniwal S.K., Bharti K., Chan K.Y., Fauth M., Ganguli A., Kotak S., Mishra S.K., Nover L., Port M., Scharf K.D., Tripp J., Weber Ch., Zielinski D., Von Koskull- Döring P. (2004): Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *Journal of biosciences* **29**, 471-487.

Benhar M. (2015): Nitric oxide and the thioredoxin system: a complex interplay in redox regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1850**, 2476-2484.

Benhar M. (2018). Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **127**, 160-164.

Bhattacharjee S. (2012): The language of reactive oxygen species signaling in plants. *Journal of Botany* **2012**, 1-22.

Biswas S., Chida A.S., Rahman I. (2006): Redox modifications of protein–thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochemical pharmacology* **71**, 551-564.

Bita C., Gerats T. (2013): Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in plant science* **4**, 273.

Boguszewska D., Zagdanska B. (2012): ROS as signalling molecules and enzymes of plant response to unfavorable environmental conditions, oxidative stress-molecular mechanisms and biological effects. In: *Oxidative Stress—Molecular Mechanisms and Biological Effects*. (Lushchak V., Semchyshyn H.M. eds.), InTech, Janeza Trdine, Croatia, 341–362.

Bouche N., Fromm H. (2004): GABA in plants: just a metabolite?. *Trends in plant science* **9**, 110-115.

Bown A.W., Shelp B.J. (1997): The metabolism and functions of [gamma]-aminobutyric acid. *Plant Physiology* **115**, 1.

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.

Brauner F., Šebela M., Snégaroff J., Peč P., Meunier J.C. (2003): Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 1-10.

Buchner J. (1999): Hsp90 & Co.–a holding for folding. *Trends in biochemical sciences* **24**, 136-141.

Bukau B., Horwich A.L. (1998): The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351-366.

Cakmak I., Strbac D., Marschner H. (1993): Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany* **44**, 127-132.

Carver J., Doctor A., Zaman K., Gaston B. (2005): S-Nitrosothiol formation. *Methods in enzymology* **396**, 95-105.

Cassia R., Nocioni M., Correa-Aragunde N., Lamattina L. (2018): Climate change and the impact of greenhouse gasses: CO_2 and NO, friends and foes of plant oxidative stress. *Frontiers in plant science* **9**, 273.

Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. (2006): Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in plant science* **11**, 80-88.

Cooper C.E. (1999): Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1411**, 290-309.

Corpas F.J., Sandalio L.M., Del Rio L.A., Trelease R.N. (1998): Copper–zinc superoxide dismutase is a constituent enzyme of the matrix of peroxisomes in the cotyledons of oilseed plants. *The New Phytologist* **138**, 307-314.

Corpas F.J., Chaki M., Fernández-Ocaña A.M, Valderrama R., Palma J.M., Carreras, A., Begara-Morales J.C., Airaki M., Del Río L.A., Barroso, J. B. (2008): Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant and cell physiology* **49**, 1711-1722.

Corpas F.J., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J.M., Barroso J.B. (2011): Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science*, **181**, 604-611.

Corpas F.J., Alché J.D.D., Barroso J.B. (2013): Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in Plant Science* **4**, 126.

Cowley T., Walters D.R. (2002): Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. hordei. *Plant, Cell & Environment* **25**, 461-468.

Das K., Roychoudhury A. (2014): Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* **2**, 53.

De Gara L., Locato V., Dipierro S., De Pinto M.C. (2010): Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respiratory physiology & neurobiology* **173**, S13-S19.

De Leonardis S., Dipierro N., Dipierro S. (2000). Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 773-779.

De Pinto M.C., Paradiso A., Leonetti P., De Gara L. (2006): Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *The Plant Journal* **48**, 784-795.

De Pinto M.C., Locato V., Sgobba A., de Carmen Romero-Puertas M., Gadaleta C., Delledonne M., De Gara L. (2013): S-nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signaling in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiology* **163**, 1766-1775.

Del Río L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gómez M., Barroso J.B. (2002): Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of experimental botany* **53**, 1255-1272.

Del Río L.A., López-Huertas, E. (2016): ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant and Cell Physiology* **57**, 1364-1376.

Diao Q.N., Song Y.J., Shi D.M., Qi H.Y. (2016): Nitric oxide induced by polyamines involves antioxidant systems against chilling stress in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* **17**, 916-930.

Dietz K.J., Turkan I., Krieger-Liszkay A. (2016): Redox-and reactive oxygen species-dependent signaling into and out of the photosynthesizing chloroplast. *Plant Physiology* **171**, 1541-1550.

Dixon D.P., Skipsey M., Edwards R. (2010): Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **71**, 338-350.

Duhazé C., Gouzerh G., Gagneul D., Larher F., Bouchereau A. (2002): The conversion of spermidine to putrescine and 1,3-diaminopropane in the roots of *Limonium tataricum*. *Plant Science* **163**, 639-646.

