

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Úloha *S*-nitrosoglutathionreduktasy v obranné reakci rostlin vyvolané působením elicitinů

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	<b>Bc. Martina Železná</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Doc. RNDr. Lenka Luhová, PhD.</b>
Konzultant:	Mgr. Pavla Satková (Moricová)
Rok:	2014

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 31. 7. 2014

Bc. Martina Železná

Ráda bych poděkovala své školitelce paní doc. RNDr. Lence Luhové za milé a odborné vedení, poskytnutí literárních podkladů a konzultací, cenné rady, trpělivost a čas věnovaný při zpracování teoretické i experimentální části diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Mgr. Pavle Satkové (Moricové), Mgr. Lucii Kubienové, Ph.D. a Mgr. Tereze Tiché za všestrannou pomoc a ochotu při zpracování experimentální části a celému kolektivu Katedry biochemie PŘF UP za vytvoření příjemného pracovního prostředí a podporu v průběhu mého studia a také kolektivu Katedry botaniky PŘF UP za poskytnutí rostlinného materiálu.

Neposlední řadě bych chtěla velmi poděkovat své rodině za podporu a trpělivost během celého studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Martina Železná
Název práce	Úloha <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasy v obranné reakci rostlin vyvolané působením elicitinů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Pavla Satková (Moricová)
Rok obhajoby práce	2014

### Abstrakt

Enzym *S*-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) řadící se mezi zinek-dependentní alkohodehydrogenasy třídy III (EC 1.1.1.1), katalyzuje NADH-dependentní redukci *S*-nitrosoglutathionu (GSNO), který je zásobní a transportní formou oxidu dusnatého. Jelikož je GSNOR zodpovědná za kontrolu intracelulárního množství GSNO *in vivo* jeví se jako klíčový regulátor rezistence po napadení patogenem. V rámci experimentální části prezentované práce byl studován vliv aplikace vybraných patogenních proteinů (elicitiny - oligandrin, kryptogein X24 a jeho mutantní formy L41F a V84F) na indukci hypersenzitivní reakce související s nekrosou listů a změny specifické aktivity GSNOR. Látky byly aplikovány vždy do pravé poloviny pátého listu *Nicotiana tabacum* cv. Samsung, změny parametrů byly poté sledovány v obou polovinách listu. Významné změny specifické aktivity spolu s výraznou nekrotickou aktivitou byly zaznamenány po aplikaci kryptogeinu X24 a jeho mutantní formy V84F. Tento trend byl pozorován i v rámci pilotních experimentů detekce změn hladiny GSNOR po aplikaci elicitinů metodou Western blot. Byly stanoveny kinetické vlastnosti GSNOR z *N. tabacum* cv. Samsung. Dále byl sledován vliv aplikace modulátorů hladiny reaktivních forem dusíku (RNS) (cPTIO, GSNO a inhibitor GSNOR N6022) současně s kryptogeinem X24, ale i bez přítomnosti elicitinu. Studována byla nekrotická odezva v pletivech listů, změny specifické aktivity GSNOR a byly provedeny pilotní experimenty detekce změn hladiny GSNOR metodou Western blot a histochemické detekce aktivity GSNOR. Výraznější zvýšení specifické aktivity GSNOR bylo zaznamenáno po aplikaci látek samotných než po jejich současné aplikaci s kryptogeinem X24. Nejintenzivnější nekrotická aktivita byla pozorována po aplikaci lapače NO cPTIO v kombinaci s kryptogeinem X24. Získané výsledky potvrzují úlohu RNS a zapojení GSNOR v reakci rostlin na biotický stres.

Klíčová slova	elicitiny, modulátory hladiny reaktivních forem dusíku, obranná reakce, <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasa
Počet stran	84
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Martina Železná
Title	The role of <i>S</i> -nitrosogluthathione reductase in plant defence responses induced by elicitors
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Consultant	Mgr. Pavla (Sátková) Moricová
The year of presentation	2014

### Abstract

The enzyme *S*-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) belongs among the zinc-dependent alcohol dehydrogenase class III (EC 1.1.1.1). GSNOR catalyzes the NADH-dependent reduction of *S*-nitrosogluthathione (GSNO), which is a storage and transport form of nitric oxide. GSNOR is responsible for the regulation of intracellular GSNO *in vivo* and it appears to be a key regulator of plant resistance to pathogen attack. Within the experimental part of present study the influence of selected pathogenic proteins (elicitors - oligandrin, cryptogein X24 and its mutants L41F and V84F) application on hypersensitive reaction induction associated with leaves necrosis and specific activity GSNOR changes was pursued. Substances were applied always in the right half of *Nicotiana tabacum* cv. Samsung fifth leaf, and parameter changes were then monitored in both halves of leaves. Significant changes of specific activity along with a distinct necrotic activity were recorded after the application of cryptogein X24 and its mutant form V84F. This trend was also observed in pilot experiments of detection GSNOR level changes after elicitors application by Western blot method. Kinetics properties of GSNOR from *N. tabacum* cv. Samsung were determined. Furthermore, the effect of application of modulators of the level of reactive nitrogen species (RNS) (cPTIO, GSNO and GSNOR inhibitor N6022) alone or simultaneously with elicitor cryptogein X24 was studied. Necrotic responses in tissues of leaves and changes of GSNOR specific activities were studied. Pilot experiments of the detection of GSNOR level changes by Western blot method and histochemical GSNOR activity were performed. Considerable increase of GSNOR specific activity was noted after the application of RNS alone or simultaneously with cryptogein X24. The highest necrotic activity was observed after combined application of cryptogein X24 with cPTIO. Obtained results confirm the role of RNS and the involvement of GSNOR in plant responses to biotic stress.

Keywords	elicitors, reactive nitrogen species modulators, defence reaction, <i>S</i> -nitrosogluthathione reductase
Number of pages	84
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>CÍLE PRÁCE</b>	<b>1</b>
<b>1 ÚVOD</b>	<b>2</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	<b>3</b>
2.1 Oxid dusnatý a formy RNS	3
2.1.1 Biosyntetické dráhy a konverze NO	4
2.1.2 Nitrace tyrosinových residuí	6
2.1.3 <i>S</i> -nitrosylace cysteinových residuí	6
2.2 Základní charakteristika <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasy	7
2.2.1 Struktura a substrátová specifita <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasy	8
2.2.2 Funkce <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasy	12
2.2.3 Lokalizace GSNOR a úloha GSNOR v reakci na rostlinný stres	13
2.3 Elicitiny	15
2.3.1 Kryptogein	16
2.3.1.1 Mechanismus působení kryptogeinu	17
2.3.1.2 Mutantní formy kryptogeinu	19
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>24</b>
3.1 Materiál a přístroje	24
3.1.1 Chemikálie	24
3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení	25
3.1.3 Rostlinný materiál	25
3.1.3.1 Příprava rostlinného materiálu – aplikace elicitinů	26
3.1.3.2 Příprava rostlinného materiálu – aplikace modulátorů	26
3.1.4 Příprava <i>S</i> -nitrosoglutathionu	27
3.1.5 Příprava čerstvého formaldehydu z paraformaldehydu	27
3.2 Metody	27
3.2.1 Stanovení aktivity <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasy	27
3.2.1.1 Příprava extraktu	28
3.2.1.2 Přečištění extraktu	28
3.2.1.3 Měření aktivity <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasy	28
3.2.2 Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové	29
3.2.3 Stanovení kinetických parametru $K_m$ a $V_{lim}$	29
3.2.4 Stanovení $IC_{50}$	30
3.2.5 SDS-PAGE	30
3.2.5.1 Roztoky a pufry pro SDS-PAGE	31
3.2.5.2 Příprava extraktů pro SDS-PAGE	32
3.2.5.3 Příprava extraktů acetonovou extrakcí	32
3.2.5.4 Příprava vzorků pro SDS-PAGE	32
3.2.6 Western blot, imunochemická detekce	33
3.2.6.1 Roztoky a pufry pro Western blot a imunodetekci	34
3.2.7 Histochemická detekce aktivity GSNOR	34
3.2.7.1 Příprava rostlinného materiálu – listové disky	34
3.2.7.2 Metodika histochemické detekce	35

<b>4 VÝSLEDKY</b>	<b>36</b>
4.1 Vliv aplikace elicitinů do listů <i>N. tabacum</i> cv. Samsung	36
4.1.1 Vliv aplikace elicitinů na pletiva listů <i>N. tabacum</i> cv. Samsung	36
4.1.2 Vliv aplikace elicitinů na aktivitu <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasy	37
4.1.3 Western blot detekce změn hladiny <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasy po aplikaci elicitinů	40
4.1.4 Western blot detekce změn intenzity nitrace proteinů po aplikaci elicitinů	41
4.2 Stanovení kinetických parametrů $K_m$ a $V_{lim}$	43
4.3 Stanovení hodnoty $IC_{50}$	44
4.4 Vliv aplikace modulátorů do listů <i>N. tabacum</i> cv. Samsung	45
4.4.1 Vliv aplikace modulátorů na pletiva listů <i>N. tabacum</i> cv. Samsung	45
4.4.2 Vliv aplikace modulátorů na aktivitu <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasy	47
4.4.3 Western blot detekce změn hladiny <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasy po aplikaci modulátorů	52
4.4.4 Histochemická detekce aktivity <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasy po aplikaci modulátorů	53
<b>5 DISKUSE</b>	<b>56</b>
5.1 Vliv aplikace elicitinů – hypersensitivní reakce	56
5.2 Vliv aplikace elicitinů na <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasu	57
5.3 Nitrace proteinů	59
5.4 Kinetické parametry <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasy	60
5.5 Hodnota $IC_{50}$ inhibitoru GSNOR N6022	61
5.6 Vliv aplikace modulátorů na <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasu	63
<b>6 ZÁVĚR</b>	<b>68</b>
<b>7 LITERATURA</b>	<b>69</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b>	<b>76</b>

# CÍLE PRÁCE

## I. Teoretická část

Vypracování literární rešerše na téma:

1. Úloha reaktivních forem dusíku v obranném mechanismu rostlin se zaměřením na *S*-nitrosoglutathionreduktasu
2. Mechanismus působení elicitinů

## II. Experimentální část

1. Studium vlivu aplikace vybraných elicitinů do listů tabáku (*Nicotiana tabacum* cv. Samsung) na:
  - a) aktivitu enzymu *S*-nitrosoglutathionreduktasy, podílejícím se na metabolismu reaktivních forem dusíku
  - b) intenzitu nitrace proteinů
2. Studium vlivu látek modulujících hladinu reaktivních forem dusíku (RNS) na:
  - a) účinek elicitinů v listech modelové rostliny tabáku (*N. tabacum* cv. Samsung)
  - b) aktivitu enzymu *S*-nitrosoglutathionreduktasy



# 1 ÚVOD

Oxid dusnatý (NO) a od něj odvozené intermediáty byly původně považovány pouze za toxické molekuly a to do průlomového objevu úlohy NO jako endoteliálního relaxačního faktoru (Ignarro *et al.*, 1990). V živočišných systémech NO působí jako neurotransmiter a podílí se na regulaci imunologických reakcí, svalové relaxace, spotřeby kyslíku a produkce respirační energie (Gupta *et al.*, 2011).

U rostlin se NO podílí na řadě buněčných aktivit spojených s růstem, vývojem a environmentálními interakcemi. Významný a dobře prostudovaný je vliv NO na klíčení, růst laterálních kořenů, kvetení i uzavírání průduchů. Dále je známá jeho role v rostlinné hypersensitivní reakci vedoucí k buněčné smrti a v mechanismu rezistence vůči biotickému i abiotickému stresu (Leitner *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2011). Reguluje také aktivitu metakaspas, evolučně konzervovaných proteas, které mohou být těsně spojeny s patogenem vyvolanou buněčnou smrtí (Hong *et al.*, 2008). Zvýšená hladina NO může mít vliv na signalizaci a to buď post-translační modifikací proteinů *S*-nitrosylací cysteinových residuí proteinů, případně tyrosinovou nitrací nebo cestou přes sekundární posly např. aktivací guanylátcyklasy vedoucí k produkci druhého posla cyklického GMP (Leitner *et al.*, 2009).

Oxid dusnatý má velmi krátký poločas života (3-5 s), proto dobře a rychle reaguje za tvorby stabilnějších molekulárních sloučenin. Příkladem může být bioaktivní, stabilní a mobilní adukt oxidu dusnatého nízkomolekulární *S*-nitrosothiol *S*-nitrosoglutathion (GSNO), který může fungovat např. jako antioxidant. Tím, že enzym *S*-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) redukuje *S*-nitrosoglutathion je zároveň zodpovědná za kontrolu intracelulárního množství GSNO *in vivo* a jeví se proto jako klíčový regulátor rezistence po napadení patogenem (Gupta *et al.*, 2011; Kubienová *et al.*, 2013)

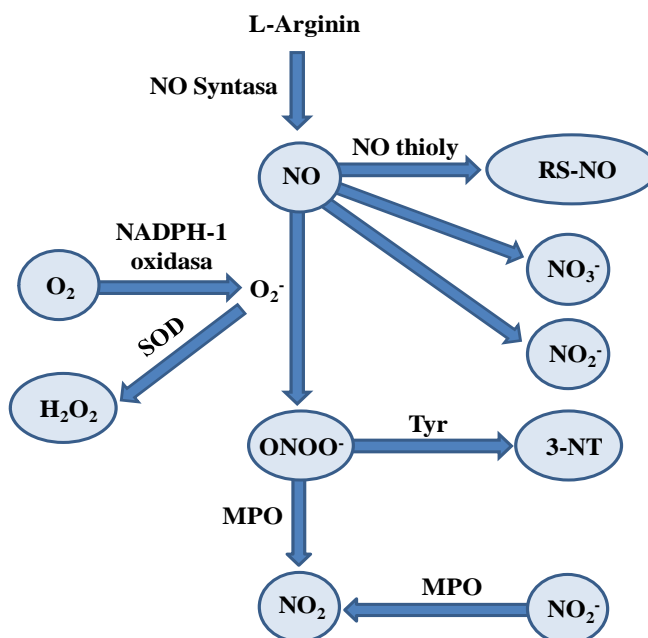
Úloha *S*-nitrosoglutathionreduktasy v rámci různých biologických pochodů rostlin včetně rostlinných obranných reakcí však stále není zcela objasněna a zůstává předmětem studia mnoha vědeckých skupin. Proto je tato práce cílena na prověření vlivu napadení patogenem simulovaném aplikací elicitinů a modulace hladiny reaktivních forem dusíku na hladinu a aktivitu GSNOR modelové rostliny.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Oxid dusnatý a formy RNS

Oxid dusnatý je lipofilní diatomický plyn s relativně malým Stokesovým poloměrem, což mu v kombinaci s jeho neutrálním nábojem umožňuje rychlou difuzi membránami. Tyto klíčové vlastnosti z něj souhrnně tvoří molekulu ideálně vhodnou pro buněčnou signalizaci (Goretski a Hollocher, 1988).

Přítomnost nepárového elektronu u radikálu NO ( $\text{NO}^\bullet$ ) podporuje jeho vysokou reaktivitu s kyslíkem ( $\text{O}_2$ ), superoxidem ( $\text{O}_2^-$ ), přechodnými kovy a thioley, které z velké části formují jeho funkce v buňce. Odstraněním nepárového elektronu se tvoří nitrosoniový kation ( $\text{NO}^+$ ), zatímco přidáním elektronu se formuje nitroxylový anion ( $\text{NO}^-$ ). NO reaguje s  $\text{O}_2$  za produkce řady různých oxidů dusíku, se superoxidem NO rychle reaguje za vzniku peroxodusitanu ( $\text{ONOO}^-$ ), jedná se o spontánní neenzymovou reakci. Peroxodusitan může být přeměňován v reakci katalyzované peroxiredoxiny (thiol-specifický antioxidační protein, nazývaný také thioredoxinperoxidasa) na dusitan (Leitner *et al.*, 2009). S thioley reaguje za tvorby *S*-nitrosothiolů. NO může také vázat různé hemoproteiny tvořící nitrosyl-Fe komplexy, např. u zvířat hemguanylátacyklasy, které tvoří cyklický GMP, jsou klíčovým cílem NO (Obr. 1) (Lucas *et al.*, 2000).

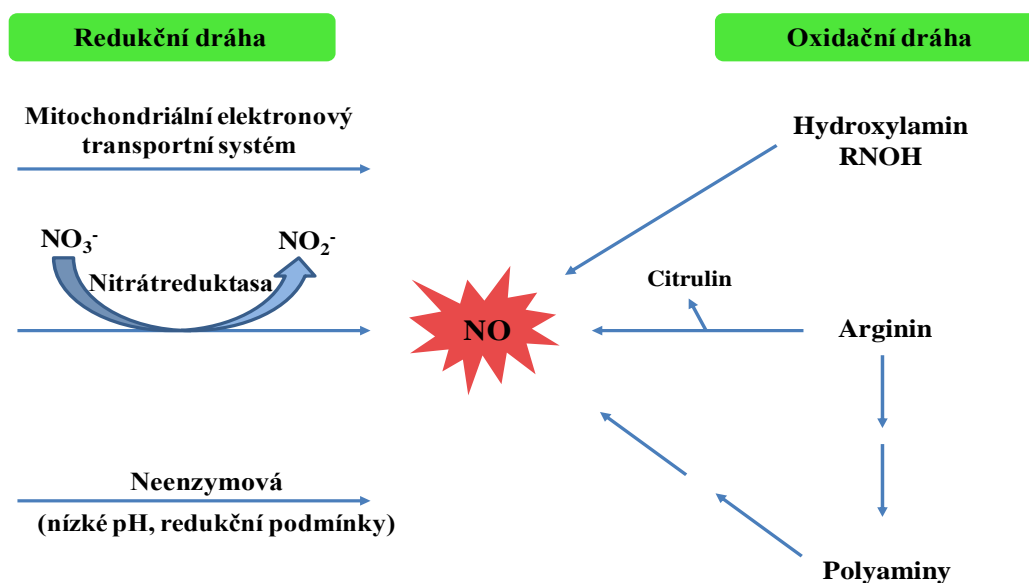


Obr. 1 Metabolismus oxidu dusnatého v živočišných buňkách. NO může reagovat se superoxidovými anionty za tvorby vysoce reaktivních peroxodusitanových iontů. Tyto ionty mohou způsobit tyrosinovou nitraci (Tyr) vedoucí k tvorbě 3-nitrotyrosinu (3-NT). NO může také interagovat s thioley jako je glutathion a tvořit *S*-nitrosothioly (RS-NO) nebo může být metabolizován na dusitan ( $\text{NO}_2^-$ ) nebo dusičnan ( $\text{NO}_3^-$ ). SOD v obrázku značí superoxididismutasu a MPO myeloperoxidasu (upraveno dle Serrano *et al.*, 2004).

### 2.1.1 Biosyntetické dráhy a konverze NO

Velmi dobře je prozkoumána dráha biosyntézy NO u živočichů. NO je produkován během konverze L-argininu na citrulin enzymovou rodinou synthas oxidu dusnatého (NOS) (Palmer *et al.*, 1993). Živočišné NO synthasy vyžadují řadu klíčových kofaktorů jako je hemová skupina, FAD, FMN a tetrahydrobiopterin (Obr. 1).

NO syntetické dráhy rostlin mohou být klasifikovány jako oxidační nebo redukční (Obr. 2). Mezi redukční se řadí např. biosyntéza NO přes nitrátreduktasu (EC 1.7.1.1, NR). Produkce NO z L-argininu nebo polyaminů patří mezi oxidační dráhy biosyntézy. Nedávno byla popsána také biosyntéza NO využívající jako substrát hydroxylamin (Rümer *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2011).



Obr. 2 Produkce NO v rostlinách. Jsou evidovány dvě dráhy redukční a oxidační. Elektron potřebný k redukcí dusičnanu na dusitan může poskytovat mitochondriální elektronový transport. Ke vzniku NO dochází v prostředí s nízkým pH nebo v reakci katalyzované nitrátreduktasou. Výchozími sloučeninami při vzniku NO v oxidační dráze jsou arginin, polyaminy a hydroxylamin (upraveno dle Moreau *et al.*, 2010).

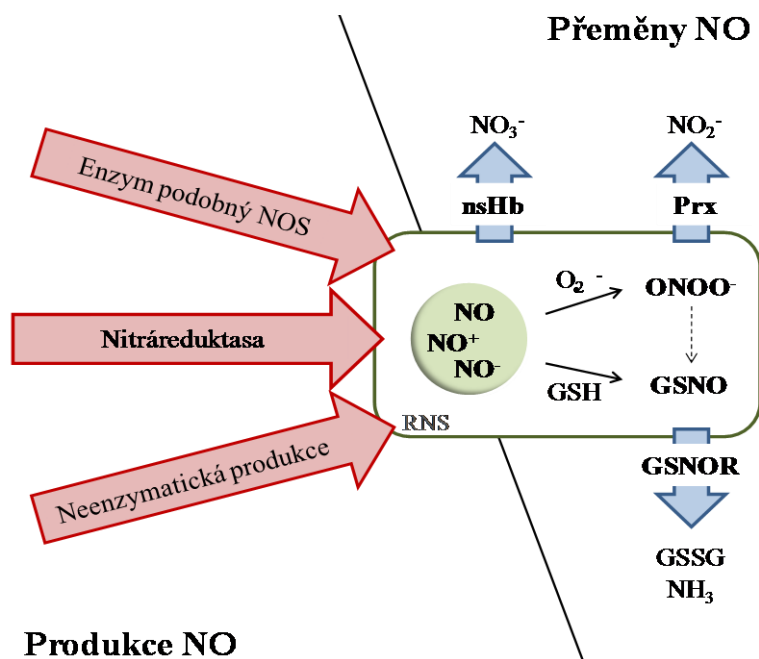
Primárním substrátem redukčních drah vedoucích k produkci NO a  $\text{N}_2\text{O}$  je dusitan. Dusitany jsou produkovány z dusičnanů za katalýzy enzymu nitrátreduktasy (Harper, 1981; Gupta *et al.*, 2011). Nejlépe charakterizovanou dráhou syntézy NO v rostlinách je právě NR dráha, která je lokalizována v cytosolu a primárně katalyzuje redukcí dusičnanů na dusitany pomocí NADH jako hlavního donorů elektronů. Produkce NO nitrátreduktasou může být ovlivňována různými parametry, např. relativně nízkou koncentrací dusitanů a vysokou koncentrací dusičnanů (Rockel *et al.*, 2002); změnou pH v buňce, kdy jeho snížením se aktivuje NR (Kaiser *et al.*, 1995). Nitrátreduktasou

zprostředkovaná produkce NO je indukována za fyziologických podmínek během vývojových procesů, jako je kvetení nebo auxiny indukovaný růst postranních kořenů, dále při působení různých biotických a abiotických stresových faktorů, např. vlivem elicitorů produkovaných po napadení rostlin houbovými patogeny (Gupta *et al.*, 2011).

V řadě publikací je uváděn jako možný zdroj oxidu dusnatého enzym, podílející se na produkci NO z argininu, označovaný jako NOS-like enzym. Dosud nebyly nalezeny rostlinné geny homologní k savčí NOS. Většina studií naznačujících existenci arginin-depedentní produkce NO v rostlinách je založena na inhibici tvorby NO s využitím argininových analog s modifikovaným guanidinem (Delledone *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998). Nicméně experimenty na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* ukazují, že tato aktivita může být nesprávně interpretována, pokud není přímo ověřena tvorba citrulinu (Tischner *et al.*, 2007).

Neenzymová redukce dusičnanu byla prokázána např. v apoplastu semen a v kořenech (Obr. 3) (Bethke *et al.*, 2004).

V rostlinách byly indentifikovány tři základní dráhy konverze NO (Obr. 3). NO může být pohlcováno nesymbiotickými hemoglobiny ( nsHb), další možností je reakce oxidu dusnatého se superoxidem za tvorby peroxodusitanu, který je posléze detoxifikován peroxiredoxiny (Prx). Třetí variantou je transformace NO na GSNO s následnou degradací enzymem GSNOR (Leitner *et al.*, 2009).



Obr. 3 Stěžejní dráhy biosyntézy a přeměny NO v rostlinách (upraveno dle Leitner *et al.*, 2009).

### 2.1.2 Nitrace tyrosinových residuí

Oxid dusnatý a superoxid reagují rychle za vzniku oxidačního a nitračního činidla peroxodusitanu. Spolu s hemperoxidasou zprostředkovávají oxidaci a nitraci tyrosinu (van der Vliet *et al.*, 1997). Nitrací tyrosinu se snižuje pKa tyrosinu téměř o 3 jednotky jednotky a zvyšuje se hydrofobicita tyrosinu, což může vést ke ztrátě funkce proteinu, jak bylo prokázáno v případě *S*-nitrosoglutathionreduktasy nebo naopak může nitrace tyrosinového residua protein aktivovat (cytochrom *c*). Posun pKa má rovněž za následek modulaci signálu jako je pokles fosforylace tyrosinu (Moreau *et al.*, 2010).

Rostoucí množství důkazu poukazuje, že k nitraci tyrosinu dochází u rostlin v reakci na působení biotických a abiotických stresových faktorů, kdy dochází k současnému uvolnění NO a reaktivních forem kyslíku (ROS) (Moreau *et al.*, 2010). Nitrace tyrosinu může být molekulárním markerem nitrosativního stresu v rostlinách, podobně jako je tomu u živočichů.