Fancy N.N., Bahlmann A.K., Loake G.J. (2017): Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, cell & environment* **40**, 462-472.

Fitzgerald T.L., Waters D.L., Henry R.J. (2009): Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant biology* **11**, 119-130.

Flores H.E., Filner P. (1985): Polyamine catabolism in higher plants: characterization of pyrroline dehydrogenase. In: *Polyamines in Plants*. Vol. 18, (Galston A.W., Smith T.A., eds.), Springer, Dordrecht, 75-89.

Foyer C.H., Halliwell B. (1976): The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**, 21-25.

Foyer C.H., Noctor G. (2011): Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology* **155**, 2-18.

Freschi L. (2013): Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* **4**, 398.

Fridovich I. (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry* **64**, 97-112.

Frydman J. (2001): Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual review of biochemistry* **70**, 603-647.

Fujimoto M., Nakai A. (2010): The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *The FEBS journal* **277**, 4112-4125.

Gadjev I., Stone J.M., Gechev T.S. (2008): Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International review of cell and molecular biology* **270**, 87-144.

Gaston B. (1999): Nitric oxide and thiol groups. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1411**, 323-333.

Gil-Amado J.A., Gomez-Jimenez M.C. (2012): Regulation of polyamine metabolism and biosynthetic gene expression during olive mature-fruit abscission. *Planta* **235**, 1221-1237.

Gill S.S., Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry* **48**, 909-930.

Gilroy S., Białasek M., Suzuki N., Górecka M., Devireddy A.R., Karpiński S., Mittler R. (2016): ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiology* **171**, 1606-1615.

Gomes A., Fernandes E., Lima J.L. (2005): Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of biochemical and biophysical methods* **65**, 45-80.

Gould K.S., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A., Wendehenne D. (2003): Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response?. *Plant, Cell & Environment* **26**, 1851-1862.

Grill E., Löffler S., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1989): Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 6838-6842.

Groppa M.D., Benavides M.P. (2008): Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* **34**, 35–45.

Gupta K., Dey A., Gupta B. (2013): Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta physiologiae plantarum* **35**, 2015-2036.

Gupta K., Sengupta A., Chakraborty M., Gupta B. (2016): Hydrogen peroxide and polyamines act as double edged swords in plant abiotic stress responses. *Frontiers in plant science* **7**, 1343.

Gupta S.C., Sharma A., Mishra M., Mishra R.K., Chowdhuri D.K. (2010): Heat shock proteins in toxicology: how close and how far?. *Life sciences* **86**, 377-384.

Hahn A., Bublak D., Schleiff E., Scharf K.D. (2011): Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. *The Plant Cell* **23**, 741-755.

Hartl F.U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571.

Hasanuzzaman M, Hossain M.A., da Silva J.A.T., Fujita M. (2012): Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defenses is a key factors. In: *Crop stress and its management: Perspectives and strategies*. (Bandi V., Shanker A.K., Shanker C., Mandapaka M., eds.), Springer, Dordrecht, 261-316.

Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M. (2013): Extreme temperatures, oxidative stress and antioxidant defense in plants. In: *Abiotic Stress—Plant Responses and Applications in Agriculture*. (Vahdati K., Leslie C., eds.), IntechOpen, Rijeka, Croatia, 169–205.

Hemantaranjan A., Bhanu A.N., Singh M.N., Yadav D.K., Patel P.K., Singh R. (2014): Heat stress responses and thermotolerance. *Adv. Plants Agric. Res* **1**, 00012.

Hendrick J.P., Hartl F.U. (1993): Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual review of biochemistr* **62**, 349-384.

Hensley K., Williamson K.S., Floyd R.A. (2003): Fluorogenic analysis of H_2O_2 in biological materials. In: *Methods in Biological Oxidative Stress*. *Methods in Pharmacology and Toxicology*. (Hensley K., Floyd R.A., eds.), Humana Press, New York, U.S.A., 169-174.

Hess D.T., Matsumoto A., Kim S.O., Marshall H.E., Stamler J.S. (2005): Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**, 150.

Hossain M.A., Bhattacharjee S., Armin S.M. Qian P., Xin W., Li H.Y., Burritt D.J., Fujita M., Tran L.S.P. (2015): Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in plant science* **6**, 420.

Hu X., Liu R., Li Y., Wang W., Tai F., Xue R., Li C. (2010): Heat shock protein 70 regulates the abscisic acid-induced antioxidant response of maize to combined drought and heat stress. *Plant Growth Regulation* **60**, 225-235.

Hummel I., Bourdais G., Gouesbet G., Couée I., Malmberg R.L., El Amrani A. (2004): Differential gene expression of arginine decarboxylase *ADC1* and *ADC2* in *Arabidopsis thaliana*: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development. *New Phytologist* **163**, 519-531.

Hussain A., Mun B.G., Imran Q.M., Lee S.U., Adamu T.A., Shahid M., Kim K.M., Yun B.W. (2016): Nitric oxide mediated transcriptome profiling reveals activation of multiple regulatory pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science* **7**, 975.

Hussain S.S., Ali M., Ahmad M., Siddique K.H. (2011): Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology advances* **29**, 300-311.

Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A.M, Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V, López-Jaramillo J. Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B. (2011): High temperature triggers the metabolism of S-nitrosothiols in sunflower mediating a process of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin–NADP reductase by tyrosine nitration. *Plant, Cell & Environment* **34**, 1803-1818.

Chakraborty U., Pradhan D. (2011): High temperature-induced oxidative stress in *Lens culinaris*, role of antioxidants and amelioration of stress by chemical pre-treatments. *Journal of Plant Interactions* **6**, 43-52.

Chen X., Tian X., Shin I., Yoon J. (2011): Fluorescent and luminescent probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species. *Chemical Society Reviews* **40**, 4783-4804.

Chen Z., Zhou T., Wu X., Hong Y., Fan Z., Li H. (2008): Influence of cytoplasmic heat shock protein 70 on viral infection of *Nicotiana benthamiana*. *Molecular plant pathology* **9**, 809-817.

Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E., Mittler R. (2017): Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* **90**, 856-867.

Ikeda M., Mitsuda N., Ohme-Takagi M. (2011): *Arabidopsis* HsfB1 and HsfB2b act as repressors for the expression of heat-inducible Hsfs but positively regulate the acquired thermotolerance. *Plant physiology* **157**; 1234-1254.

Imai J., Maruya M., Yashiroda H., Yahara I., Tanaka K. (2003): The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *The EMBO journal* **22**, 3557-3567.

Ishikawa T., Sakai K., Yoshimura K., Takeda T., Shigeoka S. (1996): cDNAs encoding spinach stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3′-coding regions. *FEBS letters* **384**, 289-293.

Jacob P., Hirt H., Bendahmane A. (2017): The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant biotechnology journal* **15**, 405-414.

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.

Jimenez A., Hernandez J.A., Del Río L.A., Sevilla F. (1997): Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant physiology* **114**, 275-284.

Kapoor D., Sharma R., Handa N., Kaur H., Rattan A., Yadav P., Gautam V., Kaur R., Bhardwaj R. (2015): Redox homeostasis in plants under abiotic stress: role of electron carriers, energy metabolism mediators and proteinaceous thiols. *Frontiers in Environmental Science* **3**, 13.

Khan A., Ashraf M. (2008): Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environmental and Experimental Botany* **63**, 224-231.

Kim N.H., Kim B.S., Hwang B.K. (2013): Pepper arginine decarboxylase is required for polyamine and γ-aminobutyric acid signaling in cell death and defense response. *Plant Physiology* **162**, 2067-2083.

Kinnersley A.M., Turano F.J. (2000): Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences* **19**, 479-509.

Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T. (1999): Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angewandte Chemie International Edition* **38**, 3209-3212.

Kopečný D., Končitíková R., Tylichová M., Vigouroux A., Moskalíková H., Soural M., Šebela M., Moréra S. (2013): Plant ALDH10 family identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 9491-9507.

Kotak S., Larkindale J., Lee U., Von Koskull-Döring P., Vierling E., Scharf K.D. (2007): Complexity of the heat stress response in plants. *Current opinion in plant biology* **10**, 310-316.

Kotchoni S.O., Gachomo E.W. (2006): The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *Journal of biosciences* **31**, 389-404.

Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the national academy of sciences* **97**, 2940-2945.

Krasensky-Wrzaczek J., Kangasjärvi J. (2018): The role of reactive oxygen species in the integration of temperature and light signals. *Journal of experimental botany* **69**, 3347-3358.

Kumar S., Kaur R., Kaur N., Bhandhari K., Kaushal N., Gupta, K., Bains T.S., Nayyar H. (2011): Heat-stress induced inhibition in growth and chlorosis in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is partly mitigated by ascorbic acid application and is related to reduction in oxidative stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 2091.

Kumria R., Rajam M.V. (2002): Alteration in polyamine titres during *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice with ornithine decarboxylase gene affects plant regeneration potential. *Plant Science* **162**, 769-777.

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680.

Laloi C., Apel K., Danon A. (2004): Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current opinion in plant biology* **7**, 323-328.

Lamattina L., García-Mata C., Graziano M., Pagnussat G. (2003): Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual review of plant biology* **54**, 109-136.

Lamb C., Dixon R.A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant biology* **48**, 251-275.

Larkindale J., Knight M.R. (2002): Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant physiology* **128**, 682-695.

Larkindale J., Huang B. (2004): Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *Journal of plant physiology* **161**, 405-413.

Latterich M., Patel S. (1998): The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends in cell biology* **8**, 65-71.

Leach M.D., Klipp E., Cowen L.E., Brown A.J. (2012): Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 693.

Lee S., Kim S.M., Lee R.T. (2013): Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & redox signaling* **18**, 1165-1207.