### 2.1.3 *S*-nitrosylace cysteinových residuí

V poslední době se řada výzkumných laboratoří zaměřila na studium regulace proteinů *S*-nitrosylací, ke které dochází v reakci proteinu s NO nebo přenosem NO z nitrosothiolu na sulfhydrylovou skupinu cysteinového residua, tzv. transnitrosylace (Moreau *et al.*, 2010).

U živočichů a bakterií bylo prokázáno, že *S*-nitrosylace zprostředkovaná NO reguluje enzymové aktivity, iontové kanály a aktivitu transkripčních faktorů. Kromě toho *S*-nitrosylace může modifikovat buněčnou signalizaci tím, že ovlivňuje potenciál protein-protein interakcí (Hess *et al.*, 2005).

U *A. thaliana* bylo identifikováno více než sto proteinů, které jsou cílem *S*-nitrosylace z toho šestnáct souvisí s hypersenzitivní reakcí na patogen (Romero-Puertas *et al.*, 2008).

Příkladem regulace enzymové aktivity *S*-nitrosylací v rostlinách je případ peroxiredoxinu II E, který je schopen degradovat peroxodusitan, což je hlavní toxická složka RNS v buňkách, zodpovědná za oxidaci lipidu a nitraci tyrosinu. *S*-nitrosylace peroxiredoxinu II E inhibuje peroxodusitanovou detoxifikační aktivitu, což má za následek zvýšení produkce nitrotyrosinových residuí. *S*-nitrosylací klíčových komponent antioxidantního obranného systému, které fungují jako běžné spouštěče pro ROS a NO zprostředkované signalizační reakce, reguluje NO efekt svých reaktivních forem (Moreau *et al.*, 2010).

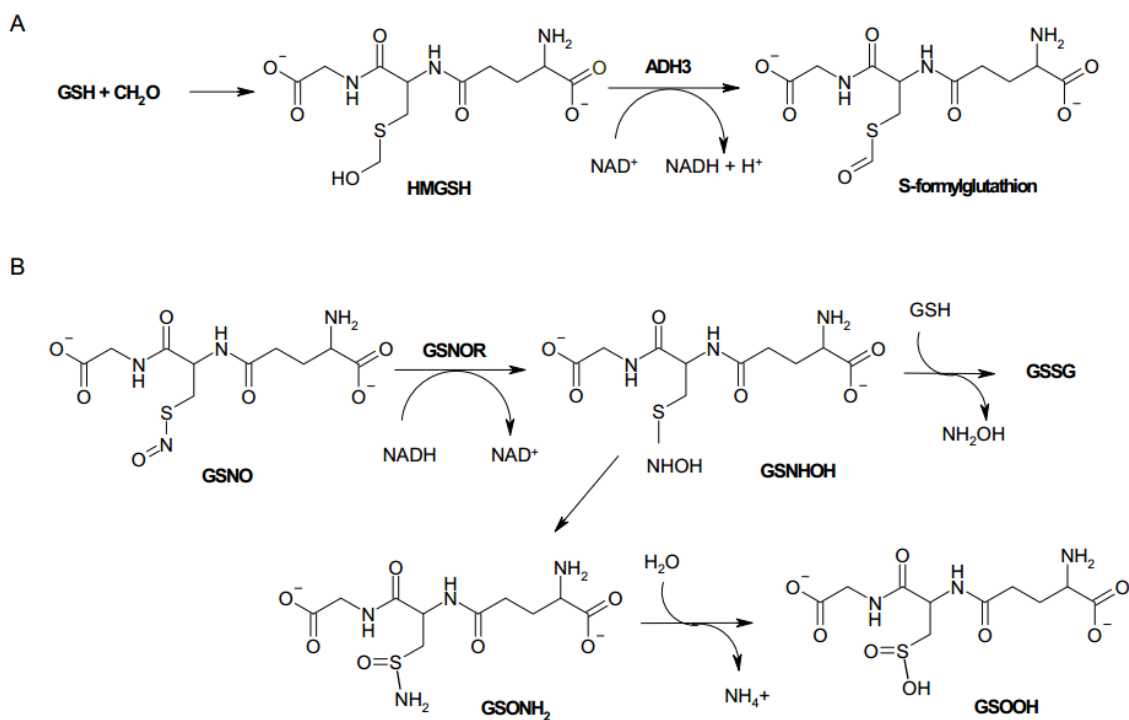
K nejnámějším nízkomolekulárním *S*-nitrosothiolům se řadí *S*-nitrosoglutathion, který vzniká za anaerobních podmínek především reakcí tripeptidu glutathionu ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly, GSH) s RNS. Klíčová funkce GSNO spočívá v udržování fyziologické hladiny celkových nízko- a vysokomolekulárních *S*-nitrosothiolů (Kubienová *et al.*, 2013).

## 2.2 Základní charakteristika *S*-nitrosoglutathionreduktasy

*S*-nitrosoglutathionreduktasa byla vzhledem ke své schopnosti katalyzovat  $\text{NAD}^+$  a glutathion-dependentní oxidaci formaldehydu původně označována jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (FADH, EC 1.2.1.1). Později však bylo prokázáno,

že reakční mechanismus nezahrnuje přímo formaldehyd, ale jeho thioacetalový adukt *S*-(hydroxymethyl)glutathion (HMGS) vznikající spontánní reakcí formaldehydu a GSH. Z tohoto důvodu byl enzym od roku 2005 překlasifikován na *S*-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasu (EC 1.1.1.284). Enzym tedy katalyzuje oxidaci hydroxylové skupiny HMGS na *S*-formylglutathion v přítomnosti katalytického zinku a  $\text{NAD}^+$  jako koenzymu.

Dnes se za fyziologicky významnější považuje *S*-nitrosoglutathionreduktasová aktivita, kdy enzym katalyzuje  $\text{NADH}$ -dependentní redukci *S*-nitrosoglutathionu na různé produkty v závislosti na buněčných podmínkách, včetně oxidovaného glutathionu, glutathiondisulfidu, glutathionsulfonamidu, hydroxyl aminu a amoniaku (Obr. 4). Proto je v současné vědecké literatuře nejčastěji používaným názvem enzymu *S*-nitrosoglutathionreduktasa, tento název však zatím nebyl schválen Mezinárodní komisí pro biochemii a molekulární biologii NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Systematický název enzymu je *S*-(hydroxymethyl)glutathion: $\text{NAD}^+$ oxidoreduktasa (Jensen *et al.*, 1998; Leterrier *et al.*, 2011).



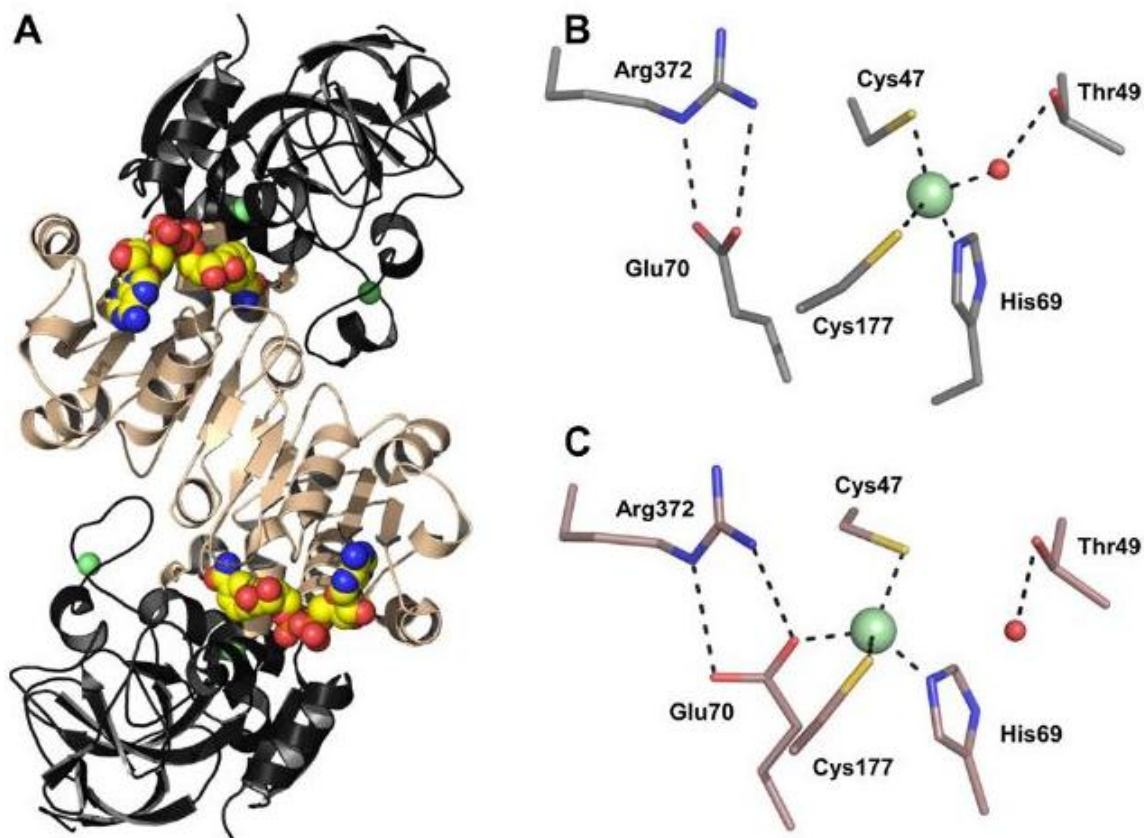
Obr. 4 Reakce katalyzované *S*-nitrosoglutathionreduktasou. (A) Dehydrogenasová reakce, oxidace *S*-(hydroxymethyl)glutathionu na *S*-formylglutathion pomocí koenzymu  $\text{NAD}^+$ . (B) Reduktasová reakce, redukce *S*-nitrosoglutathionu na nestabilní *N*-hydroxylsulfonamidový intermediát (GSNHOH), který je citlivý na nukleofilní atak glutathionu vedoucí k hydroxylaminu ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) a glutathiondisulfidu (GSSG). GSNHOH může spontánně přeměnit na glutathionsulfonamid (GSONH<sub>2</sub>). Za acidických podmínek je glutathionsulfonamid hydrolyzován na glutathionsulfonovou kyselinu (GSOOH) a amoniak. Koncový produkt je závislý na koncentraci GSH (převzato z Kubienová *et al.*, 2013).

### 2.2.1 Struktura a substrátová specifita *S*-nitrosoglutathionreduktasy

GSNOR je cytosolární enzym homodimerní struktury obsahující dvě 40 kDa podjednotky, který se řadí do skupiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3, EC 1.1.1.1).

Monomerní jednotka GSNOR obsahuje velkou katalytickou doménu se dvěma atomy zinku a koenzym-vázající doménu (Obr. 5). Na katalýze se podílí pouze jeden atom zinku, druhý má strukturální funkci. Katalytický ion zinku je vázán Cys177 a Cys47, His69 a buď Glu70 nebo vodou (hydroxidový anion) (Sanghani *et al.*, 2002a). Tento zinkový ion funguje jako Lewisova kyselina a aktivuje alkoholy a jiné substráty během katalýzy tak, že koordinuje s hydroxylovými a karbonylovými skupinami substrátů a vlastní aktivace proběhne hydridovým transferem. Druhý zinek má pouze strukturální funkci a je vázán čtyřmi cysteiny Cys99, Cys102, Cys105 a Cys113. Ve třídě ADH I jsou katalytický zinek i strukturální zinek zpravidla vázány podobným způsobem jako

ADH III. Hlavním rozdílem je, že Glu70 nevykazuje žádnou interakci s katalytickým atomem zinku ADH1 (Kubienová *et al.*, 2013).



Obr. 5 Krystalová struktura rostlinné GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur (SIGSNOR). (A) Struktura SIGSNOR v přítomnosti NAD<sup>+</sup>. Katalytická doména je značena černě, doména vázající koenzym světle hnědě. Koenzym NAD<sup>+</sup> (žlutá - atomy uhlíku, červená - atomy kyslíku, modrá - atomy dusíku) a atomy zinku (zeleně) jsou znázorněny kuličkami. (B) Koordinace atomu zinku ve struktuře apoenzymu. (C) Binární komplex zinku s koenzymem NAD<sup>+</sup>. Molekula vody v aktivním místě je znázorněna červenými kuličkami (převzato z Kubienová *et al.*, 2013).

SIGSNOR je homodimer (81,085 kDa), jehož vstupy do obou aktivních míst se nachází na jedné straně dimeru, zatímco obě místa vázající koenzym leží na protější straně dimeru. Katalytická doména obsahuje residua 1-177 a 327-379 (SIGSNOR číslování včetně methioninu). Menší NAD<sup>+</sup> vázající Rossmannův ohyb obsahuje residua 178-326 a tvoří významnou část rozhraní podjednotky. Obě koenzym vázající domény jsou orientovány takovým způsobem, že šest  $\beta$ -listů každé domény tvoří dvanáct prvků pseudokontinuálního  $\beta$ -listu (Kubienová *et al.*, 2013).

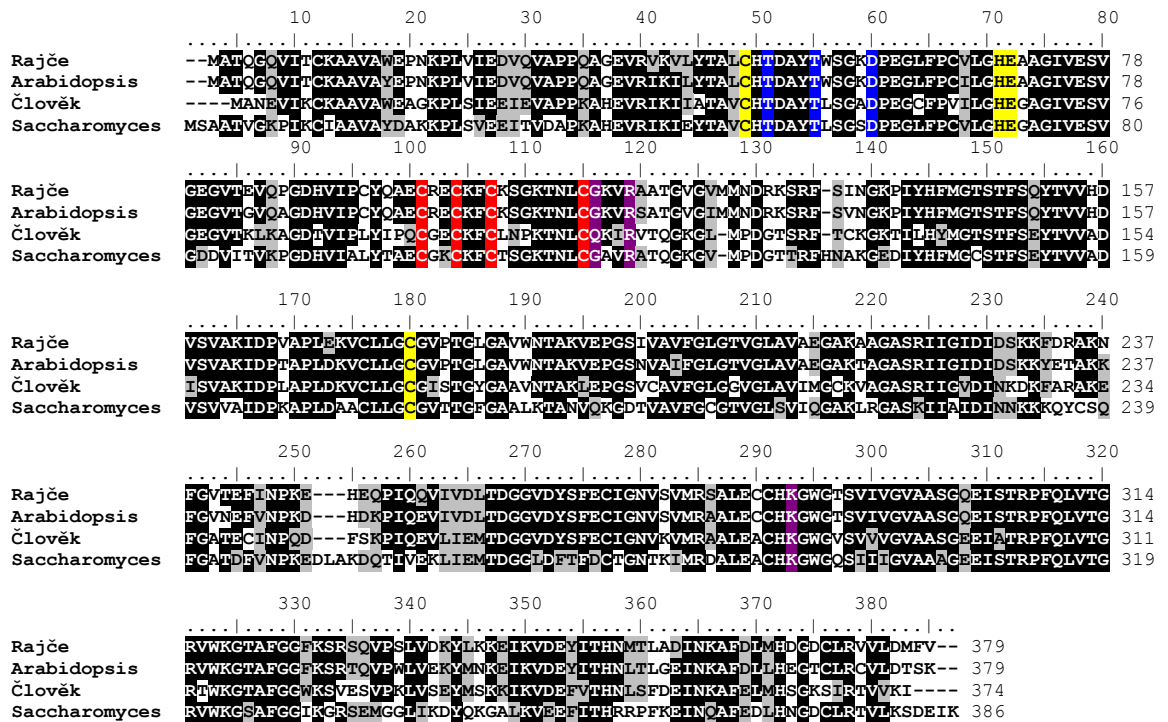
V porovnání s dobře charakterizovanou lidskou GSNOR (hGSNOR), rostlinná GSNOR vykazuje rozdílné složení anion-vazebné kapsy, která negativně ovlivňuje afinitu karboxylové skupiny  $\omega$ -hydroxymastné kyseliny. Aktivní místo je vysoce



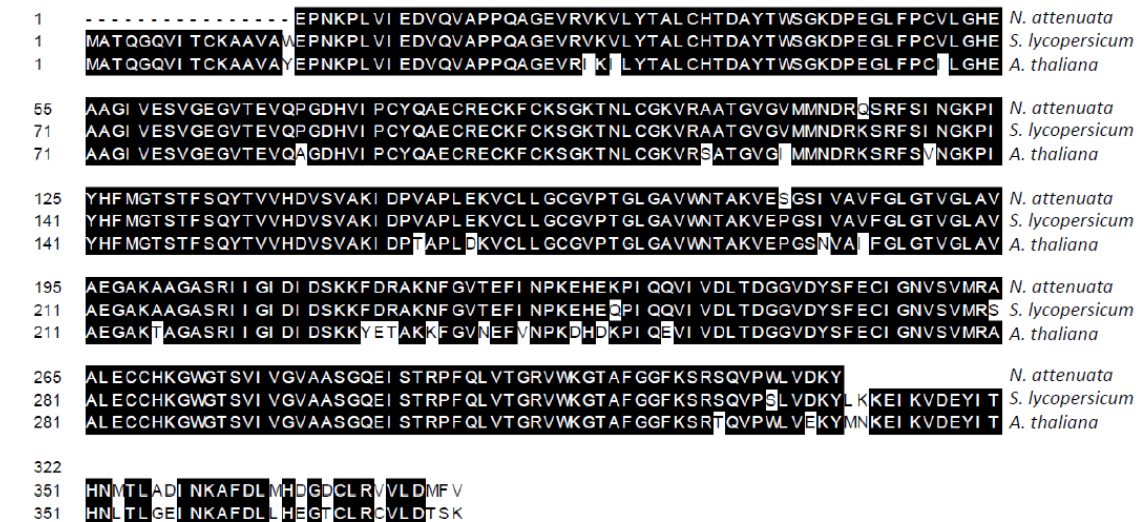
evolučně zachované u SIGSNOR i hGSNOR a leží ve velké štěrbině mezi katalytickou a koenzym vázající doménou. Rajčatová a jiné rostlinné GSNOR jsou o pět aminokyselin delší než hGSNOR a obsahují navíc dvě N-terminální a dvě C-terminální rezidua (Kubienová *et al.*, 2013).

V souvislosti se substrátovou specifitou residua 53-59 a 113-120 hGSNOR jsou umístěna mimo katalytickou štěrbinu, čímž se zvětšuje aktivní místo a tvoří se širší vstup do substrát-vázající kapsy (Yang *et al.*, 1997) z tohoto důvodu se do aktivního místa hůře váží alifatické alkoholy s krátkým řetězcem jako je ethanol nebo propanol, ale mohou se zde vázat větší substráty, jako jsou adukty GSH (HMGSH, GSNO), alkoholy se středně dlouhým řetězcem (cinnamylalkohol, geraniol, farnesol), aldehydy a  $\omega$ -hydroxy-mastné kyseliny. Tyto vazebné vlastnosti hGSNOR jsou společné rostlinným GSNOR. Arg114 poskytuje pozitivní náboj v substrát-vázající kapse a usnadňuje vázání a správnou orientaci negativně nabitých substrátů, aktivátorů a inhibitorů. Arg114 a aktivní místo zinku a v menší míře i residua Thr46, Asp55, Glu57 jsou zodpovědné za účinnou vazbu HMGSH. S největší pravděpodobností, stejná residua jsou zodpovědná za vazbu GSNO (Sanghani *et al.*, 2002b; Staab *et al.*, 2008).

*SIGSNOR* cDNA o velikosti 1140 bp, kóduje protein o 379 AMK s předpokládanou molekulovou hmotností 42,5 kDa. Bioinformatická analýza *SIGSNOR* vykazuje 98% sekvenční identitu s GSNOR z *N. attenuata*, 90% s dalším rostlinným GSNOR z *A. thaliana* a *Zea mays*, 67% identitu s hGSNOR a 61% identitu s GSNOR ze *Saccharomyces cerevisiae* (Obr. 6, 7) (Díaz *et al.*, 2003; Kubienová *et al.*, 2013).



Obr. 6 Srovnání aminokyselinových sekvencí enzymů GSNOR ze *S. lycopersicum*, *A. thaliana*, *H. sapiens* a kvasinky *S. cerevisiae*. Identické aminokyseliny jsou značeny černě, podobné aminokyseliny jsou značeny šedě. Čtyři cysteiny Cys99, Cys102, Cys105 a Cys113 vázající strukturální zinek jsou červeně. Cys177 a Cys47, His69 a Glu70 zapojené ve vazbě HMGSH jsou modře a residua tvořící tzv. anion-vazebnou kapsu jsou fialově (převzato z Kubienová *et al.*, 2013).



Obr. 7 Srovnání aminokyselinových sekvencí enzymů GSNOR ze *N. attenuata*, *S. lycopersicum* a *A. thaliana*. Identické aminokyseliny jsou značeny černě (převzato z Wünsche *et al.*, 2011)

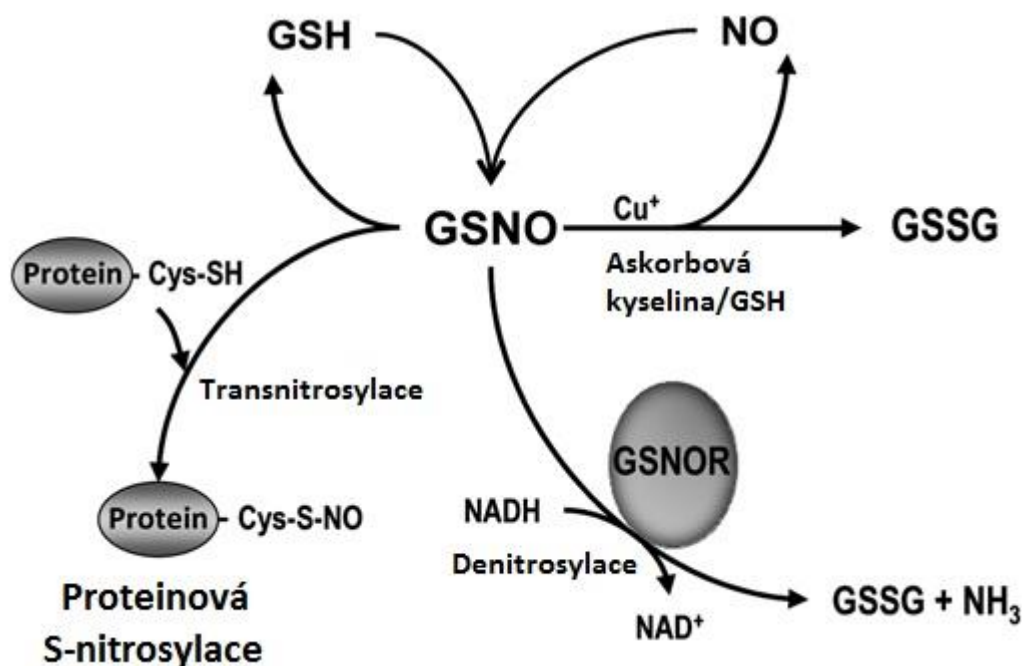
### 2.2.2 Funkce S-nitrosoglutathionreduktasy

U rostlin hraje GSNOR důležitou roli v reakci na působení biotických a abiotických stresových faktorů, v rezistenci vůči bakteriálním nebo houbovým patogenům, což bylo demonstrováno u rostlin tabáku (*Nicotiana spp.*) a huseníčku Thalova (*A. thaliana*) (Sakamoto *et al.*, 2002; Corpas *et al.* 2008; Lee *et al.*, 2008; Letterier *et al.*, 2011; Wünsche *et al.*, 2011; Airaki *et al.*, 2012; Barosso *et al.*, 2013). Enzym byl studován také v jiných rostlinách, jako jsou brukev zelná (*Brassica oleracea*) hrách setý (*Pisum sativum*), kukuřice setá (*Zea mays*), locika (*Lactuca spp.*), olivovník evropský (*Olea europaea*), paprika roční (*Capsicum annuum*), petunie (*Petunia hybrida*), rajčata (*Solanum spp.*), réva vinná (*Vitis vinifera*), rýže setá (*Oryza sativa*), slunečnice roční (*Helianthus annuus*), sója luštinatá (*Glycine max*) a zelenec chocholatý (*Chlorophytum comosum*) (Giese *et al.*, 1994; Dolferus *et al.*, 1997; Garabagi a Strommer, 2004; Barroso *et al.*, 2006; Valderrama *et al.*, 2007; Tesniere a Abbal, 2009; Chaki *et al.*, 2011, Kubienová *et al.*, 2013). GSNOR z *N. attenuata* hraje důležitou roli i v reakci na poranění a v rostlinné obranné reakci proti škůdci *Manduca sexta*. (Wünsche *et al.*, 2011).

GSNOR reguluje hladinu NO, následně pak produkci kyseliny jasmonové, ethylenu a kyseliny salicylové, důležitých fytohormonů, které regulují činnost a hladiny dalších rostlinných obranných látek, např. aktivaci mitogen-aktivovaných proteinových kinas, kyselinou salicylovou indukované proteinkinasy či poraněním indukované proteinkinasy (Wünsche *et al.*, 2011). Bylo také prokázáno, že GSNOR je nezbytná u kvasinek, rostlin a savců v indukci ochrany buněk proti nitrosativnímu stresu (Liu *et al.*, 2001; Valderrama *et al.*, 2007; Letterier *et al.*, 2011).