Leitner M., Vandelle E., Gaupels F., Bellin D., Delledonne M. (2009): NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Current opinion in 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-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 789-793.

Li B., Gao K., Ren H., Tang W. (2018): Molecular mechanisms governing plant responses to high temperatures. *Journal of integrative plant biology* **60**, 757-779.

Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., Durner J. (2006): Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry*, **281** 4285-4291.

Lindquist S., Craig E.A. (1988): The heat-shock proteins. *Annual review of genetics* **22**, 631-677.

Luhová L., Lebeda A., Hedererová D., Peč P. (2003): Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light conditions. *Plant soil and environment* **49**, 151-157.

Mainz E.R., Gunasekara D.B., Caruso G., Jensen D.T., Hulvey M.K., da Silva J.A.F., Metto E.C., Culbertson A.H., Culbertson Ch.T., Lunte S.M. (2012): Monitoring intracellular nitric oxide production using microchip electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Analytical Methods* **4**, 414-420.

Matsuo Y., Yodoi J. (2013): Extracellular thioredoxin: a therapeutic tool to combat inflammation. *Cytokine & growth factor reviews* **24**, 345-353.
Medda R., Padiglia A., Floris G. (1995): Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry* **39**, 1-9.
Miller G., Shulaev V., Mittler R. (2008): Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia plantarum* **133**, 481-489.
Mishra D., Shekhar S., Singh D., Chakraborty S., Chakraborty N. (2018): Heat Shock Proteins and Abiotic Stress Tolerance in Plants. In: *Regulation of Heat Shock Protein Responses*. Vol. 13, (Asea A., Kaur P., eds.). Springer, Cham, 41-69.
Mishra S.K., Tripp J., Winkelhaus S., Tschiersch B., Theres K., Nover L., Scharf K.D. (2002): In the complex family of heat stress transkcription faktors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes & Development* **16**, 1555-1567.
Missihoun T.D., Schmitz J., Klug R., Kirch H.H., Bartels D. (2011): Betaine aldehyde dehydrogenase genes from *Arabidopsis* with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta* **233**, 369-382.
Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* **7**, 405-410.
Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004): Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science* **9**, 490-498.
Møller I.M. (2001): Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual review of plant biology* **52**, 561-591.
Møller S.G., McPherson M.J. (1998): Developmental expression and biochemical analysis of the *Arabidopsis atao1* gene encoding an H_2O_2-generating diamine oxidase. *The Plant Journal* **13**, 781-791.
Morimoto R.I., Sarge K.D., Abravaya K. (1992): Transkriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 21987-21990.
Moschou P.N., Paschalidis K.A., Roubelakis-Angelakis K.A. (2008): Plant polyamine catabolism: the state of the art. *Plant signaling & behavior* **3**, 1061-1066.
Moschou P.N., Wu J., Cona A., Tavladoraki P., Angelini R., Roubelakis-Angelakis K.A. (2012): The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of experimental botany* **63**, 5003-5015.
Nadeem M., Li J., Wang M., Shah L., Lu S., Wang X., Ma C. (2018): Unraveling field crops sensitivity to heat stress: Mechanisms, approaches, and future prospects. *Agronomy* **8**, 128.
Nagesh Babu R., Devaraj V.R. (2008): High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Australian Journal of Crop Science* **2**, 40-48.
Nakano Y., Asada K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology* **22**, 867-880.
Neill S., Bright, J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Wilson I. (2007): Nitric oxide evolution and perception. *Journal of Experimental Botany* **59**, 25-35.
Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of experimental botany* **53**, 1237-1247.
Nikitovic D., Holmgren A. (1996): S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 19180-19185.
Noctor G., Foyer C.H. (1998): A re-evaluation of the ATP: NADPH budget during C3 photosynthesis: a contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity?. *Journal of Experimental Botany* **49**, 1895-1908.
Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C.H. (2002): Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of experimental botany* **53**, 1283-1304.
Noctor G., De Paepe R., Foyer C.H. (2007): Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in plant science* **12**, 125-134.

Noctor G., Reichheld J.P., Foyer C.H. (2018): ROS-related redox regulation and signaling in plants. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Vol.80, (Vriz S., ed.), Academic Press, Massachusetts, U.S.A, 3-12.

Nover L., Scharf K.D., Gagliardi D., Vergne P., Czarnecka-Verner E., Gurley W.B. (1996): The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell stress & chaperones* **1**, 215.

Nover L., Bharti K., Döring P., Mishra S.K., Ganguli A., Scharf K.D. (2001): *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need?. *Cell stress & chaperones* **6**, 177.

Ohama N., Sato H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2017): Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in plant science* **22**, 53-65.

Ohta M., Takaiwa F. (2014): Emerging features of ER resident J-proteins in plants. *Plant signaling & behavior* **9**, e28194.

Ortega-Galisteo A.P., Rodríguez-Serrano M., Pazmiño D.M., Gupta D.K., Sandalio L.M., Romero-Puertas M.C. (2012): S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *Journal of experimental botany* **63**, 2089-2103.

Overmyer K., Brosché M., Kangasjärvi J. (2003): Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in plant science* **8**, 335-342.

Parankusam S., Adimulam S. S., Bhatnagar-Mathur P., Sharma K.K. (2017): Nitric oxide (NO) in plant heat stress tolerance: current knowledge and perspectives. *Frontiers in plant science* **8**, 1582.

Park C.J., Seo Y.S. (2015): Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity. *The plant pathology journal* **31**, 323.

Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klüsener B., Allen G.J., Grill E., Schroeder J.I. (2000): Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731.

Perazzolli M., Romero-Puertas M.C., Delledonne M. (2005): Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *Journal of Experimental Botany* **57**, 479-488.

Perez-Amador M.A., Leon J., Green P.J., Carbonell J. (2002): Induction of the arginine decarboxylase *ADC2* gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in Arabidopsis. *Plant Physiology* **130**, 1454-1463.

Petřivalský M., Brauner F., Luhová L., Gagneul D., Šebela M. (2007): Aminoaldehyde dehydrogenase activity during wound healing of mechanically injured pea seedlings. *Journal of plant physiology* **164**, 1410-1418.

Pfannschmidt T. (2003): Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends in plant science* **8**, 33-41.

Planas-Portell J., Gallart M., Tiburcio A.F., Altabella T. (2013): Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* **13**, 109.

Podgórska A., Burian M., Szal B. (2017): Extra-cellular but extra-ordinarily important for cells: apoplastic reactive oxygen species metabolism. *Frontiers in plant science* **8**, 1353.

Podlešáková K., Ugena L., Spíchal L., Doležal K., De Diego N. (2018): Phytohormones and polyamines regulate plant stress responses by altering GABA pathway. In: *Biotechnology of Plant Products:Green for Good IV*. Vol. 48, (Tarkowski P., Frébort I., eds), *New biotechnology*, Czech Republic, Olomouc, 1-90.

Quan L.J., Zhang B., Shi W.W., Li H.Y. (2008): Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 2-18.

Rainwater D.T., Gossetp D.R., Millhollon E.P., Hanna H.Y., Banks S.W., Lucas M.C. (1996): The relationship between yield and the antioxidant defense system in tomatoes grown under heat stress. *Free radical research* **25**, 421-435.

Raja V., Majeed, U., Kang H., Andrabi K.I., John R. (2017): Abiotic stress: interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environmental and experimental botany* **137**, 142-157.

Rangan P., Subramani R., Kumar R., Singh A.K., Singh R. (2014): Recent advances in polyamine metabolism and abiotic stress tolerance. *BioMed research international*, **2014**, 9.

Rao A.C., Reddy A.R. (2008): Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in plant cells. In: *Sulfur assimilation and abiotic stress in plants*. (Khan N.A., Singh S., Umar S., eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, 111-147.

Rea G., Metoui O., Infantino A., Federico R., Angelini R. (2002): Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiology* **128**, 865-875.

Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C., Siedow J.N. (2006): Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant physiology* **141**, 357-366.

Robert J. (2003): Evolution of heat shock protein and immunity. *Developmental & Comparative Immunology* **27**, 449-464.

Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual review of plant biology* **61**, 621-649.

Romero-Puertas M.C., Laxa M., Matte A., Zaninotto F., Finkemeier I., Jones A.M., Perazzolli M., Vandelle E., Dietz K.J., Delledonne M. (2007): S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *The Plant Cell* 19, 4120-4130.

Romero-Puertas M.C., Campostrini N., Mattè A., Righetti P.G., Perazzolli M., Zolla L., Roepstorff P., Delledonne M. (2008): Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis* thaliana undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**, 1459-1469.

Rouhier N., Lemaire S.D., Jacquot J.P. (2008): The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 143-166.

Roychoudhury A., Basu S., Sengupta D.N. (2011): Amelioration of salinity stress by exogenously applied spermidine or spermine in three varieties of indica rice differing in their level of salt tolerance. *Journal of plant physiology* **168**, 317-328.

Rug M., Maier A.G. (2011): The heat shock protein 40 family of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *IUBMB life* **63**, 1081-1086.

Sagi M., Fluhr R. (2006): Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant physiology* **141**, 336-340.

Sah S.K., Reddy K.R., Li J. (2016): Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in plant science* **7**, 571.

Sairam R.K., Srivastava G.C., Saxena D.C. (2000): Increased antioxidant activity under elevated temperatures: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biologia Plantarum* **43**, 245-251.

Sakamoto A., Valverde R., Chen T.H., Murata N. (2000): Transformation of *Arabidopsis* with the *codA* gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. *The Plant Journal* **22**, 449-453.

Salgado I., Oliveira H.C., Gaspar M. (2017): Plant nitric oxide signaling under environmental stresses. Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress **1**, 345-370.