Převládající GSNOR aktivita nad FADH aktivitou naznačuje, že hlavní rolí tohoto enzymu je spíše kontrola hladiny GSNO než detoxifikace endogenního a exogenního formaldehydu v živých buňkách (Liu *et al.*, 2001).

GSNOR je nyní považován za klíčový regulátor buněčné NO homeostázy. Redukuje intenzitu S-nitrosylace proteinů metabolizací GSNO a snížením hladiny NO (Obr. 8). Snížení GSNOR aktivity vede k akumulaci S-nitrosothiolů (Liu *et al.*, 2001; Feechan *et al.*, 2005) Reakce katalyzovaná GSNOR ovlivňuje rovnováhu GSH a NADH, a tak se nepřímo podílí na buněčném redoxním stavu (Letterier *et al.*, 2011) GSNOR zprostředkovaná redukce GSNO je řízena dostupností NADH a jeho zvýšená intracelulární hladina pravděpodobně spouští GSNO redukci (Staab *et al.*, 2008).



Obr. 8 Schématický model metabolismu GSNO v rostlinných buňkách a jeho regulace GSNOR. NO reaguje s redukovaným glutathionem v přítomnosti  $\text{O}_2$  za tvorby S-nitrosogluthionu. Tento metabolit může být přeměněn GSNOR procesem NADH-dependentní denitrosylace na oxidovaný glutathion (GSSG) a  $\text{NH}_3$ . GSNO může být také v přítomnosti reduktantů, jako je glutathion a askorbát nebo  $\text{Cu}^+$  přeměněn na NO a GSSG. Nebo procesem transnitrosylace GSNO může GSNO přenést NO na cysteinová residua proteinů, což je proces post-translační modifikace proteinů tzv. S-nitrosylace (upraveno dle Leterrier *et al.*, 2011).

### 2.2.3 Lokalizace GSNOR a úloha GSNOR v reakci na rostlinný stres

GSNOR je lokalizována především v cytosolu floémových průvodních buněk a v xylémovém parenchymu (Espunya *et al.*, 2006; Vlot *et al.*, 2008). Její přítomnost byla prokázána v jádře i peroxisomech (Fernández *et al.*, 2003; Reumann *et al.*, 2007). Přítomnost GSNOR v jádře může regulovat lokální hladiny GSNO a chránit genetický materiál před NO-indukovaným poškozením (Fernández *et al.*, 2003).

Analýzou genové exprese GSNOR u *S. lycopersicum* cv. Amateur bylo prokázáno vyšší zastoupení GSNOR v kořenech a stoncích ve srovnání s listy u mladých rostlin a vysoká exprese v reprodukčních orgánech naznačující význam GSNOR pro rozvoj květu i plodu (Kubienová *et al.*, 2013).

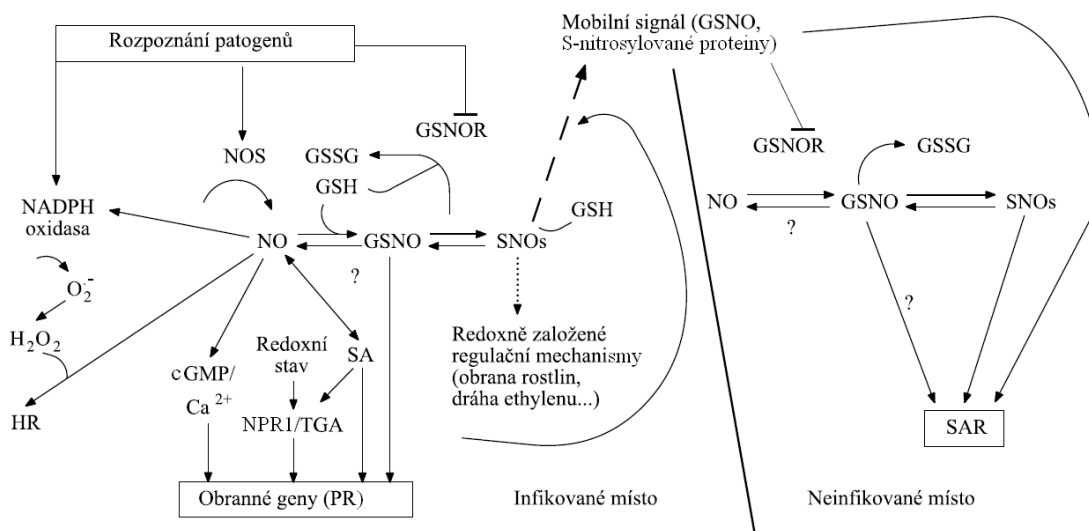
U *A. thaliana* je aktivita GSNOR redukována následně po zranění, aplikací jasmonátu však dochází k její indukci. Jasmonát u rostlin tabáku vyvolal pokles hladiny i aktivity GSNOR, naopak zvýšení aktivity GSNOR bylo detekováno působením kyseliny salicylové (Díaz *et al.*, 2003). Indukce aktivity GSNOR byla zaznamenána v případě biotického stresu u hrachu a vlivem snížení teploty u listů papriky (Corpas

*et al.*, 2008; Airaki *et al.*, 2012). Rostliny *A. thaliana* se sníženou hladinou GSNOR (získané antisense strategií) vykazují výrazně zvýšené hladiny NO, dusičnanů a *S*-nitrososloučenin (Feechan *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008) a vyšší rezistenci k patogenu *Peronospora parasitica* (Resterucci *et al.*, 2007). GSNOR-silenced rostliny tabáku mají zvýšenou náchylnost vůči ataku škůdců a sníženou škůdci indukovanou akumulaci kyseliny jasmonové a ethylenu. (Wünsche *et al.*, 2011). Snížená aktivita GSNOR byla zaznamenána po infekci padlím u rezistentního kultivaru slunečnice (Chaki *et al.*, 2009). Významný rozdíl nebyl pozorován v bazální rezistenci k virulentní i avirulentní *Pseudomonas* u kontrolních rostlin (wild type) ani u GSNOR knockout mutantů *A. thaliana* (Holzmeister *et al.*, 2011). Snížená exprese GSNOR a nižší enzymová aktivita byla detekována po mechanickém poškození např. u *A. thaliana* (Díaz *et al.*, 2003) nebo u slunečnice, kdy poranění hypokotylů vede ke zvýšení obsahu *S*-nitrosothiolů a snížení hladiny proteinu GSNOR (Chaki *et al.*, 2011). Kontinuální a neregulovaná zvýšená exprese GSNOR *A. thaliana* brání normálním přírůstkům produkce *S*-nitrosothiolů po poranění a napadení patogenem, zatímco snížená exprese GSNOR použitím antisense konstruktů za stejných podmínek usnadňuje jejich hromadění (Resterucci *et al.*, 2007).

Rostliny postrádající GSNOR aktivitu mají vyšší množství dusičnanů a nitrososloučenin. Tyto rostliny jsou poté ohroženy teplotními stresi, nerostou na živných půdách a vykazují oslabené obranné reakce, zatímco rostliny se zvýšenou aktivitou GSNOR jsou více odolné vůči virulentním a mikrobiálním patogenům (Feechan *et al.*, 2005). Aktivita GSNOR v těchto rostlinách přímo koreluje s akumulací kyseliny salicylové, kritického signálu odolnosti vůči chorobám, a s expresí s obranou spojeného genu, patogenesis related protein 1 (*PR-1*). GSNO se salicylátem ovlivňuje synergicky aktivaci systemově získané rezistence (Resterucci *et al.*, 2007). GSNOR také pozitivně kontroluje rostlinou imunitu k *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Blumeria graminis* a *Hyaloperonospora parasitica* (Feechan *et al.*, 2005).

*A. thaliana* se sníženou expresí GSNOR vykazuje zvýšenou bazální odolnost vůči *Hyaloperonospora arabidopsis*, což koreluje s vyšší hladinou intracelulárních *S*-nitrosothiolů a konstitutivní aktivací *PR-1* (Resterucci *et al.*, 2007). Systémově získaná rezistence byla narušena u rostlin se zvýšenou expresí GSNOR. Hladiny *S*-nitrosothiolů v rostlinách naznačují, že *S*-nitrosylace je důležitým krokem redox-dependentního regulačního mechanismu rostlin stejně jako u živočichů. *S*-nitrosylované proteiny jsou v dynamické rovnováze s denitrosylovanými proteiny z velké části

v důsledku působení tripeptidu glutathionu (Liu *et al.*, 2001), což je antioxidant reagující s *S*-nitrosothioly za tvorby *S*-nitrosogluthationu (Obr. 9).



Obr. 9 Hypotetický model úlohy *S*-nitrosogluthationreduktasy v obranné reakci rostlin v místě infekce patogenem a systémově získané rezistenci ve vzdálených částech rostliny. Rozpoznání patogenů je následováno zvýšenou produkcí NO, ROS ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ) a kyseliny salicylové (SA), která synergicky indukuje hypersenzitivní reakci (HR) a další obranné reakce na úrovni genové exprese. GSNOR reguluje intracelulární hladiny GSNO a *S*-nitrosothiolů. Snížení její aktivity vyvolá zvýšení intracelulární hladiny *S*-nitrosothiolů (SNO) a tím i posílení lokální ale i systémové rezistence rostliny vůči patogenu (upraveno dle Rusterucci *et al.*, 2007)

Obecně platí, že GSH slouží jako hlavní nízkomolekulární buněčný antioxidant a působí jako nezávislá redoxní signální molekula. Poruchy biosyntézy GSH vedou ke zvýšení rostlinné citlivosti k patogenům. Elicitory ošetřené epidermální buňky tabáku měly za následek zvýšení hladiny NO v několika buněčných kompartmentech včetně cytosolu a chloroplastů rostlinných buněk, z nichž oba mají biosyntetické dráhy pro tvorbu glutathionu, a proto obsahují vysoké hladiny neproteinových thiolů. Protože glutathion je primární cíl NO, tato pozorování naznačují, že GSNO je tvořeno v cytosolu i v chloroplastech (Sakamoto *et al.*, 2002; Kubienová *et al.*, 2013).

### 2.3 Elicitory

Elicitory jsou malé, vysoce konzervativní rodiny extracelulárních proteinů vylučovaných zástupci oomycet, zejména rodů *Phytophthora* a *Pythium* (Kamoun *et al.*, 1994; Huet *et al.*, 1995).

Elicitory jsou složeny z 98 aminokyselin uspořádaných ve struktuře pěti  $\alpha$ -helixů a jednoho  $\beta$ -listu tvořících unikátní ohyb, s hydrofobní kavitou umístěnou v jádře proteinu propojenou s povrchem tunelem (Yu, 1995). Ve struktuře elicitinů

se nenachází arginin, histidin a tryptofan a naopak obsahují vysoký podíl alaninu, threoninu, serinu a leucinu.

Elicitiny lze na základě hodnoty izoelektrického bodu (pI) rozdělit na  $\alpha$ -elicitiny s  $pI < 7$ , které mají hydrofobní valin na 13. pozici a  $\beta$ -elicitiny  $pI > 7$  s lysinovým nebo threoninovým residuem na 13. pozici (Huet *et al.* 1993; 1994, Odonohue *et al.*, 1995). Aminokyselina v 13. pozici elicitinu je klíčovým determinantem nekrotické aktivity (Plešková *et al.*, 2011).  $\alpha$ -elicitiny jsou více aktivní v indukci systémově získané rezistence, zatímco  $\beta$ -elicitiny jsou více aktivní v indukci hypersenzitivní reakce (Nespoulos *et al.*, 1992; Huet *et al.*, 1994;).  $\beta$ -elicitiny způsobují nekrosu v koncentracích v řádech  $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $\alpha$ -elicitiny v řádech  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Geny kódující elicitivity neobsahují introny, proto je možné tyto proteiny exprimovat přímo z genomické DNA. Díky této vlastnosti lze v bakteriálních expresních systémech využít techniky řízené mutagenese za účelem záměny vybraných aminokyselin pro následnou identifikaci jejich zásadních vlastností modulujících biologickou aktivitu daného elicitinu (Kamoun *et al.*, 1993a; Dokládal *et al.*, 2012).

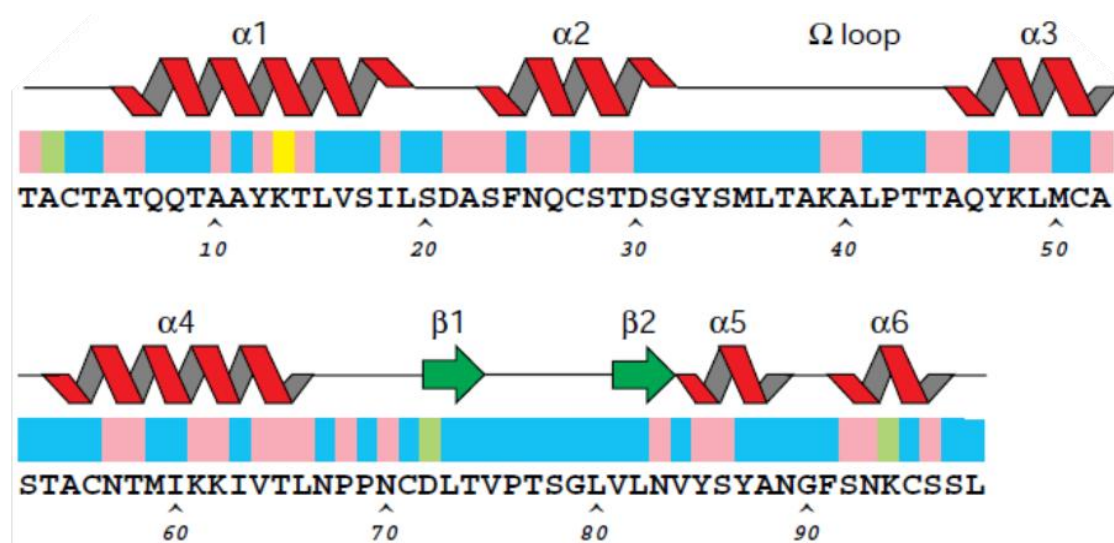
Elicitiny indukují buněčnou smrt, nekrosu tkání a systémově získanou rezistenci u vybraných druhů rostlin patřících do rodiny *Solenaceae* a *Cruciferae* v množství menším než  $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  na g čerstvé váhy (FW) (Bonnet *et al.*, 1986; Kamoun *et al.*, 1993b).

### 2.3.1 Kryptogein

Mezi nejčastěji studované elicitivity patří kryptogein. Jedná se o proteinový elicitor, který vedle schopnosti aktivovat obranné reakce rostlin, vykazuje vlastnosti sterol přenášejících proteinů. Tento asi 10 kDa velký globulární protein je přirozeně sekretovaný fytopatogenem *Phytophthora cryptogea*, způsobující nekrosu listů tabáku (*N. tabacum L. cv. Xanthi*) (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999). Trojrozměrná struktura kryptogeinu je složena z pěti  $\alpha$ -helixů a dvouřetězcového  $\beta$ -listu lemujícího  $\omega$ -smyčku. Jeden okraj  $\beta$ -listu a přilehlá strana  $\omega$ -smyčky tvoří hydrofobní kavitu soustředěnou kolem tyrosinu 78 (Obr. 10). Kavita je tvořena vysoce konzervativními aminokyselinami tvořícími vazebné místo pro steroly a mastné kyseliny. Struktura obsahuje tři disulfidové můstky (Cys3-Cys71, Cys27-Cys56, Cys51-Cys95) (Fefeu *et al.*, 1997, Ponchet *et al.*, 1999).

Kryptogein má izoelektrický bod 8,5, řadí se proto mezi nekrotizující bazické  $\beta$ -elicitiny, které mají v poloze 13 bazickou aminokyselinu lysin a jsou účinné již

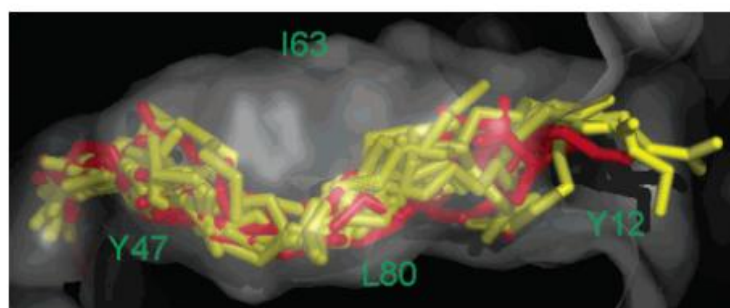
v koncentraci  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jako všechny elicitory kryptogein nevykazuje proteasovou,  $\beta$ -glukanasovou, fosfolipasovou ani jinou enzymatickou aktivitu (Lochman *et al.*, 2005).



Obr. 10 Dvojměrná struktura kryptogeinu. Residua zachovaná v rámci elicitinové rodiny jsou modrá, variabilní residua jsou růžová, dva neměnné úseky se nacházejí v  $\omega$ -smyčce, antiparalelní dvouřetězcový  $\beta$ -list ( $\beta$ 1- $\beta$ 2). S nekrotickou aktivitou související Lys 13 je označen žlutě (převzato z Boissy *et al.*, 1996).

### 2.3.1.1 Mechanismus působení kryptogeinu

Biologická aktivita kryptogeinu je spojena s jeho schopností vázat steroly. Navázání sterolu do kavity proteinu může vyvolat konformační změny nezbytné pro vazbu elicitinu do receptoru. Kryptogein je protein schopný nespécificky vázat a přenášet steroly i mastné kyseliny (Obr. 11). Komplex elicitin-sterol po vazbě k receptoru, což je N-glykosylovaný heterodimerní protein s podjednotkami 162 a 59 kDa, který je umístěn na cytoplasmatické membráně, indukuje fyziologickou reakci (Osman *et al.*, 2001; Lochman *et al.*, 2005).



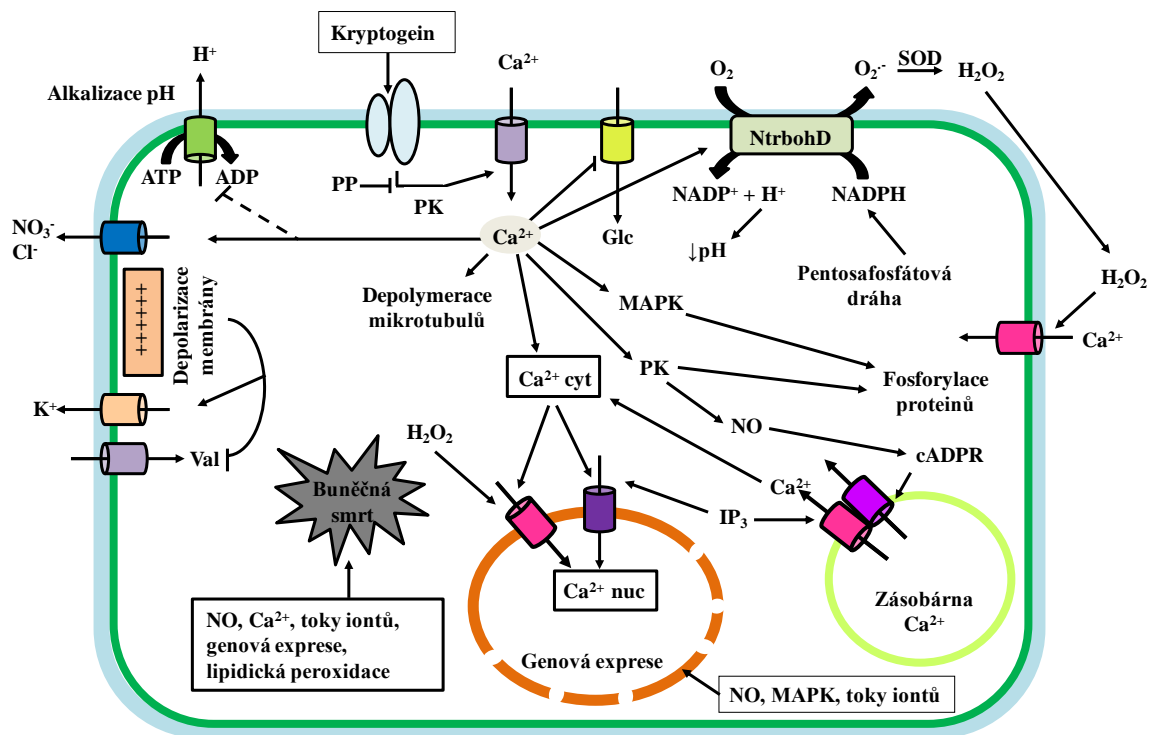
Obr. 11 Molekuly mastných kyselin ukotvené v kavitě kryptogeinu. Nasycené mastné kyseliny jsou značeny žlutě (18 molekul) a nenasycené jsou značeny červeně (11 molekul). Aktivní místo je reprezentováno molekulárním povrchem s vybranými značenými aminokyselinami. (převzato z Dobeš *et al.*, 2004).



Rozpoznání kryptogeinu receptorem vede k aktivaci proteinkinasy nebo inhibici fosfatasy, které aktivují extracelulární přísun  $\text{Ca}^{2+}$ . Následně dochází k produkci ROS, aktivaci dvou homologů mitogen aktivovaných proteinů s podobnou molekulovou hmotností 46 a 50 kDa, odtoku aniontů ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ) a depolarizaci plasmatické membrány, inhibici importu glukózy, depolymerizaci mikrotubulů a případně i k inhibici  $\text{H}^+$ -ATPasy. Proteinkinasa aktivace spouští tvorbu NO.

Superoxidové ionty jsou generovány NADPH oxidasou, která vyžaduje NADPH z pentosafosfátové dráhy. Dochází ke snížení pH cytosolu, tím alkalizaci extracelulárního prostoru a aktivaci mitogen aktivovaných proteinkinasy, která je nezávislá na produkci ROS a NO. Superoxidové ionty jsou přeměňovány superoxidodismutasou na  $\text{H}_2\text{O}_2$ , který indukuje následný přísun extracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky a tím i zvýšení hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu i jádře. Ke zvýšení hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu dochází dále v důsledku uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních zásobáren vlivem inositoltrifosfátu a cyklickou adenosindifosforibosou regulovaných kanálů. Hladina  $\text{Ca}^{2+}$  v jádře závisí na inositoltrifosfát-dependentních vápenatých kanálech. Produkce cyklické adenosindifosforibosy je regulována hladinou NO (Durner *et al.*, 1998). V důsledku depolarizace plasmatické membrány dochází ke snížení koncentrace  $\text{K}^+$  v buňce, k inhibici importu aminokyseliny valinu a následně k buněčné smrti.

Elicitiny indukovaná transdukce signálních drah vede k posílení buněčných stěn, tvorbě antimikrobiálních metabolitů (fytoalexinů př. kapsidiol), (PR) proteinů a enzymů ochraňujících před oxidativním stresem, lignifikaci či hypersenzitivní reakci včetně buněčné nekrosy a může to vést i k systematicky získané rezistenci (Obr. 12) (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999; Garcia-Brugger *et al.*, 2006).



Obr. 12 Schéma kryptogeinem indukované signální transdukce. Vysvětlivky: cyklická adenosindifosforibosa (cADPR), fosfatasa (PP), glukosa (Glc), inositoltrifosfát (IP<sub>3</sub>), mitogen aktivovaná proteinkinasa (MAPK), proteinkinasa (PK), superoxididismutasa (SOD) (upraveno dle z Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

### 2.3.1.2 Mutantní formy kryptogeinu

Kryptogein X24, označovány jako wild-type (WT), i jeho mutantní formy byly produkovány eukaryotickým expresním systémem *Pichia pastoris*. Mutantní formy byly připraveny řízenou mutací, zaměřenou zejména na hydrofobní kavitu elicitinů, kam se mohou vázat steroly a fosfolipidy (Tab. 1).

Kryptogein X24 s molekulovou hmotností 10,386 kDa se od přirozené formy kryptogeinu liší přítomností sekvence EAEA na N-konci molekuly. Tato sekvence má signální funkci a při sekreci nedochází k jejímu odštěpení.

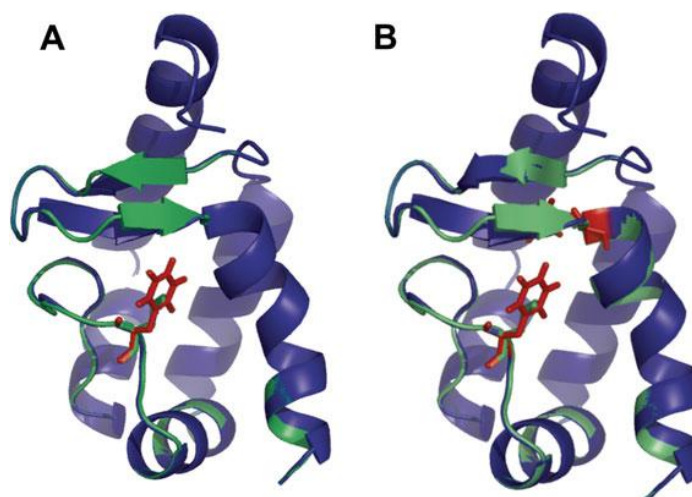
Mutant V84F byl připraven záměnou valinu na 84 pozici za fenylalanin, molekulová hmotnost je 10,433 kDa. Proti X24 má podstatně sníženou schopnost vázat a přenášet steroly, v aktivaci produkce ROS je téměř stejně efektivní jako X24, způsobuje sice menší nekrosy ale indukuje přibližně stejnou rezistenci.