Santisree P., Bhatnagar-Mathur P., Sharma K.K. (2015): NO to drought-multifunctional role of nitric oxide in plant drought: do we have all the answers?. *Plant Science* **239**, 44-55.

Savicka M., Škute N. (2010): Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija* **56**, 26-33.

Saville B. (1958): A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* **83**, 670-672.

Saxena I., Srikanth S., Chen Z. (2016): Cross talk between H_2O_2 and interacting signal molecules under plant stress response. *Frontiers in plant science* **7**, 570.

Scandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N. (1997): Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. *Cold Spring Harbor Monograph Series* **34**, 343-406.

SEMO home page: https://www.semo.cz/eshop/hrach-sety-drenovy-twinset-1058/ (21.4.2019).

Sengupta R., Holmgren A. (2013): Thioredoxin and thioredoxin reductase in relation to reversible S-nitrosylation. *Antioxidants & redox signaling* **18**, 259-269.

Sequera-Mutiozabal M., Antoniou C., Tiburcio A.F., Alcázar R., Fotopoulos V. (2017): Polyamines: emerging hubs promoting drought and salt stress tolerance in plants. *Current Molecular Biology Reports* **3**, 28-36.

Shao L., Majumdar R., Minocha S.C. (2012): Profiling the aminopropyltransferases in plants: their structure, expression and manipulation. *Amino acids* **42**, 813-830.

Shelp B.J., Bown A.W., McLean M.D. (1999): Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in plant science* **4**, 446-452.

Shelp B.J., Bozzo G.G., Trobacher C.P., Zarei A., Deyman K.L., Brikis C.J. (2012): Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Science* **193**, 130-135.

Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. (2002): Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of experimental botany* **53**, 1305-1319.

Schirmer E.C., Glover J.R., Singer M.A., Lindquist S. (1996): HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in biochemical sciences* **21**, 289-296.

Schuermann P., Buchanan B.B. (2008): The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxidants & redox signaling* **10,** 1235-1274.

Schulz-Raffelt M., Lodha M., Schroda M. (2007): Heat shock factor 1 is a key regulator of the stress response in Chlamydomonas. *The Plant Journal* **52**, 286-295.

Silveira V., de Vita A.M., Macedo A.F., Dias M.F.R., Floh E.I.S., Santa-Catarina C. (2013): Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **114**, 351-364.

Simontacchi M., Galatro A., Ramos-Artuso F., Santa-María G.E. (2015): Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Frontiers in plant science* **6**, 977.

Slocum R.D., Kaur-Sawhney R., Galston A.W. (1984): The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **235**, 283-303.

Smirnoff N. (2000): Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Current opinion in plant biology* **3**, 229-235.

Smirnoff N. (2005): Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants* **3**, 53-86.

Stechmann A., Cavalier-Smith T. (2004): Evolutionary origins of hsp90 chaperones and a deep paralogy in their bacterial ancestors. *Journal of eukaryotic mikrobiology* **51**, 364-373.

Suzuki N., Mittler R. (2006): Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia plantarum* **126**, 45-51.

Suzuki N., Koussevitzky S.H.A.I., Mittler R.O.N., Miller G.A.D. (2012): ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* **35**, 259-270.

Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000): Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1480**, 329-341.

Šebela M., Luhová L., Brauner F., Galuszka P., Radová A., Peč P. (2001)b: Light microscopic localisation of aminoaldehyde dehydrogenase activity in plant tissues using nitroblue tetrazolium-based staining method. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 831-839.

Šebela M., Radová A., Angelini R., Tavladoraki P., Frébort I., Peč P. (2001)a: FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Science* **160**, 197-207.

Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. (2008): Plant immunity requires conformational charges of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952-956.

Takahashi T., Kakehi J.I. (2009): Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of Botany* **105**, 1-6.

Tiburcio A.F., Altabella T., Bitrián M., Alcázar R. (2014): The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* **240**, 1-18.

Tisi A., Federico R., Moreno S., Lucretti S., Moschou P.N., Roubelakis-Angelakis K.A., Angellini R., Cona A. (2011): Perturbation of polyamine catabolism can strongly affect root development and xylem differentiation. *Plant physiology* **157**, 200-215.

Torres M.A., Dangl J.L., Jones J.D. (2002): *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 517-522.

Tuteja N., Tiburcio A.F., Gill S.S., Tuteja R. (2012): *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*. 1rd ed. John Wiley & Sons., New Hamsphire, 1460.

Tylichová M., Briozzo P., Kopečný D., Ferrero J., Moréra S., Joly N., Snégaroff J., Šebela M. (2008): Purification, crystallization and preliminary crystallographic study of a recombinant plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* **64**, 88-90.

Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010): Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. *Journal of molecular biology* **396**, 870-882.

Umbreen S., Lubega J., Cui B., Pan Q., Jiang J., Loake G.J. (2018): Specificity in nitric oxide signalling. *Journal of experimental botany* **69**, 3439-3448.

Uppu R.M. (2006): Synthesis of peroxynitrite using isoamyl nitrite and hydrogen peroxide in a homogeneous solvent system. *Analytical biochemistry* **354**, 165-168.

Urano K., Yoshiba Y., Nanjo T., Igarashi Y., Seki M., Sekiguchi F., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2003): Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant, Cell & Environment* **26,** 1917-1926.

Ushimaru T., Nakagawa T., Fujioka Y., Daicho K., Naito M., Yamauchi Y., Nonaka H., Amako K., Yamawaki K., Murata N. (2006): Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *Journal of plant physiology* **163**, 1179-1184.

Vadez V., Berger J.D., Warkentin T., Asseng S., Ratnakumar P., Rao K.P.C., Sharma H.C. (2012): Adaptation of grain legumes to climate change: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 31-44.

Van Camp W., Capiau K., Van Montagu M., Inze D., Slooten L. (1996): Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology* **112**, 1703-1714.

Vogel M.O., Moore M., König K., Pecher P., Alsharafa K., Lee J., Dietz K.J. (2014): Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **26**, 1151-1165.

Vollenweider P., Günthardt-Goerg M.S. (2005): Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environmental Pollution* **137**, 455-465.

Wahid A., Close T.J. (2007): Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum* **51**, 104-109.

Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M.R. (2007): Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and experimental botany* **61**, 199-223.

Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004): Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science* **9**, 244-252.

Wang Y., 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.

Weretilnyk E.A., Hanson A.D. (1989): Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, *in vitro* translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **271**, 56-63.

Willits D.H., Peet M.M. (1998): The effect of night temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climates. *Agricultural and Forest meteorology* **92**, 191-202.

Xing S.G., Jun Y.B., Hau Z.W., Liang L.Y. (2007): Higher accumulation of γ-aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiology and Biochemistry 45*, 560-566

Yamaguchi K., Mori H., Nishimura M. (1995): A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant and Cell Physiology* **36**, 1157-1162.

Yanagisawa H., Kato A., Hoshiai S., Kamiya A., Torii N. (1987): Polyamine oxidase from water hyacinth: purification and properties. *Plant physiology* **85**, 906-909.

Yanagisawa H., Hamasima N., Kato T. (1996): Polyamine oxidase from leaves of *Lilium longiflorum*: purification and properties. *Journal of plant physiology* **149**, 657-662.

Yang H., Mu J., Chen L., Feng J., Hu J., Li L., Zhou J.M., Zuo J. (2015): S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiology* **167**, 1604-1615.

Yoo Ch.Y., Miura K., Jin J.B., Lee J., Park H.C., Salt D.E., Yun D.J., Bressan R.A., Hasegawa P.M. (2006): SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermotolerance in *Arabidopsis* independent of salicylic acid. *Plant Physiology* **142**, 1548-1558.

Yoshida T., Ohama N., Nakajima J., Kidokoro S., Mizoi J., Nakashima K., Maruyama K., Kim J.M. Seki M., Todaka D., Osakabe Y., Sakuma Y., Schöfll F., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2011): *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics* **286**, 321-332.

Young J.C., Moarefi I., Hartl F.U. (2001): Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of cell biology* **154**, 267.

Yu M., Lamattina L., Spoel S.H., Loake G.J. (2014): Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist* **202**, 1142-1156.

Yun B.W., Feechan A., Yin M., Saidi N.B., Le Bihan T., Yu M., Moore J.W., Kang J.G., Kwon E., Spoel S.H., Pallas J.A., Loake G.J. (2011): S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264.

Zhang A., Jiang M., Zhang J., Ding H., Xu S., Hu, X., Tan M. (2007): Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytologist* **175**, 36-50.

Zheng X., Krakowiak J., Patel N., Beyzavi A., Ezike J., Khalil A.S., Pincus D. (2016): Dynamic control of Hsf1 during heat shock by a chaperone switch and phosphorylation. *Elife* **5**, e18638.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA/BIS	akrylamid- N,N'-methylenbisakrylamid
ABA	kyselina abscisová
ABAL	4-aminobutanal
ABALDH	4-aminobutyraldehyddehydrogenasa
ADC	arginindekarboxylasa
AHA	kyselý, hydrofobní, aromatický
AIH	agmatiniminohydrolasa
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ALMT	hliníkem aktivovaný malátový transportér
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa
AO	aminoxidasa
AP	alkalický fosfatasový pufr
APAL	3-aminopropionaldehyd
APBAL	1-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal
APS	persíran amonný
APT	aminopropyltransferasa
APX	askorbátperoxidasa
ASH	askorbát
ASH-GSH	askorbát-glutathionový cyklus
ATAO1	aminoxidasa u *Arabidopsis thaliana*
AtCuAO1	diaminoxidasa u *Arabidopsis thaliana*
AtRBOHD	NADPH oxidasa u *Arabidopsis thaliana*
BADH	betainaldehyddehydrogenasa
BCIP	5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát
BSA	hovězí sérový albumin
Cad	kadaverin
CaM	kalmodulin
cAPX	cytosolová forma askorbátperoxidasy