Mutantní forma L41F má molekulovou hmotnost 10,418 kDa. Připravená byla záměnou malé nepolární aminokyseliny leucinu za objemnější hydrofobní aminokyselinu fenylalanin na pozici 41, vykazuje proti X24 menší pokles přenosu

a vazby sterolů, na polovinu sníženou schopnost aktivace tvorby ROS, minimální tvorbu nekros a nevyvolává indukci rezistence.

Dvojitý mutant L41F/V84F s molekulovou hmotností 10,467 kDa byl připraven kombinací obou předchozích záměn. Nemá téměř žádnou schopnost přenášet a vázat steroly, ale je schopen přenosu fosfolipidů. Neaktivuje produkci ROS, vykazuje minimální tvorbu nekros a nulovou indukci rezistence ve srovnání s kryptogeinem X24 (Dokládál *et al.*, 2012).

L41F a L41F/V84F (Obr. 13) vykazují sníženou schopnost produkce ROS a tvorby nekrotických efektů, což koreluje s jejich velmi nízkou schopností spouštět syntézu seskviterpenoidního fytoalexinu kapsidiolu, který se akumuluje v nekrotických oblastech a je známou rostlinou obranou sloučeninou. Jeho produkce může být spuštěna útokem patogenů nebo biotickými či abiotickými elicitory (Plešková *et al.*, 2011; Dokládál *et al.*, 2012).

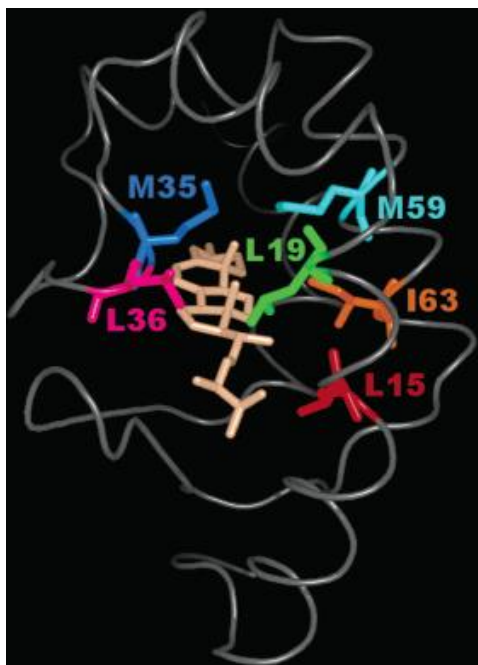


Obr. 13 Strukturální uspořádání WT kryptogeinu (zelený) a jeho mutantů L41F (A, modrý) a L41F/V84F (B, modrý). Postranní řetězce mutovaných residuí (červené) přijaly konformaci  $\omega$ -smyčky či celého proteinové struktury. Nejvíce zřejmý rozdíl je v prodloužení jednoho z  $\beta$ -řetězců v  $\beta$ -vlásečku (převzato z Dokládál *et al.*, 2012).

Tab. 1 Srovnání vlastností WT kryptogeinu a jeho vybraných mutantů (Dokládál *et al.*, 2012).

Mutace	Přenos sterolů	Přenos fosfolipidů	Vázání k PM	Syntéza ROS	Akumulace kapsidiolu	% společných vlastností s WT	Indukce rezistence
WT	+++	+++	+++	+++	+++	100	+++
V84F	+	+++	+++	+++	++	65	+++
L41F	+++	++	+	+	-	31	+
L41F/V84F	+	+++	+	-	-	19	-

Další pětice mutovaných forem kryptogeinu měnící aminokyseliny L15, L19, M35, L36, M59, a I63 je také zaměřena na změny v hydrofobní kavitě. K posílení efektu byly provedeny dvojitě i trojitě mutace. Proteiny byly stejně jako předchozí exprimovány v kvasince *P. pastoris* (Obr. 15).



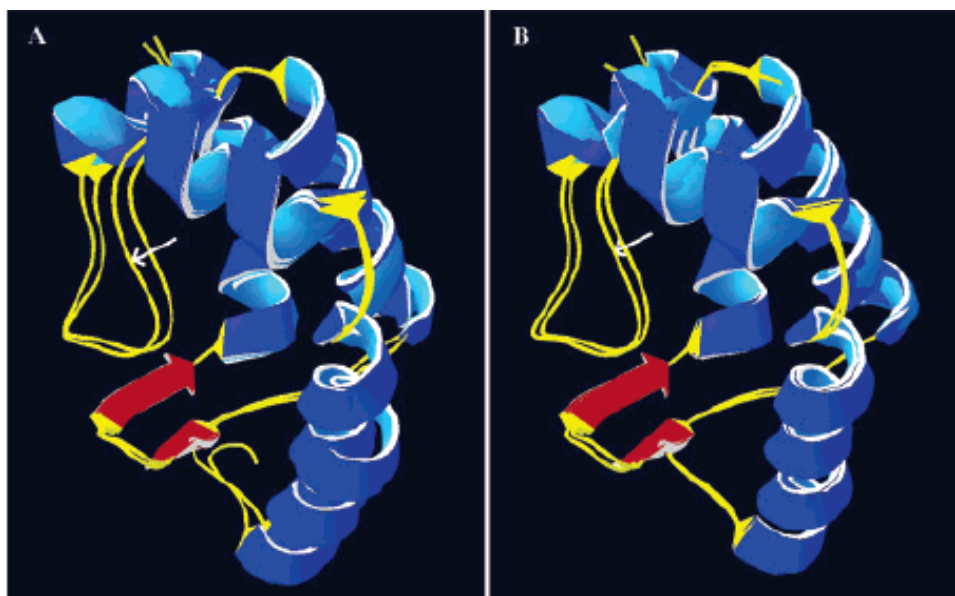
Obr. 15 Třidimensionální model kryptogeinu s ergosterolem (hnědý) vázaným v hydrofobní kavitě. Model ukazuje pozice mutovaných residuí ovlivňujících vazbu lipidů a biologický efekt kryptogeinu (převzato z Lochman *et al.*, 2005).

Aminokyselina L15 je umístěna v blízkosti otvoru hydrofobní kavity a točí se po vazbě sterolu. Substitute tohoto residua tryptofanem brání rotaci i možným vazbám s lipidy. L19 zbytek je situován přímo v ústí otvoru, čímž tvoří hydrofobní kontakt s L36. Mutace L19 mění jeho elektrostatiku a může ovlivnit kinetiku vazby ke sterolům, zvláště pokud jde o ligandy s velkým dipólovým momentem např. substitute L19 za více hydrofilní arginin zvyšuje pI proteinu. L36 zbytek je také blízko ústí otvoru a také způsobuje mírné konformační změny po vazbě sterolu, který tvoří hydrofobní kontakt s L36. Residua M35 a M59 se taktéž točí po vazbě sterolu, zároveň pokud jsou obě residua aromatická, ovlivňují velikost kavity svým překryvem. I36 residuum je zachováno mezi všemi známými elicitory, je součástí hydrofobního jádra proteinu a interaguje se steroly.

Trojité mutant M35W/M59W/I63F má sterické zábrany vedoucí k narušení struktury proteinu, má mírně snížený poměr  $\alpha$ -helix/ $\beta$ -struktur. Modelové experimenty ukázaly, že má rozšířenou kapsu díky van der Waalsovým silám způsobujícím odpuzování F63

a V84. Toto odpuzování pravděpodobně způsobuje reorganizaci kavity a rekonstrukci vazebných schopností postrádaných u M35W/M59W (Obr. 16). Oba mutanty M35F/M59W a M35W/M59W jsou schopni vázat mastné kyseliny, ale M35W/M59W na rozdíl od M35F/M59W neváže steroly. Důsledkem mutace L15W/L36F je částečné uzavření vstupu tunelu a znemožnění rotace W15, což má za následek ztrátu schopnosti vázat steroly i mastné kyseliny. L19R mění elektrostatické interakce, které jsou důležité pro vazbu ligandu do dutiny a hodnotu pI. Tento protein neváže steroly ani nestimuluje syntézu ROS a změnu pH, ale váže mastné kyseliny a je schopen indukovat buněčnou smrt neúčinněji z těchto mutantů.

Trojité mutant je v syntéze ROS a změně pH stejně účinný jako WT. Produkce ROS aktivovaná M35F/M59W byla opožděná a schopnost vázat steroly byla proti M35W/M59W/I63F a WT poloviční, což vysvětluje jeho nižší biologickou účinnost. Proteiny L15W/L36F a M35W/M59W sice nejsou schopné vázat steroly, ale indukují syntézu ROS i změny pH i když s účinností podstatně nižší než u ostatních mutantů (Tab. 2) (Lochman *et al.*, 2005).

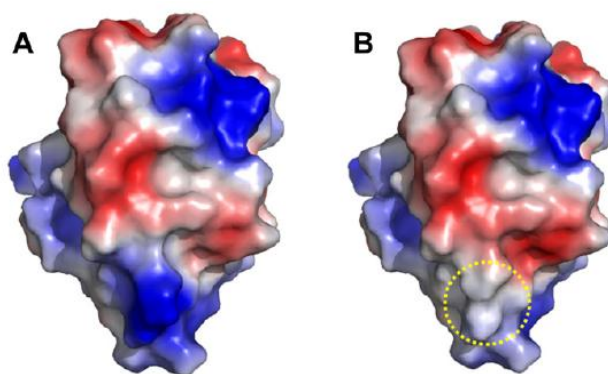


Obr. 16 Superpozice volného WT, dehydroergosterolové vazby WT a mutantních struktur kryptogeinu. (A) Vazba dehydroergosterolu do kavity WT kryptogeinu indukuje konformační změny  $\omega$ -smyčky (šipka). (B) Superpozice struktur WT a M35W/M59W mutantu (šipka). Změny indukované mutací jsou podobné změnám indukovaným vazbou sterolu.  $\alpha$ -helixy proteinů jsou označeny modře,  $\beta$ -listy červeně a smyčky žlutě (převzato z Lochman *et al.*, 2005).

Tab. 2 Disociační konstanty komplexů se steroly a fosfolipidy s mutovanými kryptogeyny a biologické efekty mutantů (Upraveno dle Lochman *et al.*, 2005).

Mutace	$K_d$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )		Syntéza ROS	Změna pH
	Steroly	Fosfolipidy		
WT	$0,050 \pm 0,002$	$0,19 \pm 0,010$	+++	+++
M35F/M59W	$0,021 \pm 0,010$	$0,132 \pm 0,007$	++	+++
M35W/M59W/I63F	$0,068 \pm 0,005$	$0,09 \pm 0,010$	+++	+++
M35W/M59W	-	$0,08 \pm 0,010$	+	++
L19R	-	$0,12 \pm 0,020$	-	-
L15W/L36F	-	-	+	++

Mutant kryptogeynu K13V s molekulovou hmotností 10,356 kDa, má na 13 pozici aminokyselinu valin místo bazické aminokyseliny lysin a je svými vlastnostmi podobný spíše  $\alpha$ -elicitinu kapsiceinu, který má přirozeně hydrofobní valin v 13 pozici, což potvrzuje zásadní roli 13 aminokyseliny v sekvenci elicitinů i význam rozložení náboje na povrchu těchto proteinů. K13V v porovnání s X24 způsobuje menší nekrotickou aktivitu, mírnou indukci rezistence, sníženou tvorbu kapsidiolu, dále také není schopen přenášet mastné kyseliny a má redukovanou schopnost vázat a přenášet steroly, která je spojená se sníženou schopností aktivovat produkci ROS (Obr. 14).



Obr. 14 Mapa elektrostatického potenciálu WT kryptogeynu (A) a jeho mutantu K13V (B). Pozice mutovaného residua je označena žlutým kruhem. K13V mutace významně pozměňuje distribuci náboje na povrchu kryptogeynu (Plešková *et al.*, 2011).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál a přístroje

#### 3.1.1 Chemikálie

**Acros Organics (USA):** Bromfenolová modř; Triton X-100.

**Agrisera (Švédsko):** Primární polyklonální králičí protilátka anti-AtGSNOR; primární monoklonální myší protilátka anti-NO<sub>2</sub>-Tyr.

**AppliChem (Německo):** Dodecylsulfát lithný (LDS); dodecylsulfát sodný (SDS); NADH; sušené odtučněné mléko.

**Axon Medchem (Holandsko):** Inhibitor GSNOR-N6022.

**Bio-Labs (UK):** Protein-Ladder 10-250 kDa.

**Bio-Rad (USA):** Laemmliho vzorkovací pufr 4x.

**ENZO Life Sciences (USA):** 2-4-karboxyfenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (cPTIO).

**Katedra biochemie PřF UP Olomouc (Česká republika):** Primární polyklonální králičí protilátka anti-SIGSNOR

**Lachema (Česká republika):** Aceton; diethylether; hydroxidy – draselný, sodný.

**Lach-Ner (Česká republika):** Kyseliny – chlorovodíková, fosforečná, octová; methanol.

**Merck (Německo):** Ponceau S.

**Penta (Česká republika):** Dihydrogenfosforečnan draselný; ethanol; hydrogenfosforečnan draselný dihydrát.

**Sigma-Aldrich (Německo):** Akrylamid; Color burst electrophoresis marker; Coomassie Brilliant Blue R-250; dihydrogenfosforečnan sodný; dimethylsulfoxid (DMSO); dithiothreitol (DTT); dusitan sodný; glycerol; glycin; hovězí sérový albumin (BSA); hydrogenfosforečnan sodný dihydrát; 2-merkptoethanol; NAD<sup>+</sup>; Nitroterazolium Blue chlorid ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfatem (NBT-BCIP); n-Butanol; nitrovaný hovězí sérový albumin (NO<sub>2</sub>-BSA); Nitroterazolium Blue chlorid (NBT); *N*-methylphenazoniummethylsulfát (PMS); *N, N'*-metylenbisakrylamid; *N, N, N', N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED); paraformaldehyd; persíran amonný (APS); phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); pyruvát sodný; redukovaný glutathion (GSH); sekundární anti-králičí protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfatasou; sekundární anti-myší protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfatasou; tris(hydroxymethyl)aminomethan; Tween-20; želatina z kůže ryb.

**Serva (Německo):** Western Blot Protein Standard.

**Ústav biochemie Masarykovy univerzity v Brně (Česká Republika):** Elicitiny - oligandrin, kryptogein (X24 – WT a jeho mutanti L41F, V84F).

GSNO a formaldehyd byly připraveny dle postupů uvedených v této práci.

### **3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení**

Analytické váhy (Sartorius, Německo); blotovací zařízení Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, USA); centrifuga Multi-Spin MSC-6000 (Biosan, Litva); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); dokumentační zařízení Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA); elektroforetický systém Mini PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); elektromagnetická míchačka s ohřevem Intelli-Stirrer MSH-300i (Biosan, Litva); elektronická chladicí lázeň N<sup>o</sup>ice (Techne, UK); exsikátor (Kavalierglass, Česká republika); chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo); inkubátor Enviromental Shaker-Incubator ES-20 (Biosan, Litva); kolonky NAP-5 (GE Healthcare, USA); mikrodestičkový spektrofotometr PowerWave XS (BioTek Instruments, USA); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); nitrocelulosevá membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA); spektrofotometr Beckman DU 7500 (Beckman Coulter, USA); světelný a fluorescenční mikroskop Olympus BX50 s digitální kamerou Olympus DP70 (Olympus Optical, Japonsko); termoblok Genius Dry bath incubator (Major Science, BioTech, Česká republika); třepačka s plochou platformou (Biosan, Litva); UV/VIS spektrofotometr 8453 (Agilent Technologies, USA); stereoskopický mikroskop STM PRO (BEL Engineering, Itálie), vakuová pumpa (Edwards, UK); Vortex mixer SA8 (Stuart, UK); zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA); zdroj pro Western blot Power supply model 1000/500 (Bio-Rad, USA).

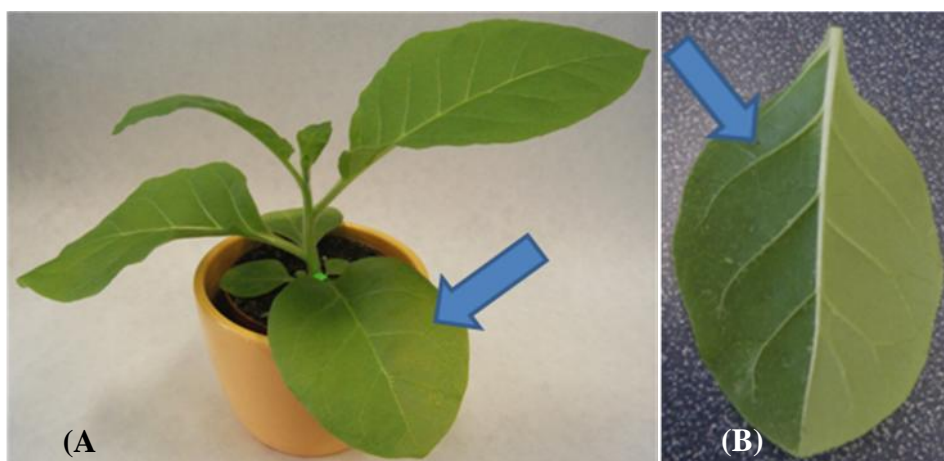
### **3.1.3 Rostlinný materiál**

Vliv aplikace vybraných elicitinů a látek modulujících hladinu RNS byl testován na 8-9 týdenních rostlinách tabáku (*N. tabacum* cv. Samsung). Semena byla vyseta do perlitu, vzrostlé semenáčky byly následně přesazeny do květináčů se zahradnickým substrátem.



### 3.1.3.1 Příprava rostlinného materiálu - aplikace elicitinů

Zvolené elicitiny oligandrin či kryptogein (X24 a jeho mutanti L41F, V84F) byly aplikovány metodou tlakové injekce vždy do pravé poloviny pátého listu rostliny (Obr. 17), tak aby celá polovina listu byla viditelně naplněna roztokem. Poté byla pro sledování vlivu jejich aplikace na celou zvolenou rostlinu odebírána pravá polovina listu (obsahující injektovaný elicitin) a levá polovina pátého listu (polovina vedle místa aplikace) v časových intervalech 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 a 48 h po injekci elicitinu. Koncentrace elicitinu v injektovaném roztoku byla  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , jako kontrola byla do pravé poloviny listu injektována destilovaná voda. Byly také připraveny kontrolní vzorky z pátých listů rostlin bez jakéhokoliv ošetření. Odebraný rostlinný materiál byl po rychlém zmražení v tekutém dusíku uchován v mrazicím boxu při  $-80^\circ\text{C}$ . Odběry byly provedeny v pěti opakováních v různých obdobích. Zásobní roztoky elicitinů o koncentraci  $96 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byly poskytnuty Ústavem biochemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.



Obr. 17 Rostlina *N. tabacum* cv. Samsung. (A) Pátý list a místo aplikace (pravá polovina listu) elicitinu či modulátoru je vyznačeno šipkou. (B) Pohled na spodní stranu listu s místem aplikace (pravá polovina listu) elicitinu či modulátoru vyznačeným šipkou.

### 3.1.3.2 Příprava rostlinného materiálu - aplikace modulátorů

Do pravé poloviny pátého listu rostliny *N. tabacum* cv. Samsung (Obr. 17) byl injektován kryptogein X24 o koncentraci  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  v kombinaci s donorem NO ( $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  GSNO), lapačem NO ( $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  cPTIO) nebo inhibitorem GSNOR ( $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  N6022). Modulátory byly aplikovány i bez přítomnosti elicitinu. Jako kontrola byla použita opět destilovaná voda a byly připraveny i kontrolní vzorky z pátých listů rostlin bez jakéhokoliv ošetření. Odběry i uchování rostlinného materiálu

bylo provedeno totožným způsobem jako při aplikaci samotných elicitinů avšak pouze v časových intervalech 0, 2, 4, 7, 24 a 48 h, zvolených na základě výsledků spektrofotometrického stanovení aktivity GSNOR po aplikaci elicitinů. Pro vyloučení vlivu rozpouštědla inhibitoru (DMSO) byly provedeny i odběry listů u rostlin, do kterých byla aplikována pouze tato látka a to o stejné koncentraci i ve stejném množství jako při jejím použití s inhibitorem. Odběry byly provedeny ve čtyřech opakováních v různých obdobích.

Pro histochemickou studii byly připraveny další rostliny, které byly ihned použity k realizaci experimentu.

### **3.1.4 Příprava S-nitrosoglutathionu**

Navážka 614 mg redukovaného glutathionu byla rozpuštěna ve 3 ml  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  HCl vychlazené na ledu. Poté bylo k roztoku za stálého chlazení a míchání přidáno 138 mg  $\text{NaNO}_2$  a reakční směs se ponechala 40 min na ledové lázni. Vznikla hustá růžová sraženina. Sraženina byla odsáta na Büchnerově nálevce a promyta postupně 2x 10 ml ledově vychlazené destilované vody, 2x 10 ml ledově vychlazeného acetonu a 2x 10 ml ledově vychlazeného diethyletheru. Získaný produkt byl převeden na hliníkovou folii a lehce zabalený (ochrana před světlem) byl přes noc dosušen v exsikátoru a následně uchován v mrazicím boxu při  $-20^\circ\text{C}$  (Moore a Mani, 2002).

### **3.1.5 Příprava čerstvého formaldehydu z paraformaldehydu**

Směs tvořená 3 g paraformaldehydu a 10 ml destilované vody byla za stálého míchání zahřívána na teplotu  $70^\circ\text{C}$ . Poté byl opatrně po kapkách přidáván NaOH o koncentraci  $6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , dokud roztok nebyl zcela čirý. Připravený formaldehyd měl koncentraci  $10 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a po vychladnutí byl uchován v mrazicím boxu při  $-20^\circ\text{C}$  (upraveno dle Díaz *et al.*, 2004).

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy**

Spektrofotometrické stanovení aktivity enzymu GSNOR bylo provedeno v pravých (místo aplikace) a levých (vedle místa aplikace) polovinách pátých listů rostlin tabáku ošetřených elicitinu v časech 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 a 48 h po injekci elicitinu. A dále v obou polovinách pátých listů tabákových rostlin ošetřených modulátory aktivity

i jejich kombinacemi s kryptogeinem X24 v časových intervalech 0, 2, 4, 7, 24 a 48 h po aplikaci.

### **3.2.1.1 Příprava extraktu**

Rostlinný materiál byl rozetřen na prach v třecí misce s tekutým dusíkem. Extrakce byla provedena v poměru 1:2 (1 g rostlinného materiálu : 2 ml extrakčního pufru). Pro extrakci byl použit extrakční pufr (50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7,5; 0,2% Triton X-100), ke kterému byl vždy těsně před použitím přidán DTT (výsledná koncentrace 2 mmol·l<sup>-1</sup>) a PMSF (výsledná koncentrace 1 mol·l<sup>-1</sup>). Homogenát byl poté centrifugován 20 min při 16 000 g a 4°C. Extrakty byly mezi jednotlivými kroky i během dalšího pracovního postupu neustále uchovávány v ledové lázni.

### **3.2.1.2 Přechištění extraktu**

Pro odstranění endogenního GSNO byl supernatant získaný centrifugací po homogenizaci rostlinného materiálu přechištěn gelovou permeační chromatografií (gelovou filtrací) na kolonce NAP-5 (náplň Sephadex, porozita G-25). Odsolovací kolonka byla ekvilibrována 3x2,5 ml pufru (10 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sup>+</sup>-fosfátový pufr, pH 6,8), když se ekvilibrační pufr naposledy vsákl na úroveň gelového sloupce, bylo aplikováno 500 µl supernatantu. Neprodleně po vsáknutí supernatantu, opět na úroveň gelového sloupce, byl na kolonku nanesen 1 ml elučního pufru (50 mmol·l<sup>-1</sup> K<sup>+</sup>-fosfátový pufr, pH 7,8) a vzápětí byl jímán eluát (1,5 ml). Následně byla kolonka promývána 25 ml destilované vody (Corpas *et al.*, 2008).

### **3.2.1.3 Měření aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy**

Aktivita GSNOR byla měřena na mikrodestičkovém readeru PowerWave XS (BioTek Instruments, USA) v 96-ti jamkových mikrodestičkách. Do každé z jamek bylo postupně pipetováno 225 µl reakčního pufru (20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, pH 8), 15 µl rostlinného extraktu a 30 µl 2 mmol·l<sup>-1</sup> NADH. Reakce byla vždy zahajována 30 µl 4 mmol·l<sup>-1</sup> GSNO. Roztoky NADH a GSNO byly připravovány vždy čerstvé a těsně před měřením. GSNO je nitrosothiol citlivý na světlo, proto byl jeho roztok uchováván ve tmě a spolu NADH a vzorky byly uchovávány v ledové lázni. V případě blanku byl přírůstek substrátu enzymu GSNO nahrazen 30 µl destilované vody. Měření všech vzorků bylo provedeno v tripletech, kdy každý vzorek měl vždy svůj blank. Zaznamenáván byl pokles absorbance při vlnové délce 340 nm a konstantní teplotě 30°C v intervalech 15 s po dobu 20 min.

V jamkách se vzorky byla dále měřena absorbance při 900 a 970 nm pro stanovení délky optické dráhy. Měření bylo provedeno ihned po ukončení dvacetiminutového měření při 340 nm.

### 3.2.2 Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové

Stanovení obsahu proteinů bylo provedeno na mikrodestičkovém readeru PowerWave XS (BioTek Instruments, USA). Kalibrační křivka byla vytvořena pomocí BSA jako standardu v rozsahu koncentrací 0,2 - 1,2 mg·ml<sup>-1</sup>. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo postupně pipetováno 45 μl destilované vody, 5 μl extraktu, standardu nebo destilované vody (blank). Následně bylo do jamek přidáno 200 μl roztoku činidla Bradfordové, který byl připraven naředěním zásobního roztoku Coomassie Brilliant Blue (50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 25 ml 95% methanolu, 50 ml 85% kyseliny fosforečné) destilovanou vodou v poměru 1:4 (barvivo : destilovaná voda). Po jemném protřepání destičky se modré zbarvení nechalo 5 min vyvíjet a poté byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Měření bylo provedeno v dupletech (Bradford, 1976).

### 3.2.3 Stanovení kinetických parametrů $K_m$ a $V_{lim}$

Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) je konstantou poloviční saturace, tzn. vyjadřuje koncentraci substrátu, při níž je rychlost enzymové reakce polovinou rychlosti limitní ( $V_{lim}$ ). Rovněž je ukazatelem míry afinity enzymu vůči substrátu, čím nižší je hodnota  $K_m$ , tím vyšší má substrát schopnost vázat se do aktivního místa enzymu.

K experimentálnímu určení  $K_m$  a  $V_{lim}$  byly použity 5., 6. a 7. listy tří 8-9 týdnů starých rostlin *N. tabacum* cv. Samsung, bez jakéhokoliv ošetření, ze kterých byl vytvořen směsný vzorek. Rostlinný extrakt byl připraven stejným způsobem jako pro spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR (viz podkapitola 3.2.1.1), vzorek však nebyl dále přečištěn gelovou filtrací.

Ke stanovení byl využit UV/VIS spektrofotometr 8453 (Agilent Technologies, USA) s vyhřívaným kyvetovým prostorem na konstantní teplotu 30°C. Sledována byla kinetika enzymové reakce při 340 nm v časových intervalech 15 s po dobu 5 min. Do skleněné kyvety bylo pipetováno 1,5 ml reakčního pufru (20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8), 200 μl 2 mmol·l<sup>-1</sup> koenzymu NADH a 100 μl extraktu. Reakce byla zahajována 200 μl substrátu enzymu GSNO. Rozmezí výsledných koncentrací substrátu v kyvetě bylo 25-400 μmol·l<sup>-1</sup>. V případě blanku bylo místo substrátu do kyvety pipetováno

200  $\mu\text{l}$  destilované vody. Roztok GSNO byl opět uchováván ve tmě a spolu s NADH a extrakty byl skladován v ledové lázni. Měření bylo provedeno ve trojím opakování.

Kinetické parametry byly vyhodnoceny dle Michaelise a Mentenové, Lineweavera a Burka, Hanese a Woolfa a také Woolfa, Augustinssona a Hofsteeho. Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny pomocí programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

### 3.2.4 Stanovení $\text{IC}_{50}$

$\text{IC}_{50}$  je taková koncentrace inhibitoru, při níž je počáteční reakční rychlost poloviční než počáteční rychlost reakce bez přítomnosti inhibitoru.

Ke stanovení  $\text{IC}_{50}$  byl použit směsný vzorek z 5., 6. a 7. listů tří 8-9 týdenních rostlin *N. tabacum* cv. Samsung bez jakéhokoliv ošetření. Příprava extraktu byla totožná jako pro spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR (viz podkapitola 3.2.1.1). Vzorek nebyl dále přečištěn gelovou filtrací.

Měření bylo provedeno na UV/VIS spektrofotometru Beckmann DU7500 (Beckman Coulter, USA) s inkubovaným kyvetovým prostorem. Sledována byla kinetika enzymové reakce při 340 nm v časových intervalech 15 s po dobu 5 min při konstantní teplotě 30°C. Do skleněné kyvety bylo pipetováno 1,5 ml reakčního pufru (20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl, pH 8), 200  $\mu\text{l}$  2  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADH, 25  $\mu\text{l}$  extraktu a 75  $\mu\text{l}$  inhibitoru N6022, kdy rozmezí výsledných koncentrací inhibitoru bylo 40-3500  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Reakce byla startována přidavkem 200  $\mu\text{l}$  4  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  GSNO. V případě blanku byl přidavek substrátu nahrazen 200  $\mu\text{l}$  destilované vody. Roztok GSNO i zásobní roztok inhibitoru byly uchovávány ve tmě a opět i s extrakty a NADH byly uchovávány v ledové lázni. Měření bylo provedeno v trojím opakování.

Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny pomocí programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

### 3.2.5 SDS-PAGE

Elektroforetická separace proteinů byla provedena ve 12% dělicím polyakrylamidovém gelu o pH 8,8 a 4% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu o pH 6,8. Polymerace obou gelů byla startována přidavkem čerstvě připraveného roztoku 10% APS. Bezprostředně po nastartování polymerační reakce byl dělicí gel nalit do prostoru mezi skly a vzápětí byl gel převrstven vodou nasyceným n-butanolem. Po uplynutí 30 min byl n-butanol odstraněn a povrch gelu byl opláchnut destilovanou vodou. Následně byla nastartována

polymerace zaostřovacího gelu a ten byl také přenesen mezi skla a po vložení hřebínku se gel polymeroval 30 min. Skla s gely byla poté zabalena do ubrousků zvlhčených destilovanou vodou a uchována v igelitových sáčkách při 4°C do druhého dne, čímž byla zajištěna kvalitnější polymerace gelů.

Skla s gely byla druhý den, umístěna do elektroforetické komory, kam byl posléze nalit elektrodotový pufr. Po vyjmutí hřebínku bylo do jamek aplikováno 5 µl standardu molekulové hmotnosti, 40 µl kontrolního vzorku a 40 µl jednotlivých vzorků. Standardem molekulové hmotnosti byl komerční Color Burst Electrophoresis Marker (Sigma), Protein-Ladder 10-250 kDa (BioLabs) nebo Western Blot Protein Standard. Kontrolním vzorkem byl rekombinantní protein GSNOR z *Lactuca sativa* o koncentraci 0,3 µg·ml<sup>-1</sup>; 0,5 µg·ml<sup>-1</sup>; 0,75 µg·ml<sup>-1</sup> nebo v případě detekce nitrovaných proteinů NO<sub>2</sub>-BSA o koncentraci 0,1 µg·ml<sup>-1</sup>; 0,3 µg·ml<sup>-1</sup>; 0,5 µg·ml<sup>-1</sup>. Dělení vzorků v zaostřovacím gelu probíhalo při konstantním napětí 120 V. Po jejich doputování na rozhraní gelů byl zdroj nastaven na konstantní hodnotu 180 V.

### 3.2.5.1 Roztoky a pufrы pro SDS-PAGE

Dělicí a zaostřovací gel: Roztoky k přípravě obou gelů pro SDS-PAGE elektroforézu jsou uvedeny v Tab. 3. Uvedené hodnoty odpovídají množství potřebnému k přípravě čtyř kompletních gelů o tloušťce 1,5 mm.

Tab. 3 Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy jsou uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	H <sub>2</sub> O	1,5 mol·l <sup>-1</sup> <sup>1</sup> Tris- HCl, pH 8,8	0,5 mol·l <sup>-1</sup> <sup>1</sup> Tris- HCl, pH 8,8	10% SDS	TEMED	10% APS
Dělicí 12%	12	10,2	7,5	-	0,3	0,03	0,3
Zaostřovací 4%	3,9	18,3	-	7,5	0,3	0,03	0,3

Elektrodotový pufr: 0,025 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8; 0,192 mol·l<sup>-1</sup> glycin, 0,1% SDS.

Laemmliho vzorkovací pufr 4x: 62,5 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6,8; 10% glycerol, 1% LDS, 0,005% bromfenolová modř. K pufru byl před použitím přidán 2-merkptoethanol v poměru 9:1 (pufr : 2-merkptoethanol).

Vodou nasycený n-butanol: n-butanol a destilovaná voda v poměru 10:1 (n-butanol : voda).

### **3.2.5.2 Příprava extraktů pro SDS-PAGE**

Rostlinný materiál byl zhomogenizován v třecí misce s tekutým dusíkem. Extrakce byla provedena v poměru 1:2 (1 g rostlinného materiálu : 2 ml extrakčního pufru), kdy k pufru (50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7,5; 0,2% Triton X-100) bylo vždy těsně před použitím přidáno PMSF (finální koncentrace 1 mol·l<sup>-1</sup>). Vzorek byl centrifugován 20 min při 16 000 g a 4°C. Extrakty byly mezi jednotlivými kroky pracovního postupu uchovávány v ledové lázni. K přípravě vzorků byl dále využit supernatant.

### **3.2.5.3 Příprava extraktů acetonovou extrakcí**

Alternativou přípravy vzorků pro SDS-PAGE bylo využití metody extrakce proteinů acetonem. Nejprve bylo naváženo 500 mg rostlinného materiálu. V třecí misce s kapalným dusíkem byl materiál rozetřen na prach a přenesen do mikrozkuhavky. Pak následoval přidavek 1,5 ml čistého acetonu, vortexování vzorku po dobu 5 min a inkubace 7 minut při laboratorní teplotě. Vzorek byl poté centrifugován 3 min při 12 000 g a 4°C. Po odstranění supernatantu bylo opět přidáno 1,5 ml čistého acetonu, vzorek byl vortexován po dobu 5 min a 7 minut inkubován při laboratorní teplotě. Extrakt byl znovu centrifugován 3 min při 12 000 g a 4°C. K peletu bylo posléze přidáno 1,5 ml 50% acetonu, extrakt byl vortexován 5 min a po 7 minutách inkubace za laboratorní teploty byl znovu centrifugován 3 min při 12 000 g a 4°C. K získanému peletu bylo následně pipetováno 250 ml extrakčního pufru (50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7,5; 0,2% Triton X-100 a 1% SDS), ke kterému bylo těsně před použitím přidáno PMSF (výsledná koncentrace 1 mol·l<sup>-1</sup>). Po 5 min vortexování a 7 minutách inkubace za laboratorní teploty následovala centrifugace po dobu 3 min při 12 000 g a 4°C. K přípravě vzorků byl dále využit supernatant.

### **3.2.5.4 Příprava vzorků pro SDS-PAGE**

Supernatanty i kontrolní vzorek byly smíchány s Laemmliho vzorkovacím pufrům v poměru 3:1 (vzorek : pufr) a po vložení do termobloku 5 min inkubovány při 100°C. Po ochlazení byly vzorky nanášeny do jamek. Standardy molekulové hmotnosti byly nanášeny bez předchozí inkubace při 100°C.

### 3.2.6 Western blot, imunochemická detekce

Proteiny separované metodou SDS-PAGE byly následně přeneseny na nitroceluloseovou membránu metodou Western blot v provedení Semi-dry blotting. K transferu bylo využito zařízení Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, USA), které bylo při současném blotování čtyř gelů připojeno ke zdroji nastaveném na konstantní proud 150 mA, doba transferu byla 2 h. Uspořádání materiálu v zařízení: anoda - dva blotovací (filtrační) papíry - nitroceluloseová membrána - gel - dva blotovací (filtrační) papíry - katoda. Blotovací papíry spolu s membránami byly před použitím inkubovány 10 min v blotovacím pufru. Pro ověření úspěšnosti transferu byly proteiny na membráně vizualizovány barvivem Ponceau S, které lze po obarvení membrány zpětně vymýt destilovanou vodou.

Následně byla provedena klasická imunochemická detekce proteinů na membráně. Po úplném vymytí barviva byla membrána vložena na 2 h do blokovacího roztoku 5% sušeného nízkotučného mléka v TTBS. Membrána byla poté přenesena do roztoku primární protilátky s blokovacím roztokem (Tab. 4), kde byla ponechána přes noc při 4°C. Druhý den byla po odlití roztoku třikrát po 10 min promyta TTBS a dále inkubována 1 h při laboratorní teplotě v roztoku sekundární protilátky značené alkalickou fosfatase s blokovacím roztokem (Tab. 4). Následovalo opětovné trojnásobné promytí v TTBS v 10 min intervalech a inkubace 5-10 min v roztoku chromogenního substrátu NBT-BCIP odpovídajícím zvolenému typu sekundární protilátky, čímž bylo dosaženo tmavě fialového zbarvení v místě produktu. Posléze byla membrána omyta destilovanou vodou a vysušena. Fotodokumentace spolu s hodnocením byla provedena zařízením Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad,USA) za použití programu Image Lab 4.1(Bio-Rad,USA).

Bylo také testováno použití 3% želatiny v TTBS jako blokovacího roztoku místo 5% nízkotučného sušeného mléka v TTBS celý postup dále zůstal zachován a to včetně použití blokovacího roztoku v případě protilátek.



Tab. 4 Použité primární a sekundární protilátky.

Detekové proteiny	Typ protilátky		Ředění
GSNOR	Primární	Polyklonální králičí protilátka anti-AtGSNOR	1:1000
		Polyklonální králičí protilátka anti-SIGSNOR	1:1000
	Sekundární	Anti-králičí protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfatasou	1:5000
Nitrované proteiny	Primární	Monoklonální myší protilátka anti- NO <sub>2</sub> -Tyr.	1:1000
	Sekundární	Anti-myší protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfatasou	1:5000

### 3.2.6.1 Roztoky a pufrы pro Western blot a imunodetekci

Blokovací roztok: 5% nízkotučné sušené mléko v TTBS, 3% želatina v TTBS.

Blotovací pufr: 25 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8,3; 192 mmol·l<sup>-1</sup> glycin, 20% methanol.

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

TBS: 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 7,5; 500 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl.

TTBS: 0,1% Tween v TBS.

### 3.2.7 Histochemická detekce aktivity GSNOR

Principem detekce aktivity GSNOR histochemickou metodou je GSNOR katalyzovaná oxidace HMGS<sub>2</sub>H (spontánně tvořeného aduktu formaldehydu a glutathionu) na S-formylglutathion za současné redukce NAD<sup>+</sup> na NADH, které posléze redukuje nitrotetrazoliovou modř na modrý precipitát formazanu. Schéma klíčové reakce viz Obr. 4 (reakce A).

#### 3.2.7.1 Příprava rostlinného materiálu - listové disky

K experimentu byly použity listové disky o průměru 12 mm připravené pomocí korkovrtu z pravých (místo aplikace) a levých (vedle místa aplikace) polovin pátých listů modelových rostlin. Využity byly tabákové rostliny, do jejichž pravé poloviny pátého listu byl tlakovou injekcí aplikován kryptogein X24 o koncentraci 100 nmol·l<sup>-1</sup> spolu s donorem NO (0,1 mmol·l<sup>-1</sup> GSNO), lapačem NO (0,1 mmol·l<sup>-1</sup> cPTIO) nebo inhibítorem GSNOR (1 μmol·l<sup>-1</sup> N6022). Látky byly aplikovány i samostatně. Destilovaná voda aplikována do pravé poloviny pátého listu sloužila jako kontrola. Byly připraveny i kontrolní vzorky z pátých listů rostlin bez jakéhokoliv ošetření. Časové intervaly odběrů, které byly zvoleny na základě výsledků spektrofotometrického stanovení aktivity GSNOR, byly 4 h po aplikaci (kryptogein X24, destilovaná voda)

a 24 h po aplikaci (GSNO, cPTIO, inhibitor N6022, jejich kombinace s X24, destilovaná voda).

### 3.2.7.2 Metodika histochemické detekce GSNOR

Do skleněných vialek obsahujících 3-4 listové disky byly přidány 2 ml vždy čerstvě připraveného roztoku (0,1% Triton X-100, 9 mmol·l<sup>-1</sup> pyruvát sodný, 0,02 mg·ml<sup>-1</sup> PMS a 0,2 mg·ml<sup>-1</sup> NBT ve 100 nmol·l<sup>-1</sup> fosforečnanu sodném o pH 7,5). Dále byly do jednotlivých vialek postupně pipetovány další složky inkubační směsi: 20 µl 60 mmol·l<sup>-1</sup> NAD<sup>+</sup> (finální koncentrace 0,6 mmol·l<sup>-1</sup>), 20 µl 20x zředěného zásobního roztoku formaldehydu připraveného z paraformaldehydu (finální koncentrace 5 mmol·l<sup>-1</sup>), 20 µl 100 mmol·l<sup>-1</sup> GSH (finální koncentrace 1 mmol·l<sup>-1</sup>). Spontánně vytvořený substrát HMGSH měl výslednou koncentraci 0,73 mmol·l<sup>-1</sup>. Dále byly připraveny kontrolní vzorky neobsahující kompletní inkubační směs, postrádaly buď NAD<sup>+</sup>, formaldehyd nebo GSH či všechny tyto tři složky najednou. Vialky překryté alobalem (ochrana před světlem) byly umístěny na 15 min do exsikátoru napojeného na zdroj vakua. Poté byly vialky s disky (stále chráněné před světlem) 100 min inkubovány při 42°C.

Reakční roztok byl následně odstraněn a disky ve vialkách se po promytí 70% ethanolem nechaly přes noc odbarvovat v 70% ethanolu. Druhý den po záměně za čerstvý 70% ethanol byly vialky pro odbarvení listových disků zahřívány na elektromagnetické míchačce s ohřevem. Aby bylo dosaženo úplného odstranění chlorofylu byl 70% ethanol za stálého zahřívání následně ještě 2x nahrazen 96% ethanolem.

Bezbarvé disky (mimo místa tvorby modře zbarveného formazánu) byly umístěny do glycerolu, pozorovány pod stereoskopickým mikroskopem STM PRO (BEL Engineering, Itálie) i pod světelným a zároveň fluorescenčním mikroskopem Olympus BX50 s digitální kamerou Olympus DP70 (Olympus Optical, Japonsko).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Vliv aplikace elicitinů do listů *N. tabacum* cv. Samsung

Prvním úkolem experimentální části diplomové práce bylo studium úlohy GSNOR v obranné reakci modelové rostliny (*N. tabacum* cv. Samsung) aktivované aplikací elicitinů. Patogenní proteiny oligandrin, kryptogein X24 a jeho mutantní formy L41F a V84F byly vybrány na základě svých specifických vlastností prezentovaných v odborné literatuře, jako je rozdílná indukce hypersenzitivní reakce a tvorby ROS a RNS a s tím související nekrotické projevy (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999; Picard *et al.*, 2000; Dokládal *et al.*, 2012).

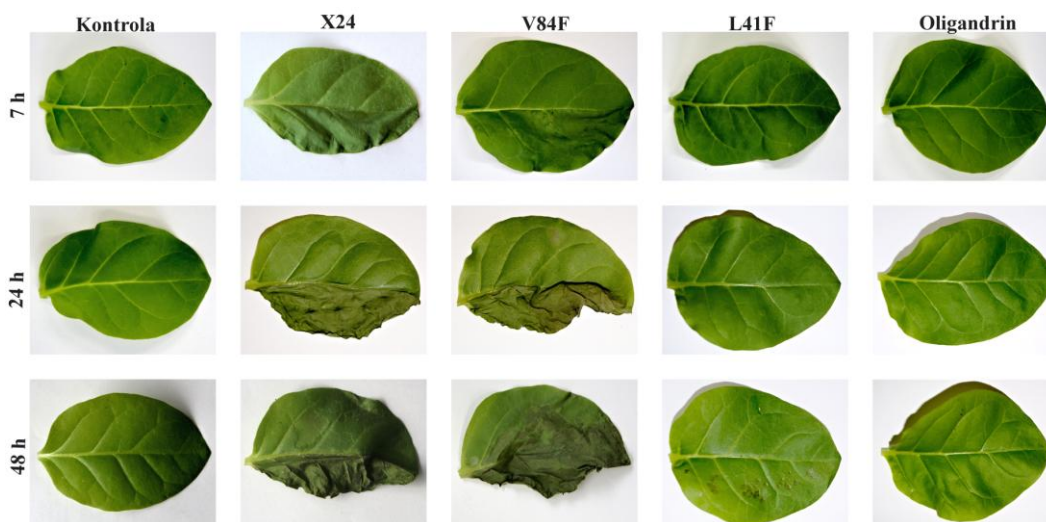
Ve zvolených časových intervalech po aplikaci elicitinů byla v obou polovinách pátých listů modelových rostlin sledována aktivace a rozvoj obranné reakce projevující se nekrotickými odezvami na pletivech listů, dále byly sledovány změny v aktivitě a hladině studovaného enzymu GSNOR a vliv na intenzitu nitrace proteinů.

#### 4.1.1 Vliv aplikace elicitinů na pletiva listů *N. tabacum* cv. Samsung

U pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung, do jejichž pravých polovin byly tlakovou injekcí aplikovány elicitiny oligandrin, kryptogein X24 a jeho mutantní formy L41F nebo V84F, byl sledován vliv na aktivaci a rozvoj hypersenzitivní reakce modelové rostliny spojené s nekrosou listů v časových intervalech 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 a 48 h po zahájení experimentu. Fyziologické projevy reakce rostliny po aplikaci elicitinů byly pozorovány nejdříve v čase 7 h po ošetření rostlin (Obr. 18). Jako kontrola sloužily rostliny, kterým byla do pravých polovin pátých listů aplikována destilovaná voda. U kontrolních vzorků nebyly pozorovány změny ve struktuře pletiv ani po 48 h, čímž byl vyloučeno ovlivnění výsledků v důsledku mechanického poškození. Pozorování bylo provedeno v pěti opakováních.

U rostlin ošetřených kryptogeinem X24, proteinem produkovaným fytopatogenní oomycetou *P. cryptogea*, bylo pozorováno vadnutí pravé poloviny listu 7 h po aplikaci (Obr. 18). Po 24 h ošetřená pravá polovina listu (místo aplikace) začala znatelně sesychat a po 48 h po ošetření byla zcela seschlá, navíc byly pozorovány slabé náznaky vadnutí i v krajové oblasti levé poloviny listu. Mutantní forma kryptogeinu V84F vykazovala výraznější nekrotickou aktivitou než kryptogein X24. V porovnání s kryptogeinem X24 byla již 24 h po aplikaci pozorována tvorba lokální nekrosy i v levé polovině listu spolu s vadnutím listu a po 48 h docházelo k úplnému seschnutí pravé poloviny listu a výraznému vadnutí levé poloviny listu způsobené silným poškozením

pletiva v důsledku nekrotické aktivity. V případě aplikace mutantní formy kryptogeinu L41F se začaly objevovat drobné nekrotické skvrny v pravé polovině listu v okolí místa vpichu až po 48 h. Pro fytopatogen *Pythium oligandrum*, produkující elicitin oligandrin, je přirozenou hostitelskou rostlinou *Solanum* spp.. Tento patogenní protein po aplikaci na listy rostliny *N. tabacum* nevyvolal hypersenzitivní reakci spojenou s nekrotickou aktivitou ani 48 h po jeho aplikaci (Obr. 18).

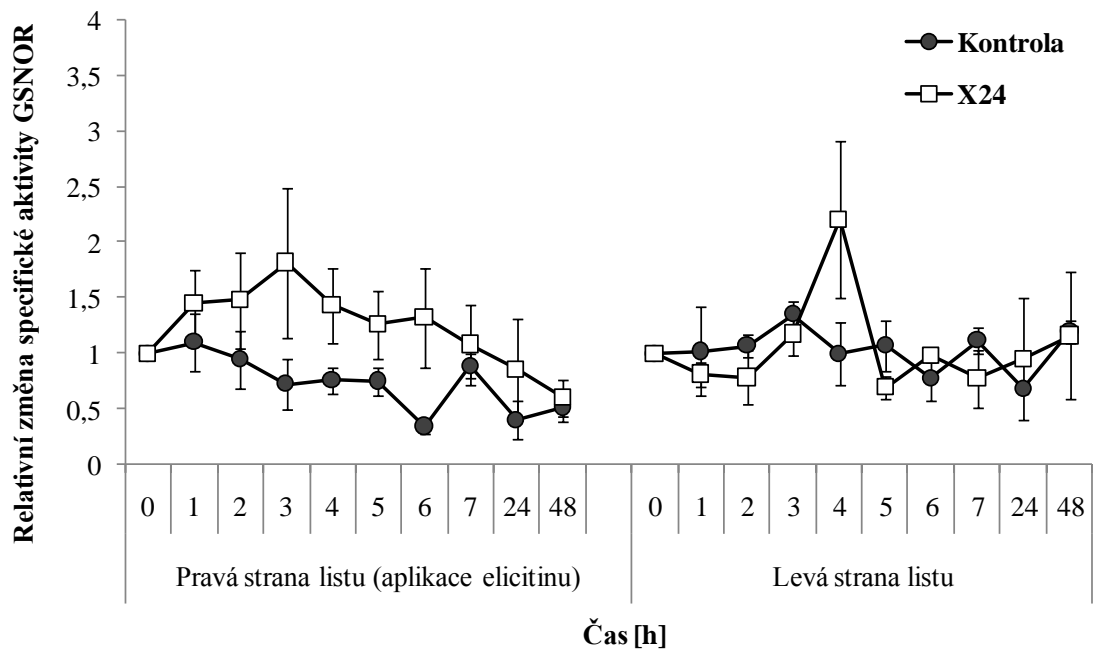


Obr. 18 Srovnání vlivu aplikace elicitinů na pletiva listů *N. tabacum* cv. Samsung. Páté listy 7, 24 a 48 h po aplikaci destilované vody (kontrola), kryptogeinu X24 a jeho mutantních forem V84F, L41F nebo oligandrinu do pravých polovin listů.