CAT	katalasa
CDPK	Ca^{2+}-dependentní proteinkinasa
CPA	N-karbamoylputrescinamidohydrolasa
CPR	Cytoplasmic Protein Response
CuAO	aminoxidasy obsahující měď
cv.	kultivar
Cys-NO	S-nitrosocystein
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2´,7´-difluorofluorescein
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2´,7´-difluorofluorescein diacetát
DAO	diaminoxidasa
DAP	1,3-diaminopropan
DCF	2,7-dichlorofluorescein
DHA	dehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
DREB2A	dehydratační responsivní element vázající protein 2a
DRIP1/2	DREB2A interakční protein
dSAM	dekarboxylovaný S-adenosylmethionin
DTT	dithiothreitol
eNOS	endoteliální NO syntasa
ETC	elektronový transportní řetězec
GABA	kyselina γ-aminomáselná
GAD	glutamátdekarboxylasa
GBALDH	guanidinobutyraldehyddehydrogenasa
gmAPX	glyoxysomální askorbátperoxidasa
GPX	guajakolperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion

GSHPX	glutathionperoxidasa
GSNHOH	N-hydroxysulfinamid
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSO_2H	kyselina sulfinová
GSSG	oxidovaný glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
H_2DCF DA	2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát
H_2DCF	2,7-dichlorodihydrofluorescein
H_2O_2	peroxid vodíku
HA	hydroxylamin
HMGSH	S-hydroxymethylglutathion
HSE	heat shock element
Hsf	heat shock faktor
Hsp	heat shock protein
iNOS	inducibilní NO syntasa
JA	kyselina jasmonová
kDA	kilodalton
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MAT	S-adenosylmethioninsynthetasa nebo methioninadenosyltransferasa
MBF1C	multiproteinový bridging faktor 1c
MDA	malondialdehyd
MDHA	monodehydroaskorbát
MDHAR	monodehydroaskorbátreduktasa
mitAPX	mitochondriální askorbátperoxidasa
NBT	nitrotetrazoliová modř
NC	nitrocelulosová membrána
NED	N-(naftylethylen)diamin
NH_2OH	hydroxylamin

NH_3	amoniak
Ni-NOR	nitrit-NO oxidoreduktasa
nNOS	neuronální NO syntasa
NO	oxid dusnatý
$NO^{\bullet}$	nenabitý radikál oxidu dusnatého
$-NO_2$	nitroso-skupina
NOA1	NO-ASSOCIATED 1 protein
NOO^-	dusitanový anion
NOS	NO syntasa
Nox	vyšší oxidy dusíku
NR	nitrátreduktasa
nsHbs	nesymbiotické hemoglobiny
$^1O_2$	singletový kyslík
$O_2^{-}\bullet$	superoxidový radikál
ODC	ornithindekarboxylasa
OH•	hydroxylový radikál
$ONOO^-$	peroxydusitan
OXO	oxalátoxidasa
PA	polyaminy
PAO	polyaminoxidasa
PGA	3-fosfoglycerát
PP2C	proteinfosfatasa 2 Cs
Prx	peroxiredoxin
PsAMADH1	isoforma aminoaldehyddehydrogenasy *Pisum sativum*
PsAMADH2	isoforma aminoaldehyddehydrogenasy *Pisum sativum*
PSbMV	Pea Seed-borne Mosaic Virus
PSI/II	fotosystem I/II
PTM	posttranslační modifikace

Put	putrescin
PVDF	polyvinylidenfluoridová membrána
PVPP	poly(vinylpolypyrrolidon)
RBOH	Respiratory Burst Oxidase Homologues
RNS	reaktivní formy dusíku
ROO•	peroxylový radikál
ROS	reaktivní formy kyslíku
RSNO	S-nitrosothioly
RUBISCO	ribulosa-bisofosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SA	kyselina salycilová
SAM	S-adenosylmethionin
SAMDC	S-adenosylmethionindekarboxylasa
sAPX	askorbátperoxidasa ve stroma chloroplastů
SDS	dodecylsíran sodný
sHsp	nízkomolekulární heat shock proteiny
SOD	superoxiddismutasa
Spd	spermidin
SPDS	spermidinsyntasa
Spm	spermin
SPMS	sperminsyntasa
tAPX	thylakoidní askorbátperoxidasa
TBS	fyziologický roztok pufrovaný Tris
TBST	Tween-20 v TBS
TEMED	N,N,N′,N′-tetramethylethylendiamin
TMABALDH	4-trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasa
Trx	thioredoxin
TrxR	thioredoxinreduktasa
TS	teplotní stres

tSpm	thermospermin
TSPMS	thermosperminsyntasa
UPR	Unfolded Protein Response
UPS	ubikvitin-26 S proteasomový systém
v/v	objem na objem
w/v	hmotnost na objem
XOR	xanthinoxidoreduktasa