#### 4.1.2 Vliv aplikace elicitinů na aktivitu *S*-nitrosoglutathionreduktasy

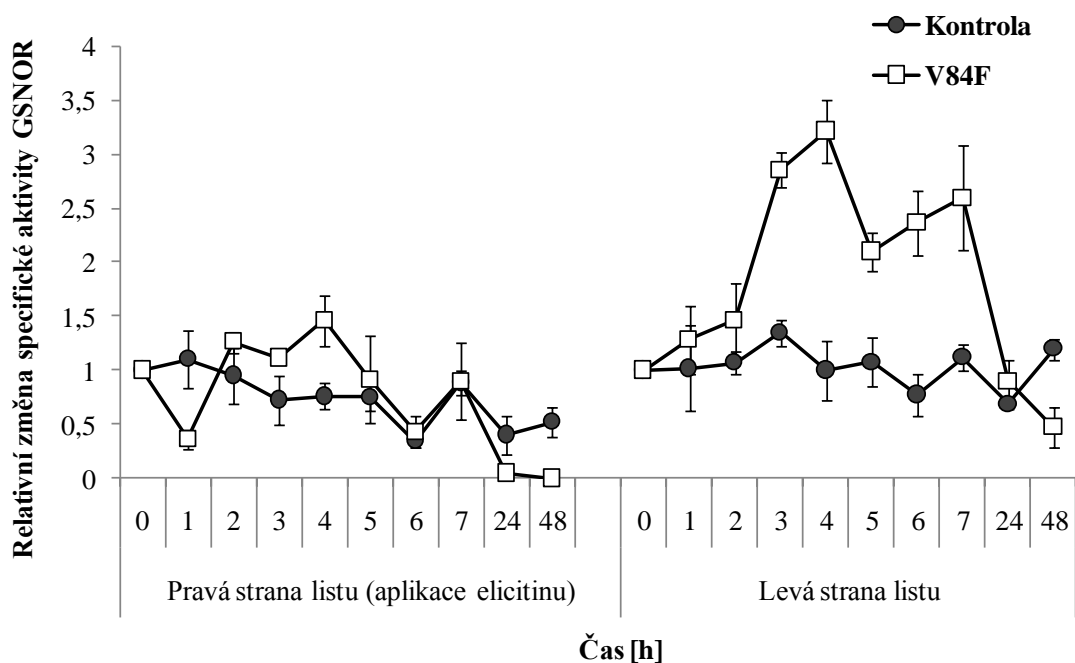
Po aplikaci elicitinů oligandrinu nebo kryptogeinu X24 a jeho mutantních forem V84F, L41F do pravých polovin pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung byly sledovány změny v aktivitě enzymu GSNOR v pravých polovinách listů (místo aplikace) i levých polovinách listů (vedle místa aplikace) a to 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 a 48 h po injekci elicitinů. Kontrolním vzorkem pro vyloučení vlivu mechanického poškození byly opět rostliny ošetřené pouze destilovanou vodou.

Po aplikaci kryptogeinu X24 byl v pravých polovinách listů zaznamenán nárůst specifické aktivity GSNOR, přičemž nejvyšších hodnot bylo dosaženo 3 h po aplikaci elicitinu (Obr. 19). V levých polovinách byly zaznamenány změny ve specifické aktivitě pouze 4 h po zahájení experimentu.



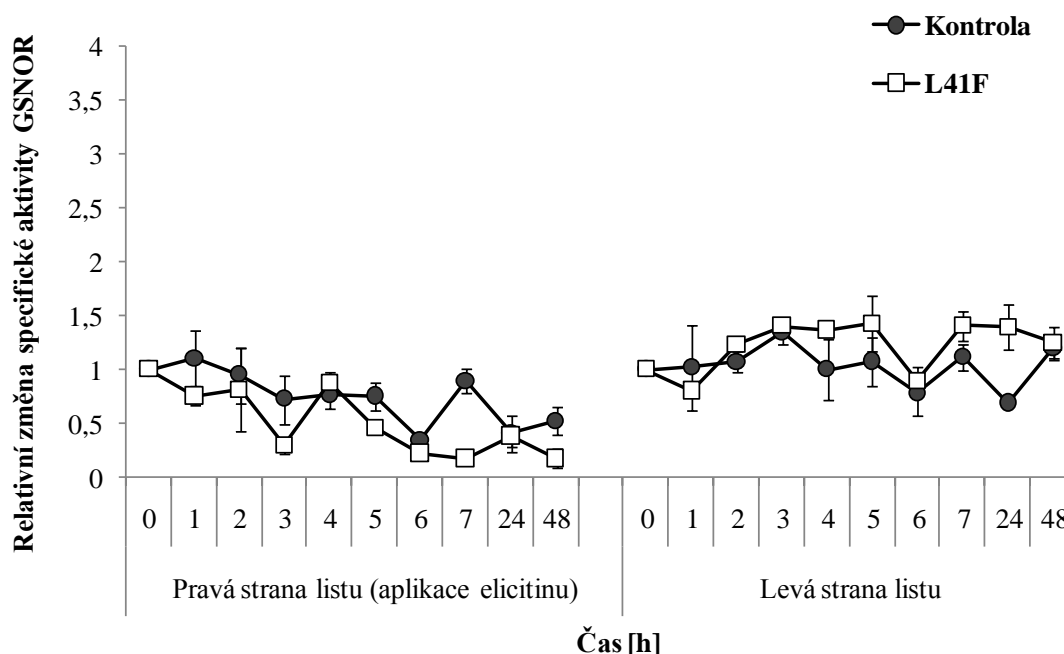
Obr. 19 Srovnání relativních změn specifické aktivity GSNOR po aplikaci elicitinu kryptogeinu X24 nebo destilované vody (kontrola) v pravých (místo aplikace elicitinů) a levých polovinách pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung.

Aplikace mutantního kryptogeinu V84F vyvolala v pravých polovinách listů zvýšení specifické aktivity GSNOR 2-4 h po aplikaci elicitinu (Obr. 20). V levých polovinách bylo zaznamenáno významné navýšení specifické aktivity GSNOR především mezi 3. a 7. h s maximem 4 h po aplikaci elicitinů do pravé části listu (zvýšení specifické aktivity cca 3x).



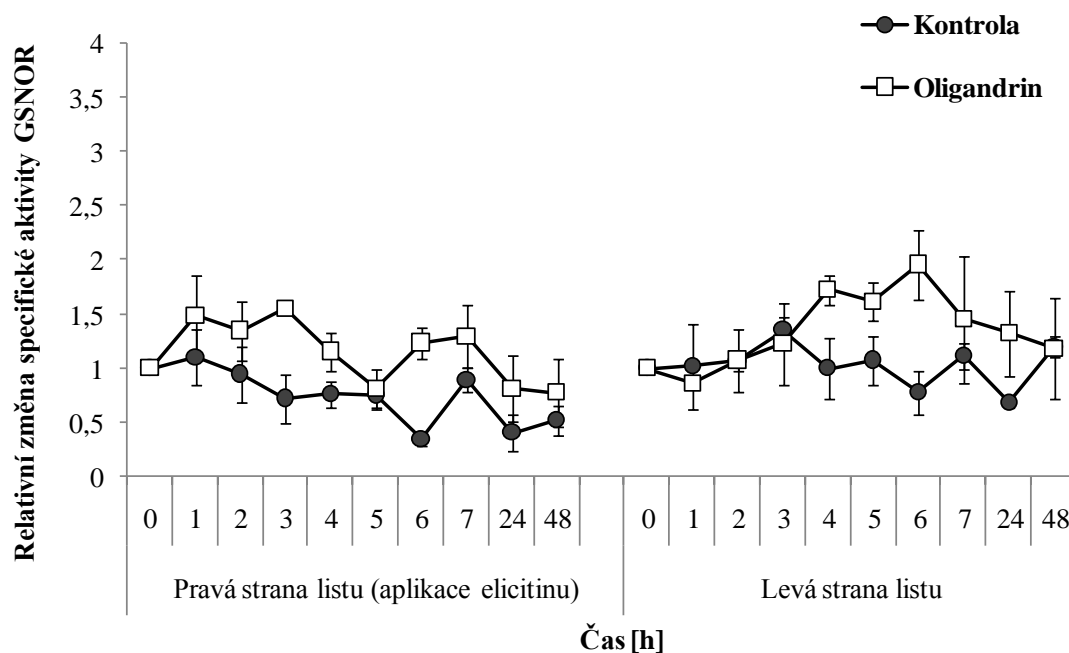
Obr. 20 Srovnání relativních změn specifické aktivity GSNOR po aplikaci mutantní formy kryptogeinu V84F nebo destilované vody (kontrola) v pravých (místo aplikace elicitinů) a levých polovinách pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung.

Mutant L41F, který je nejméně účinný v indukci obranné reakce v porovnání s ostatními použitými kryptogeiny, měl minimální vliv na aktivitu GSNOR (Obr. 21). V pravé části listu byla detekována lehce snížená specifická aktivita GSNOR a v levé části listu byla naopak pozorována mírně zvýšená aktivita GSNOR v porovnání s kontrolou.



Obr. 21 Srovnání relativních změn specifické aktivity GSNOR po aplikaci mutantní formy kryptogeinu L41F nebo destilované vody (kontrola) v pravých (místo aplikace elicitinů) a levých polovinách pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung.

V pravých polovinách rostlin ošetřených oligandrinem, byl zaznamenán podobný trend v aktivitě jako v případě pravých polovin listů rostlin ošetřených kryptogeinem X24 (Obr. 22). V levé části listu bylo pozorováno zvýšení aktivity mezi 4.-7. h (s maximem 6 h po aplikaci oligandrinu).



Obr. 22 Srovnání relativních změn specifické aktivity GSNOR po aplikaci elicitinu oligandrinu nebo destilované vody (kontrola) v pravých (místo aplikace elicitinů) a levých polovinách pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung.

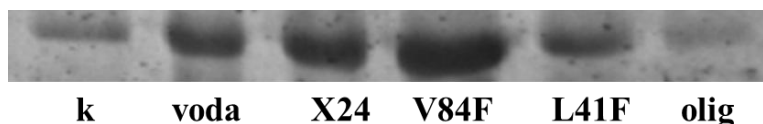
#### 4.1.3 Western blot detekce změn hladiny *S*-nitrosoglutathionreduktasy po aplikaci elicitinů

Po elektroforetické separaci proteinů byl metodou Western blot detekován enzym GSNOR v levých polovinách (vedle místa aplikace) pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung. Hladina GSNOR byla modulována aplikací elicitinů oligandrinu nebo kryptogeinu X24 či jeho mutantními formami V84F a L41F. Změny byly sledovány 2, 4 a 24 h po aplikaci. Tyto časy po aplikaci byly zvoleny na základě hodnot získaných stanovením aktivity GSNOR v listech ošetřených elicitinem. Do kontrolních vzorků byla místo elicitinů aplikována destilovaná voda. Druhý kontrolní vzorek byl připraven z modelové rostliny bez jakéhokoliv ošetření. Standardem byl rekombinantní protein GSNOR z *L. sativa* o koncentraci  $0,75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Experiment byl proveden ve trojím opakování. V rámci pilotních experimentů byly testovány dvě primární protilátky polyklonální králičí protilátka anti-SIGSNOR a polyklonální králičí protilátka anti-AtGSNOR. První uvedená protilátka s GSNOR vyextrahovanou z listů *N. tabacum* nereagovala. Pro detekci GSNOR byla používána dále pouze primární protilátka anti-AtGSNOR. Dále bylo testováno použití dvou blokačních roztoků - 3% želatina nebo 5% nízkotučné sušené mléko v TTBS. Na základě testovacích experimentů bylo pro další experimenty jako blokační činidlo použito pouze 5% nízkotučné sušené mléko v TTBS. Z časových důvodů se v rámci diplomové práce nepodařilo zcela optimalizovat

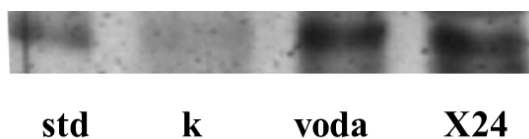
tuto metodu detekce hladiny enzymu GSNOR původem z *N. tabacum*. Uvedené jsou tedy jen předběžné výsledky, které musí být po určení optimálních podmínek metody dále ověřeny.

Ve 4. h v porovnání s kontrolou (aplikace destilované vody) byl detekován intenzivnější band GSNOR v extraktech připravených z levé části listu po aplikaci kryptogeinu X24 a mutantní formy kryptogeinu V84F do pravé části listu. Nejsilnější signál v levých polovinách listů byl detekován po aplikaci mutantní formy kryptogeinu V84F (Obr. 23a). Intenzita bandu po aplikaci destilované vody v porovnání s listy neošetřenými je výrazně větší. Na Obr. 23b je uveden standard rekombinantní protein GSNOR z *L. sativa*. 24 h po aplikaci látek nebyl pozorován rozdíl mezi kontrolou (aplikace destilované vody) a vzorkem po aplikaci kryptogeinu.

a)



b)



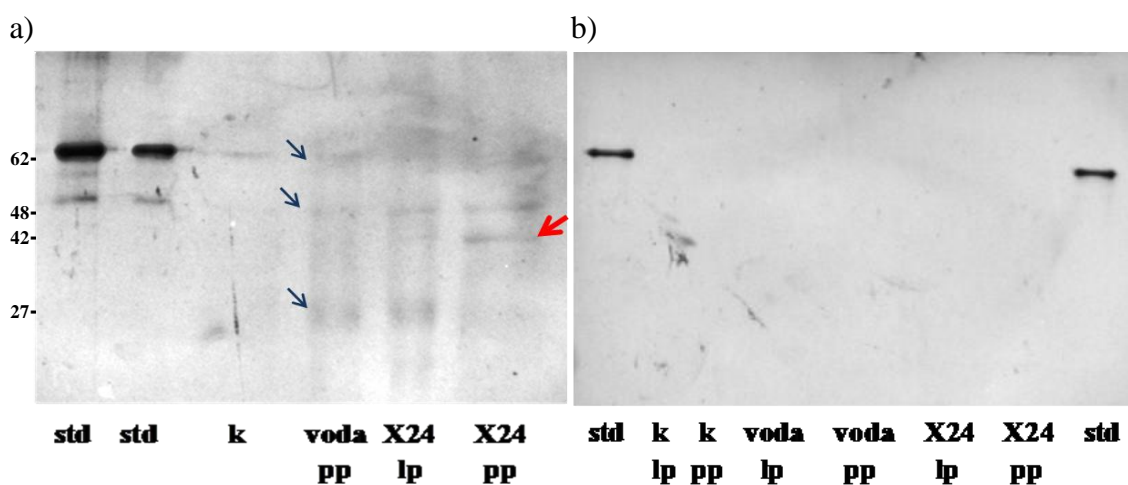
Obr. 23 Western blot detekce hladiny enzymu GSNOR v levých polovinách pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung 4 h (a), 24 h (b) po aplikaci látky do pravé poloviny listu. Modulace hladiny enzymu GSNOR byla provedena aplikací látek: destilovaná voda, elicitiny - oligandrin, kryptogein X24 a jeho mutantů V84F, L41F. Vysvětlivky: (std) standard - rekombinantní protein GSNOR z *L. sativa*, (k) kontrolní vzorek 1 - list bez ošetření, (voda) kontrolní vzorek 2 - list po aplikaci destilované vody, (X24) vzorek - list po aplikaci kryptogeinu X24, (V84F) vzorek - list po aplikaci mutantního kryptogeinu V84F, (L41F) vzorek - list po aplikaci mutantního kryptogeinu L41F, (olig) vzorek - list po aplikaci oligandrinu.

#### 4.1.4 Western blot detekce změn intenzity nitrace proteinů po aplikaci elicitinů

Metodou Western blot s následnou imunodetekcí byla provedena detekce změn intenzity nitrace proteinů 4 h po aplikaci kryptogeinu X24 v pravé (místo aplikace) i levé polovině pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung. Jako kontrolní vzorky byly použity pravé poloviny pátých listů modelové rostliny bez jakéhokoliv ošetření nebo po aplikaci destilované vody. Standardem byl NO<sub>2</sub>-BSA o koncentraci 0,1 - 0,5 μg·ml<sup>-1</sup> (Obr. 24).



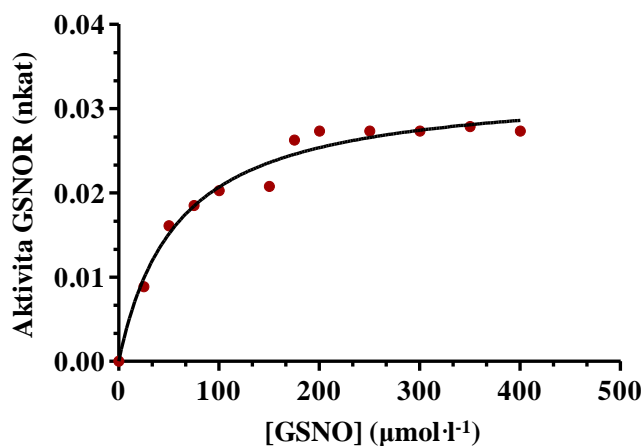
Pro detekci nitrovaných proteinů byla použita primární monoklonální myší protilátka anti-NO<sub>2</sub>-Tyr, sekundární anti-myší protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfatasou). Byly testovány vzorky připravené extrakcí do pufru (50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7,5; 0,2% Triton X-100, 1 mol·l<sup>-1</sup> PMSF) a acetonovou extrakcí (Obr. 24b). Po detekci s využitím protilátky proti nitrovaným proteinům (nitrovaný tyrozin) byly zaznamenány bandy pouze v případě vzorků připravených extrakcí puftrem Tris/HCl (Obr. 24a), jelikož se acetonová extrakce nezadařila a množství proteinů bylo nedetekovatelné. V následujících experimentech lze tuto metodu znovu vyzkoušet a případně optimalizovat, pokud by to bylo nutné. V místě aplikace kryptogeinu byl u vzorků připravených extrakcí puftrem Tris/HCl detekován rozdíl od kontrolních vzorků nitrovaný protein o molekulové hmotnosti 42 kDa (Obr. 24a). V rámci diplomové práce se z časových důvodů už nepodařilo optimalizovat metodu Western blot pro detekci nitrovaných proteinů v extraktech z listů tabáku. Na základě konzultace v rámci zahraničních stáží na pracovišti v Mnichově byly navrženy modifikace metody – týkající se doby inkubace s primární protilátkou a intenzity promývacích kroků.



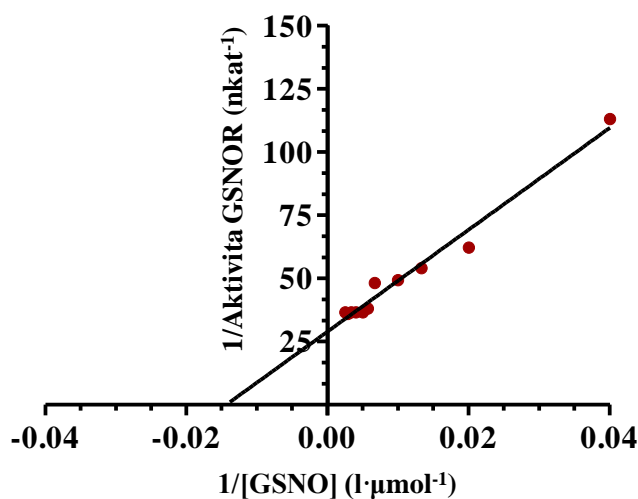
Obr. 24 Western blot - detekce změn intenzity nitrace proteinů. 4 h po aplikaci vody nebo kryptogeinu X24 do pravé poloviny pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung. a) extrakce 50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7,5; 0,2% Triton X-100, 1 mol·l<sup>-1</sup> PMSF b) acetonová extrakce. Vlevo jsou vyznačeny molekulové hmotnosti detekovaných proteinů. Vysvětlivky: (std) standard - NO<sub>2</sub>-BSA 0,5 μg·ml<sup>-1</sup> a 0,3 μg·ml<sup>-1</sup> (Obr 23a), 0,1 μg·ml<sup>-1</sup> (Obr 23b), (k) kontrolní vzorek 1 - list bez ošetření, (voda) kontrolní vzorek 2 - list po aplikaci destilované vody, (X24) vzorek - list po aplikaci kryptogeinu, (lp) levá část listu, (pp) pravá část listu.

## 4.2 Stanovení kinetických parametrů S-nitrosoglutathionreduktázy

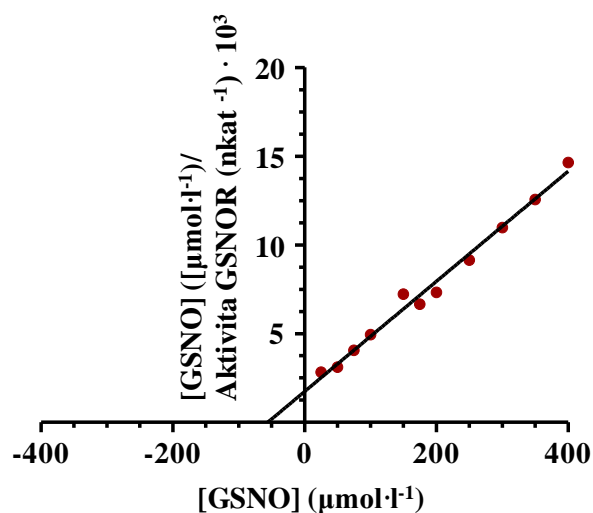
K experimentálnímu stanovení Michaelisovy konstanty a limitní rychlosti byl použit extrakt ze smíšeného vzorku 5., 6. a 7. listů tří 8-9 týdnů starých rostlin *N. tabacum* cv. Samsung. Rozmezí koncentrací substrátu v kyvetě bylo 25-400  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Naměřené hodnoty byly graficky hodoceny dle saturační křivky Michaelise a Mentenové (Obr. 25), Lineweavera a Burka (Obr. 26) a Hanese a Woolfa (Obr. 27). Výsledky byly poté porovnány v Tab. 5.



Obr. 25 Grafické znázornění naměřených hodnot dle Michaelise a Mentenové. Vyjadřuje závislost aktivity GSNOR na koncentraci substrátu GSNO.



Obr. 26 Grafické znázornění naměřených hodnot dle Lineweavera a Burka. Vyjadřuje závislost reciproké aktivity GSNOR na reciproké koncentraci substrátu GSNO.



Obr. 27 Grafické znázornění naměřených hodnot dle Hanesa a Woolfa. Vyjadřuje závislost podílu koncentrace substrátu GSNO a aktivity GSNOR na koncentraci substrátu GSNO.

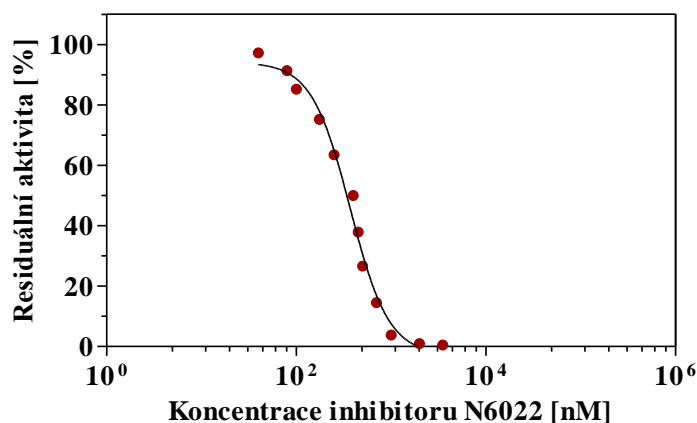
Tab. 5 Srovnání výsledných hodnot  $K_m$  a  $V_{lim}$

Grafické znázornění	$K_m$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$V_{lim}$ (nkat)
Michaelis a Mentenová	54,61	0,0323
Lineweaver a Burk	51,10	0,0317
Hanes a Woolf	51,09	0,0318

Michaelisova konstanta byla stanovena z průměru dat uvedených v Tab. 5 na  $52,27 \pm 1,66 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a limitní rychlost, která byla stanovena tímto způsobem na  $0,0319 \pm 0,0026$  nkat.

### 4.3 Stanovení hodnoty $IC_{50}$

Pro stanovení hodnoty  $IC_{50}$  byl připraven extrakt ze směsného vzorku 5., 6. a 7. listů tří 8-9 týdenních rostlin *N. tabacum* cv. Samsung. Rozmezí koncentrací inhibitoru GSNOR N6022 bylo  $40\text{-}3500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Naměřené hodnoty byly zaneseny do grafu a pomocí programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) byla stanovena hodnota  $IC_{50}$  na  $371,2 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 28).



Obr. 28 Inhibiční křivka. Grafické znázornění závislosti residuální aktivity GSNOR na koncentraci inhibitoru GSNOR N6022

#### 4.4 Vliv aplikace modulátorů do listů *N. tabacum* cv. Samsung

Dalším úkolem experimentální části předkládané práce bylo prověření vlivu látek modulujících hladinu RNS na účinek elicitinů v listech *N. tabacum* cv. Samsung. Testovanými látkami byly cPTIO, GSNO a inhibitor N6022.

V průběhu 48 h po ošetření kryptoginem X24 a modulátory nebo jen modulátory byly v obou polovinách pátých listů rostlin tabáku sledovány změny parametrů jako je nekrotická odezva, aktivita a hladina enzymu GSNOR a také byla provedena histochemická detekce GSNOR.

##### 4.4.1 Vliv aplikace modulátorů na pletiva listů *N. tabacum* cv. Samsung

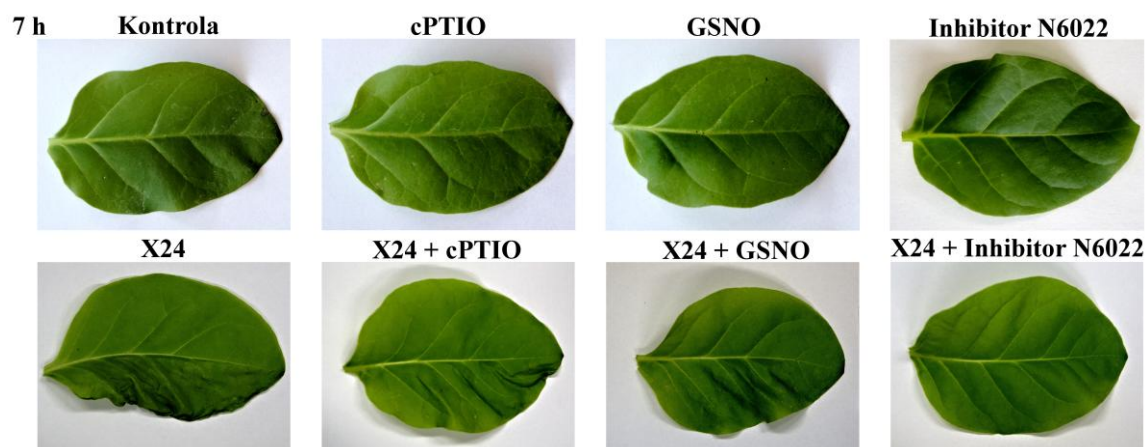
Byl sledován vliv aplikace látek modulujících hladinu RNS při současném spuštění obranné reakce vyvolané přidávkem kryptogemu X24, ale i bez přítomnosti elicitinu na aktivaci a rozvoj hypersenzitivní reakce související s nekrosou listů. Změny byly sledovány v časovém rozpětí 7, 24 a 48 h po aplikaci látek do pravých polovin pátých listů *N. tabacum*, cv Samsung (Obr. 29). Fyziologické projevy reakce rostliny byly pozorovány nejdříve v čase 7 h po ošetření rostlin. Kontrolní vzorky připravené aplikaci destilované vody opět nevykazovaly žádné změny struktury pletiv ani po 48 h, čímž se vyloučil vliv mechanického poškození. Sedm hodin po aplikaci kryptogemu byla pravá polovina listu zvadlá, po 24 h tato polovina začala sesychat, malá část levé poloviny listu projevila známky vadnutí a po 48 h byla pravá část listu seschlá, a vadnutí levé části listu bylo výraznější. Pozorování bylo provedeno ve čtyřech opakováních.

Látka cPTIO fungující jako lapač NO nezpůsobila viditelné změny struktury pletiva ani 48 h po aplikaci látky. V kombinaci s kryptogeinem X24, ale bylo už u 7 h po aplikaci pozorováno lehké vadnutí pravé poloviny listu, ve 24 h tato polovina byl již seschlá a levá polovina začla lehce vadnout srovnatelně jako v případě aplikace pouze kryptogeinu. Ve 48 h po aplikaci byl celý list (pravá i levá část) zcela seschlý, reakce byla výrazně silnější než po aplikaci pouze kryptogeinu (Obr. 29).

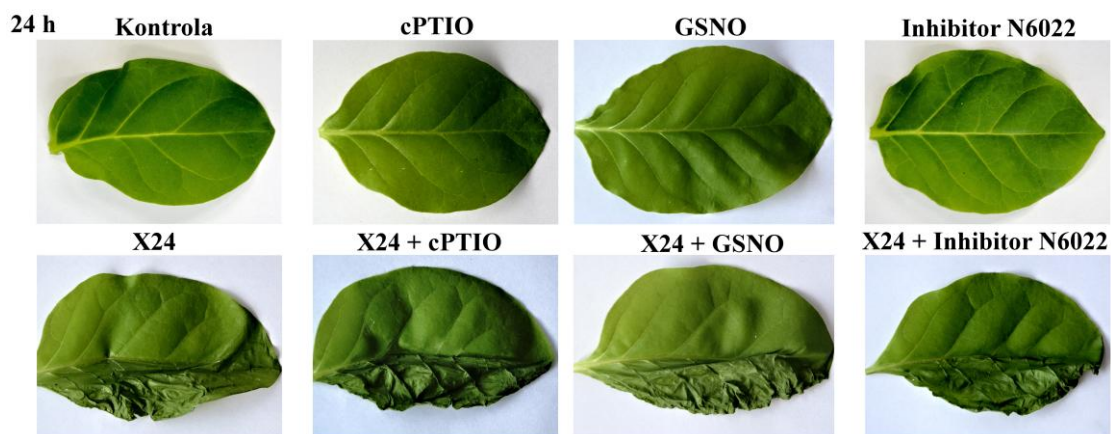
V případě aplikace GSNO, který je donorem NO, byly po 24 h detekovány v místě vpichu malé nekrotické skvrny a došlo k mírnému ovdnutí listu. Po 48 h byla v pravé části listu pozorována ztráta pigmentace, tato část listu zežloutla a povadla. Po aplikaci GSNO spolu s kryptogeinem X24 byla pozorována slabší reakce než v případě aplikace samotného kryptogeinu – což bylo pozorovatelné zejména 48 h po ošetření rostlin (Obr 29).

Inhibitor enzymu GSNOR (N6022) neindukoval hypersenzitivní reakci s nekrotickou odezvou ani 48 h po jeho aplikaci. Stejný trend se projevil i 7 h po ošetření inhibitorem s kryptogeinem X24. 24 h po aplikaci inhibitoru GSNOR v kombinaci s kryptogeinem pravá polovina listu byla téměř seschlá. Po 48 h byl účinek inhibitoru ve spojení s kryptogeinem X24 silnější než v případě aplikace pouze kryptogeinu, ale slabší než v případě aplikace kryptogeinu s lapačem NO (cPTIO) (Obr 29).

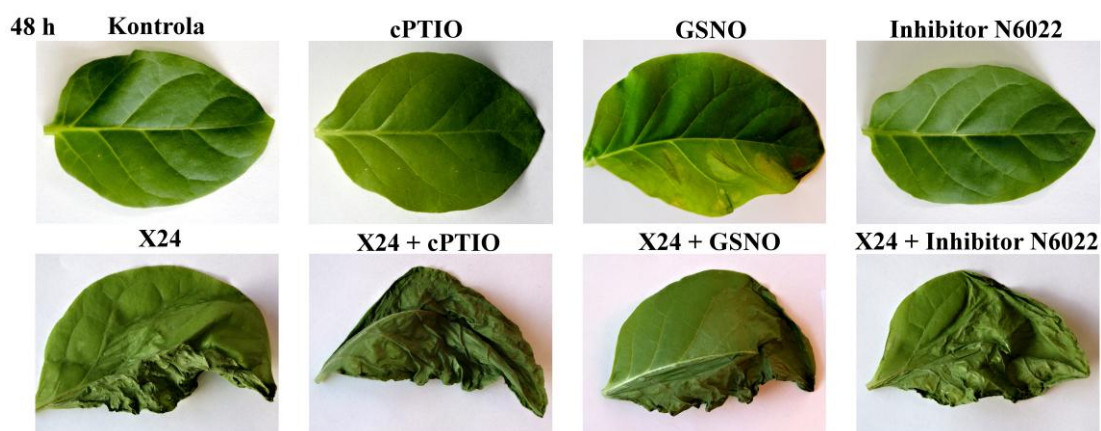
a)



b)



c)



Obr. 29 Srovnání vlivu aplikace modulátorů a současné aplikace kryptogeinu X24 s modulátory na pletiva listů. Páté listy *N. tabacum* cv. Samsung a) 7 h b) 24 h c) 48 h po aplikaci látky do pravé poloviny listu. Použité látky: destilovaná voda (kontrola), kryptogein X24, modulátory cPTIO, GSNO, inhibitor N6022, kombinace modulátorů s kryptogeinem X24.

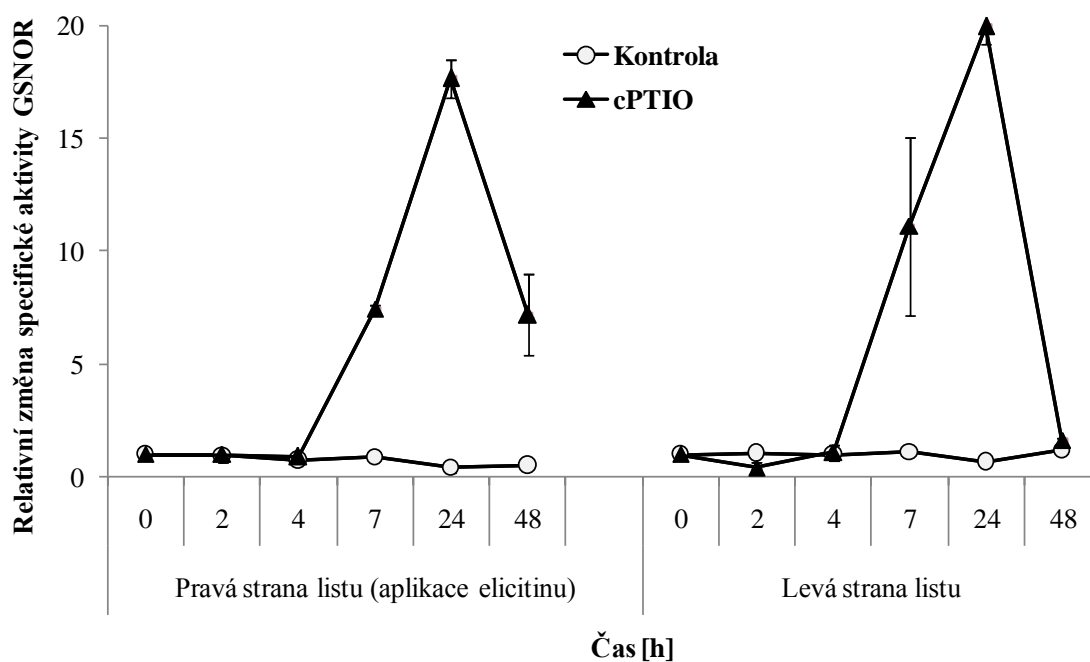
#### 4.4.2 Vliv aplikace modulátorů na aktivitu S-nitrosoglutathionreduktasy

Do pravých polovin pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung byly aplikovány modulátory hladiny RNS - cPTIO, GSNO nebo inhibitor enzymu GSNOR N6022 samostatně, ale i v kombinaci s kryptogeinem X24 a byly sledovány změny aktivity enzymu GSNOR v obou polovinách listu 0, 2, 4, 7, 24 a 48 h po injekci modulátorů. Časové intervaly byly zvoleny na základě hodnot získaných při stanovení aktivity GSNOR po aplikaci elicitinů. Kontrolním vzorkem pro vyloučení vlivu mechanického poškození byly rostliny, kterým byla do pravé poloviny pátého listu aplikována pouze destilovaná voda.

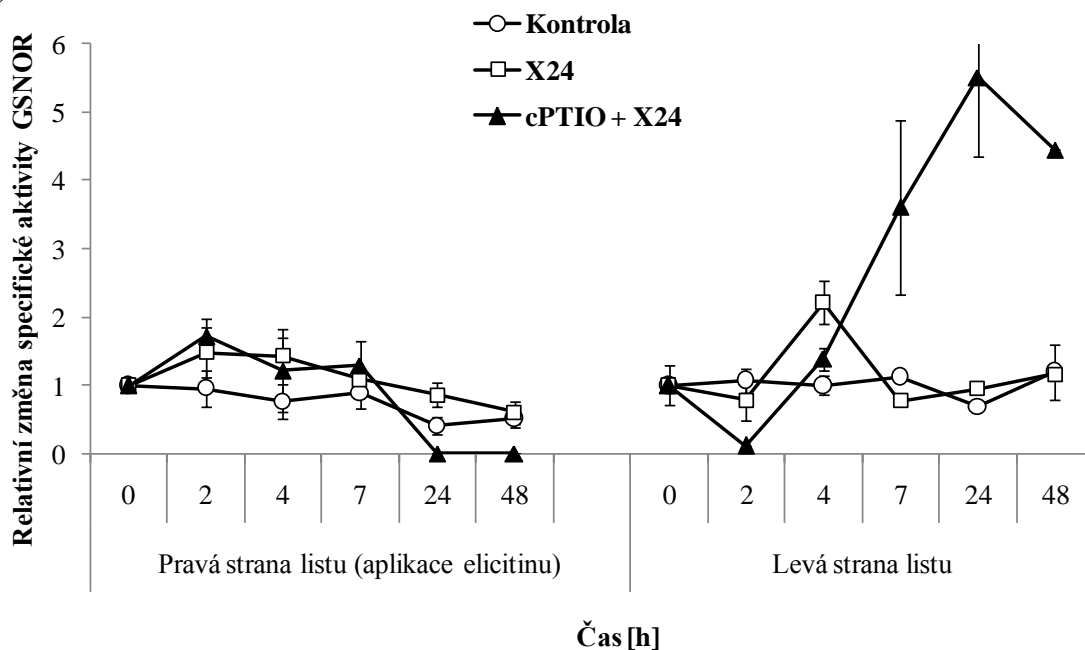
Aplikace látky cPTIO významně indukovala aktivitu GSNOR v pravé (místo aplikace) i levé části listu v časovém intervalu mezi 7. a 48. h, nejvyšších hodnot bylo dosaženo 24 h po zahájení experimentu (Obr. 30a). Změny detekované po aplikaci

kryptogeinu a cPTIO v kombinaci s kryptogeinem byly srovnatelné v časovém intervalu 0-7 h. GSNOR aktivita nebyla detekovaná ve vzorcích po aplikaci kryptogeinu a cPTIO po 24 h (Obr. 30b). V levých polovinách listů ošetřených touto kombinací látek byl pozorován významný nárůst aktivity GSNOR 7-48 h (s maximem 24 h), změny byly ale 4x nižší než v téže polovině listu po aplikaci samotného cPTIO.

a)



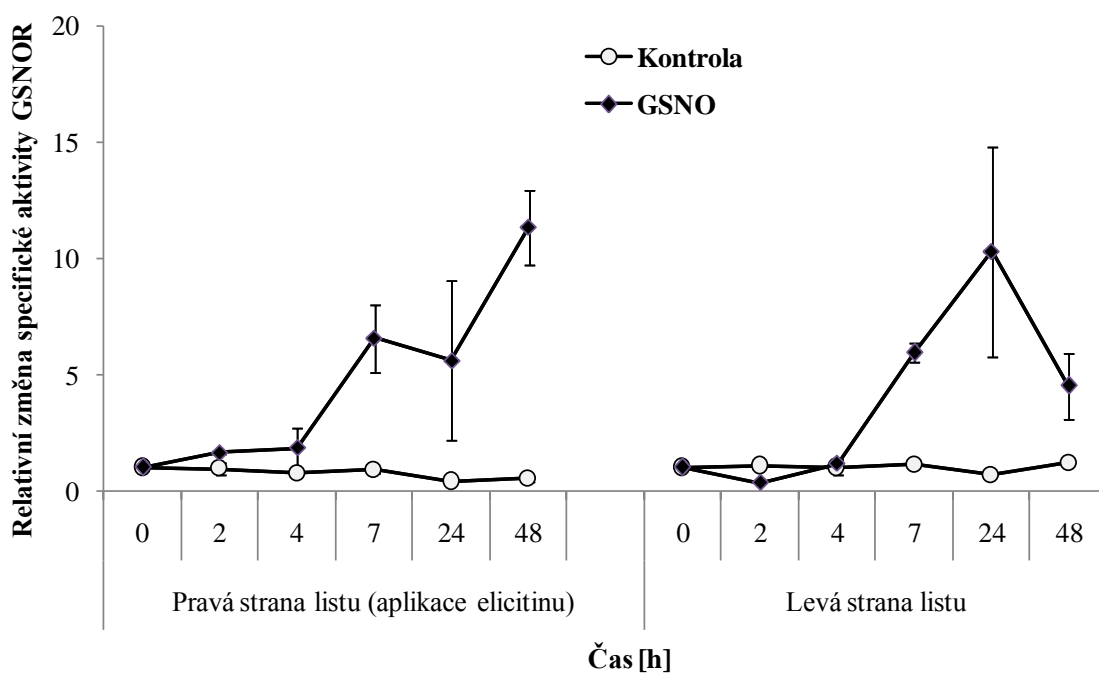
b)



Obr. 30 Srovnání relativních změn specifické aktivity GSNOR v obou polovinách pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung: a) po aplikaci látky cPTIO a destilované vody (kontrola) b) po aplikaci látky cPTIO s kryptogeinem X24, kryptogeinu X24 a destilované vody (kontrola).

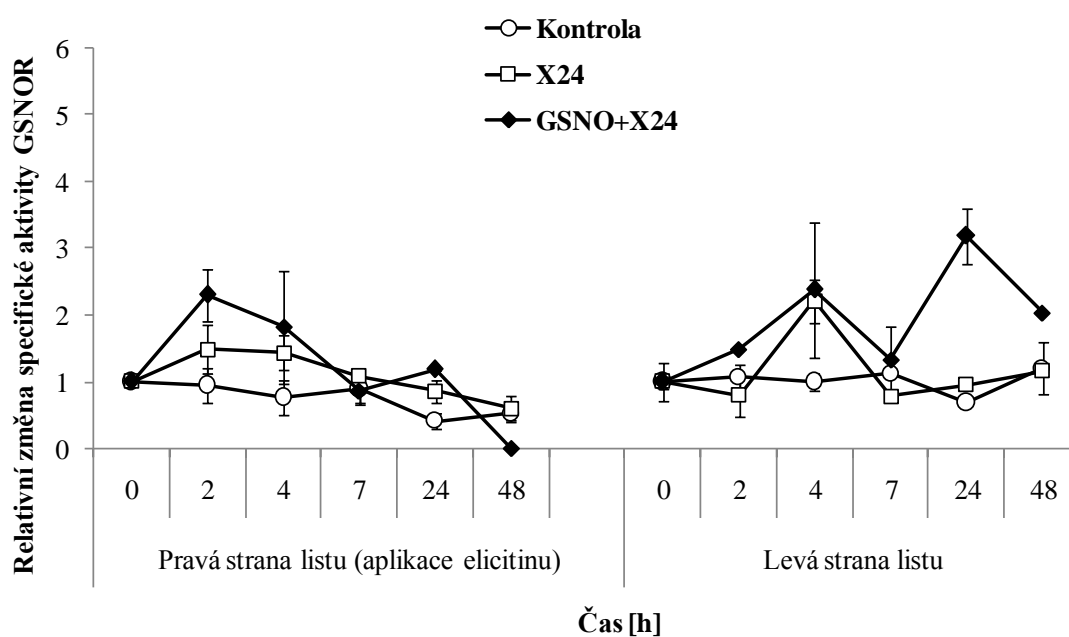
Ošetření rostlin GSNO, který je substrátem enzymu GSNOR, vyvolalo v pravých polovinách listů v porovnání s cPTIO menší, ale stále výrazný nárůst aktivity 7-48 h po aplikaci. V levých polovinách listů byl zaznamenán rovněž výrazný nárůst aktivity GSNOR. Maximální změny byly detekovány 24 h po aplikaci GSNO (Obr. 31a). Nejvyšší dosažená hodnota specifické aktivity v levých polovinách listů 24 h po aplikaci byla poloviční ve srovnání s hodnotou získanou působením modulátoru cPTIO (Obr. 30a). Indukce GSNOR aktivity byla pozorovaná první hodiny (2-7 h) po aplikaci kryptogeinu v kombinaci s GSNO, podobně jako v případě aplikace samotného kryptogeinu. Aktivita GSNOR byla v případě aplikace GSNO a kryptogeinu vyšší (maximum 2 h po aplikaci látek). Změny v aktivitě GSNOR v levé části listu jsou srovnatelné po aplikaci kryptogeinu a kryptogeinu s GSNO (Obr. 31b). V případě kombinace aplikovaných látek byla detekována zvýšená GSNOR aktivity i 24 h po aplikaci látek do pletiva. Nejvyšší dosažená hodnota specifické aktivity v levých polovinách listů 24 h po aplikaci byla asi třetinová ve srovnání s hodnotou získanou po aplikaci pouze GSNO (Obr. 31a).

a)



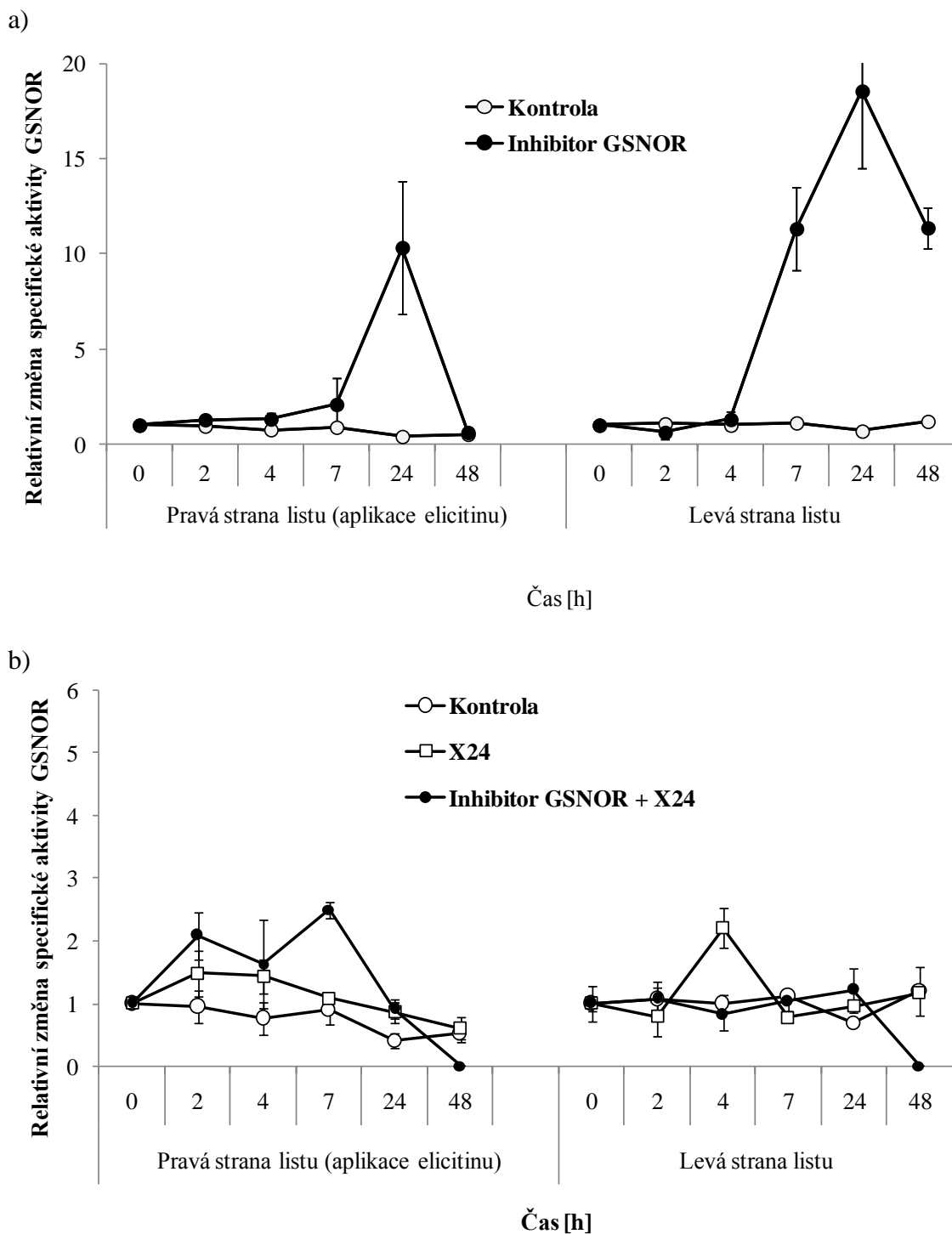


b)



Obr. 31 Srovnání relativních změn specifické aktivity GSNOR v obou polovinách pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung: a) po aplikaci GSNO a destilované vody (kontrola) b) po aplikaci látky GSNO s kryptogeinem, kryptogeinu X24 a destilované vody (kontrola).

Po aplikaci inhibitoru GSNOR (Obr. 32) bylo zaznamenáno významné zvýšení aktivity GSNOR v pravých polovinách listů pouze 24 h po aplikaci látek. V levých polovinách byl sledován významný nárůst specifické aktivity GSNOR již od 7. h s maximem ve 24. h, podobně jako v případě levé části listů po aplikaci cPTIO (Obr. 30a). Aplikace kombinace inhibitoru společně s kryptogeinem X24 indukovala GSNOR aktivitu 2 a 7 h po aplikaci do pravé části listů. Aktivita byla vyšší v porovnání s hodnotami naměřenými po aplikaci pouze kryptogeinu. V levé části nebyla po aplikaci kombinace látek inhibitor a kryptogein zaznamenána změna v aktivitě GSNOR v porovnání s kontrolou (Obr. 32b).

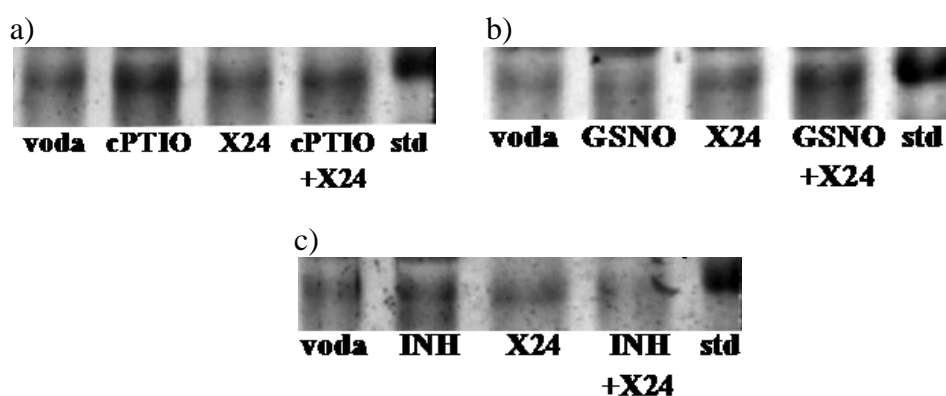


Obr. 32 Srovnání relativních změn specifické aktivity GSNOR v obou polovinách pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung: a) po aplikaci inhibitoru N6022 a destilované vody (kontrola) b) po aplikaci látky inhibitoru N6022 s kryptogeinem, kryptogeinu X24 a destilované vody (kontrola).

#### 4.4.3 Western blot detekce změn hladiny *S*-nitrosoglutahionreduktasy po aplikaci modulátorů

Western blot s následnou imunodetekcí byl využit také k detekci hladiny enzymu GSNOR v levých polovinách (vedle místa aplikace) pátých listů rostlin *N. tabacum* cv. Samsung ošetřených modulátory cPTIO, GSNO a inhibítorem GSNOR 24 h po aplikaci. Levé poloviny a spolu s časy po aplikaci byly zvoleny na základě hodnot specifické aktivity GSNOR modulované výše zmíněnými látkami. Kontrolní vzorky opět obsahovaly aplikovanou destilovanou vodu. Zvoleným standardem byl rekombinantní protein GSNOR z *L. sativa* o koncentraci  $0,75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a primární protilátkou polyklonální králičí protilátka anti-AtGSNOR.

Při testování vlivu aplikace látek cPTIO a kombinace látek cPTIO a kryptogeinu X24 v daných časech po aplikaci bylo dosaženo shodných výsledků jako při stanovení specifické aktivity GSNOR po aplikaci těchto látek. Nejvyšší intenzita bandů byla pozorována po aplikaci látky cPTIO a její kombinace s kryptogeinem X24 (Obr. 33a). V případě aplikace GSNO byl nejintenzivnější band detekován po aplikaci GSNO v kombinaci s kryptogeinem. Zatímco specifická aktivita byla nejvyšší po aplikaci pouze GSNO (Obr. 33b). Intenzita bandů zaznamenaná 24 h po aplikaci inhibítoru či jeho kombinací kombinací s kryptogeinem X24 odpovídala naměřeným hodnotám aktivity GSNOR po aplikaci této látky. Nejvýraznější zvýšení hladiny GSNOR v rámci 24 h po aplikaci výše zmíněných látek bylo detekováno po aplikaci samotného inhibítoru (Obr. 33c).

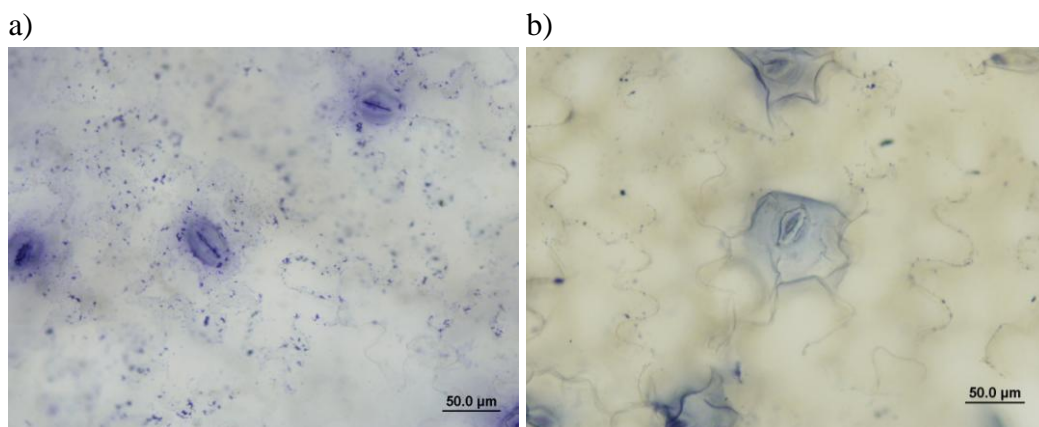


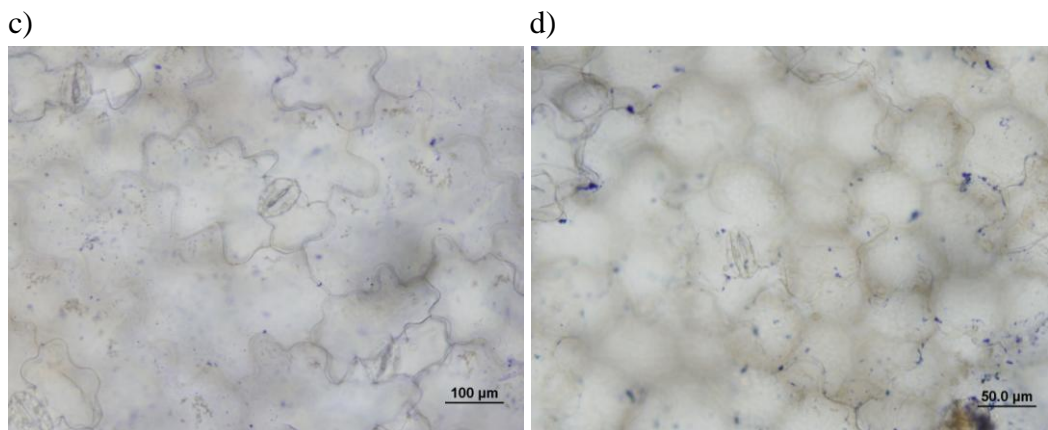
Obr. 33 Srovnání Western blot detekce hladiny enzymu GSNOR v levých polovinách pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung 24 h po aplikaci látky. Modulační hladiny enzymu GSNOR byla provedena aplikací látek: a) s cPTIO, b) GSNO, c) inhibítorem GSNOR, samostatně nebo v kombinaci s kryptogeinem X24. Vysvětlivky: (voda) kontrolní vzorek po aplikaci destilované vody, (std) standard - rekombinantní protein GSNOR z *L. sativa*.

#### 4.4.4 Histochemická detekce aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy po aplikaci modulátorů

Histochemická detekce GSNOR dle upravené metodiky publikované kolektivem Díaz *et al.* (2004) byla provedena v listových discích připravených z pravých (místo aplikace) a levých (vedle místa aplikace) polovin pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung. Využity byly listy tabáků po aplikaci cPTIO, GSNO, inhibitoru GSNOR (N6022), kryptogeinu X24 nebo destilované vody (kontrola vlivu mechanického poškození) do pravé poloviny pátého listu. Byly připraveny i kontrolní vzorky z pátých listů rostlin bez jakéhokoliv ošetření a kontrolní vzorky neobsahující kompletní inkubační směs, postrádaly buď GSH, NAD<sup>+</sup> nebo formaldehyd či všechny tyto tři složky najednou. Důvodem je eliminace vlivu přítomnosti endogenního GSH, NAD<sup>+</sup> a formaldehydu včetně indukované oxidace GSH a formaldehydu jinými enzymy. Časové intervaly odběrů byly 4 h po aplikaci (kryptogein X24, destilovaná voda) a 24 h po aplikaci (GSNO, cPTIO, inhibitor N6022, destilovaná voda).

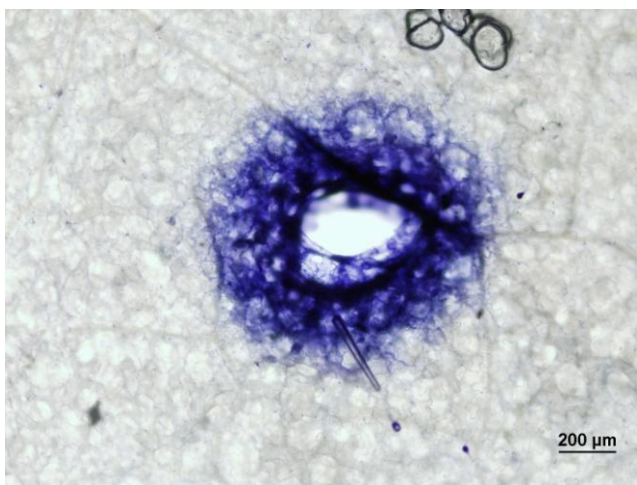
GSNOR aktivita byla detekovaná v místě průduchů po aplikaci modulátorů RNS nebo kryptogeinu X24 (Obr. 34). Ve druhém opakování se GSNOR aktivita nepodařila detekovat. V následných pokusech je proto nutné potvrdit lokalizaci GSNOR, případně potvrdit, že se jednalo o artefakt.



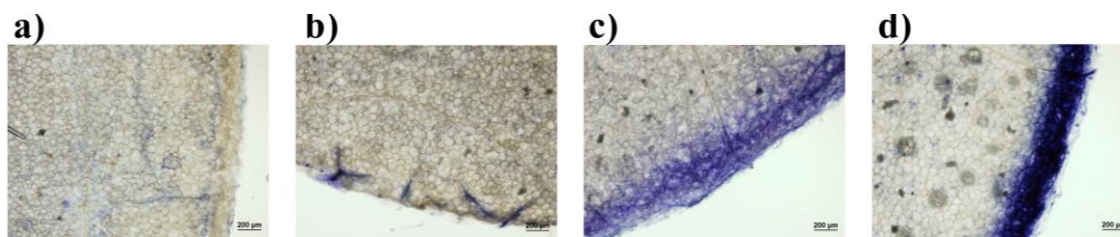


Obr. 34 Srovnání výsledků histochemické detekce aktivity GSNOR v listových discích připravených z pravých polovin pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung ošetřených: a), b) látkou cPTIO nebo c), d) destilovanou vodou (kontrola). Listové disky byly ve všech případech inkubované v kompletní inkubační směsi s GSH,  $\text{NAD}^+$  a formaldehydem. Snímky byly pořízeny světelným mikroskopem při zvětšení 20x.

Výrazná aktivita GSNOR byla detekována v mechanicky poškozených místech listových disků jako je místo vpichu látky (Obr. 35) a okraje listových disků, které byly mechanicky poškozeny při jejich přípravě (Obr. 36d). Podařilo se také vyloučit ovlivnění výsledků přítomností endogenního GSH,  $\text{NAD}^+$  a formaldehydu (Obr. 36). Tato metoda by tedy mohla být vhodná pro testování vlivu mechanického poškození na aktivitu enzymu GSNOR.



Obr. 35 Histochemicky detekovaná aktivita GSNOR v místě vpichu. Listový disk byl připraven z pravé poloviny pátého listu *N. tabacum* cv. Samsung ošetřeného destilovanou vodou (kontrola), inkubován byl v kompletní inkubační směsi s GSH,  $\text{NAD}^+$  a formaldehydem. Snímek byl pořízen světelným mikroskopem při zvětšení 10x.



Obr. 36 Porovnání výsledků histochemické detekce aktivity GSNOR v listových discích připravených z pátých listů *N. tabacum* cv. Samsung. Listové disky jsou připraveny z pravých polovin listů rostlin bez jakéhokoliv ošetření. a) listový disk inkubovaný v inkubační směsi bez GSH,  $\text{NAD}^+$  a formaldehydu b) listový disk inkubovaný v inkubační směsi bez GSH c) listový disk inkubovaný v inkubační směsi bez  $\text{NAD}^+$  d) listový disk inkubovaný v kompletní inkubační směsi s GSH,  $\text{NAD}^+$  a formaldehydem.

## 5 DISKUSE

### 5.1 Vliv aplikace elicitinů - hypersenzitivní reakce

Elicitiny jsou proteiny produkované patogeny disponující schopností indukce obranné reakce u rostlin (Keller *et al.*, 1996). Předložená diplomová práce byla cílena na studium vlivu tlakové infiltrace patogenních proteinů (elicitinů) do části listů *N. tabacum* cv. Samsung. Přítomnost elicitinů pouze v místě tlakové aplikace (pravá polovina listu) byla potvrzena experimentálně (Satková *et al.*, nepublikovaná data).

Elicitin kryptogein, protein produkovaný fytopatogenní oomycetou *P. cryptogea*, která způsobuje nekrosu listů rostlin *N. tabacum*, vyvolává u těchto rostlin hypersenzitivní reakci spojenou se systematicky získanou rezistencí (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999). Plešková *et al.* (2011) uvádí, že 48 h po aplikaci kryptogeinu X24 tlakovou infiltrací byla pozorována pouze lokální nekrosa v okolí místa infiltrace. Ve studii Dokládál *et al.* (2012) bylo zaznamenáno poškození pletiva celého listu vlivem nekrotické aktivity tři dny po ošetření kryptogeinem X24, elicitin byl však aplikován namočením řapíků listů do vodného roztoku kryptogeinu X24 po dobu 48 h. V rámci diplomové práce se jednalo o přímou tlakovou aplikaci do pletiva listů a výrazná nekrotická aktivita byla pozorována již 24 h po aplikaci kryptogeinu X24 (Obr. 18). Rozdílná intenzita nekrotické odezvy ve výše uvedených publikacích v porovnání s výsledky uvedenými v prezentované diplomové práci je způsobena použitím jiných koncentrací elicitinu a v případě Dokládál *et al.* (2012) i jinou technikou aplikace. Plešková a kolektiv (2011) použili koncentraci  $10 \text{ nmol l}^{-1}$  a  $50 \text{ nmol l}^{-1}$  a v práci Dokládál *et al.* 2012 byla použita koncentrace kryptogeinu X24  $250 \text{ nmol l}^{-1}$ . V případě experimentů v předložené diplomové práci byla použita koncentrace odpovídající způsobu aplikace elicitinu, tj.  $100 \text{ nmol l}^{-1}$ .

V rámci předložené studie byla potvrzena silnější nekrotická aktivita indukovaná po aplikaci mutantní formy kryptogeinu V84F do listového pletiva v porovnání s kryptogeinem X24 (Obr. 18). Po aplikaci této formy elicitinu dochází následně i k výraznému nekrotickému poškození druhé poloviny listu, do které nebyl elicitin aplikován. Elicitin V84F má vyšší schopnost aktivovat produkci ROS v rámci obranných mechanismů rostliny v porovnání s kryptogeinem, což úzce souvisí s intenzitou pozorované nekrotické reakce (Dokládál *et al.*, 2012). V souladu s poznatkami o vztahu produkce ROS a nekrotické aktivity rostlin v rámci obranných reakcí po napadení hostitelské rostliny patogenním organismem byla detekovaná minimální nekrotická

odezva po aplikaci mutanta kryptogeinu L41F, který oproti kryptogeinu a mutantní formy V84F indukuje minimální produkci ROS (Dokládal *et al.*, 2012).

Elicitin oligandrin produkovaný patogenem *P. oligandrum* se řadí mezi na základě hodnoty izoelektrického bodu (pI-4,5) mezi kyselé  $\alpha$ -elicitiny (Picard *et al.*, 2000), na rozdíl od kryptogeinu který je sekretován fytopatogenní oomycetou *P. cryptogea* a řadí se mezi tzv. bazické  $\beta$ -elicitiny (pI-8,5) (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999), pro které je typická zvýšená schopnost aktivace hypersenzitivní reakce vedoucí k nekrotickým projevům. Tabák není přirozenou hostitelskou rostlinou patogenu *P. oligandrum*. Oligandrin, stejně jako mutant kryptogeinu L41F vykazuje významně nižší schopnost produkce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a dalších ROS (Picard *et al.*, 2000; Dokládal *et al.*, 2012). Jako  $\alpha$ -elicin, které mají v 13. pozici (klíčová determinanta nekrotické aktivity) malý nepolární valin, by měl být méně toxickým elicitem a vyvolávat nekrotický účinek v řádech  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , avšak na rozdíl od jiných zástupců  $\alpha$ -elicitinů nemá u hostitelské rostliny schopnost indukce hypersenzitivní reakce spojené s nekrotickou aktivitou, z důvodů rozdílného pořadí aminokyselin v sekvenci (Picard *et al.*, 2000). Oligandrin indukuje expresi řady obranných genů spojených s tvorbou kyseliny jasmonové a ethylenu, majících významnou roli v resistenci vůči chorobám (Kawamura *et al.*, 2009). V pátém listu *N. tabacum* cv. Samsung ve shodě s poznatky Picard *et al.* (2000) nebyla u oligandrinu pozorována nekrotická aktivita (Obr. 18).

## 5.2 Vliv aplikace elicitinů na S-nitrosoglutationreduktasu

S-nitrosoglutationreduktasa svou aktivitou, konkrétně regulací intracelulární hladiny GSNO a následně i účinků NO v buňkách, může měnit transnitrosylační rovnováhu mezi GSNO a S-nitrosylovanými proteiny a tím se podílet na buněčné homeostáze NO. GSNOR se významně podílí na obranné reakci vyvolané biotickými stresovými faktory spojené s rezistencí vůči bakteriálním nebo houbovým patogenům (Letterier *et al.*, 2011). Rovněž bylo prokázáno zapojení GSNOR v regulaci patogenem indukované hypersenzitivní reakce vedoucí k buněčné smrti rostlin v procesu S-nitrosylace (Chen *et al.*, 2009) a její nezbytnost v ochraně buněk před nitrosativním stresem (Piterková *et al.*, 2008; Letterier *et al.*, 2011).

Díaz *et al.* (2003) uvádí, že působením kyseliny salicylové, která je významným mediátorem biotického stresu, došlo u rostlin tabáku ke zvýšení aktivity GSNOR, na rozdíl od kyseliny jasmonové, jejíž aplikace vyvolala pokles hladiny i aktivity GSNOR, efekt pozorovaný u *A. thaliana* byl opačný. V prezentované práci aplikace kryptogeinu



X24 indukovala v místě aplikace *N. tabacum* cv. Samsung v porovnání s hodnotami naměřenými v pravých polovinách listů rostlin ošetřených jinými testovanými elicitorů nejintenzivnější nárůst specifické aktivity a to především 3 h po aplikaci (Obr. 19-22). Jelikož elicitace rostliny kryptogeinem způsobí zvýšení hladiny NO, která ovlivňuje důležité fytohormony (kyselina jasmonová, ethylen a kyselina salicylová) regulující činnost a hladiny dalších rostlinných obranných látek jako jsou různé proteinkinasy (Wünsche *et al.*, 2011), lze usoudit na základě zaznamenaných výše zmíněných výsledků (Díaz *et al.*, 2003), že GSNOR je zapojena v obranném mechanismu rostliny po napadení patogenem a že může být zpětně regulována hladinou fytohormonů.

Jednoznačně nejvyšší změny ve specifické aktivitě ve srovnání s detekovanými účinky aplikace zvolených elicitorů byly zaznamenány v rámci lokální systémové odezvy a to v druhé polovině listu (tj. mimo místo aplikace elicitoru) po elicitaci nejvíce toxicky působícím mutantem V84F v časovém intervalu mezi 3 a 7 h (maximum 4 h) po aplikaci), kdy byla specifická aktivita GSNOR zvýšena cca trojnásobně. V souladu s kinetickou studií byl při detekci hladiny GSNOR metodou Western blot nejsilnější signál po elicitaci mutantem V84F v levé polovině listu v čase 4 h po ošetření. V práci Kubienová *et al.* (2014) byly detekovány výrazné změny aktivity GSNOR v listech genotypů *Cucumis* spp. náchylných po infekci patogenem *Golovinomyces cichoracearum* ve srovnání s rezistentními genotypy. Toto tvrzení naznačuje, že vysoká toxicita patogenu nebo naopak vysoká náchylnost hostitelské rostliny, indukuje zvýšenou hladinu GSNOR u rostlin. Feechan *et al.* (2005) uvádí, že rostliny bez GSNOR aktivity akumulují vyšší množství dusičnanů i nitrososloučenin a vykazují oslabené obranné reakce. Rostliny, které naopak vykazují zvýšenou aktivitou GSNOR jsou více odolné vůči virulentním a mikrobiálním patogenům.

V rozporu s Feechan *et al.* (2005) jsou výsledky uvedené v pozdější publikaci Resterucci *et al.* (2007), kde bylo zjištěno, že *A. thaliana* se sníženou expresí GSNOR vykazuje zvýšenou bazální odolnost vůči *P. parasitica*, což odpovídá i vyšší hladině intracelulárních S-nitrosothiolů a konstitutivní aktivaci PR-1. Snížená aktivita GSNOR, ale zvýšená hladina S-nitrosothiolů spojená s bazální a ne-hostitelskou rezistencí byla zaznamenána u *A. thaliana* infikované *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 nebo *B. graminis* (Feechan *et al.*, 2005) či u slunečnice rezistentní k patogenní oomycetě *Plasmopara halstedii* (Chaki *et al.*, 2009). Snížená specifická aktivita GSNOR v porovnání s kontrolou byla v rámci prezentované diplomové práce detekována pouze

po aplikaci mutanta L41F v místě aplikace, kde byla v porovnání s ostatními testovanými elicitiny, avšak ve shodě s publikovanými daty (Dokládál *et al.*, 2012), detekovaná i nejmenší hypersenzitivní reakce.

Účinek aplikace oligandrinu na změny specifické aktivity pravé polovině, byl nižší než v případě aplikace kryptogeinu X24, na rozdíl od levé poloviny kde bylo detekováno mírné zvýšení. Zvýšená hladina GSNOR byla detekována proteomickou analýzou v kukuřici ošetřené symbiotickou houbou *Trichoderma harzianum*, která v semenáčcích kukuřice indukuje rezistenci vůči jinému zástupci rodu *Pythium* a to *P. ultimum* (Chen *et al.*, 2005).

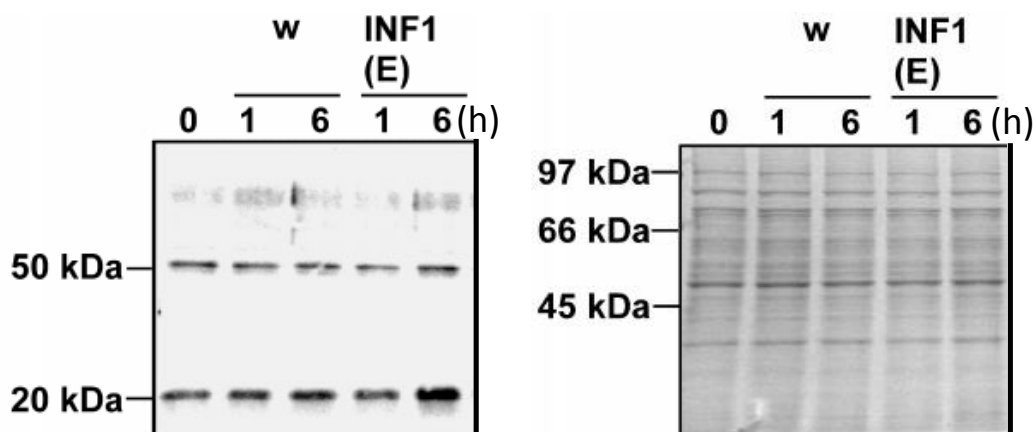
### 5.3 Nitrace proteinů

Nitrace tyrosinových residuí je modifikace sloužící k regulaci biologické funkce proteinů jako je enzymová aktivita či přenosu signálu v buňce. Nitrací proteinů může také souviset s obrannými procesy organismů indukovanými zvýšenou produkcí RNS vlivem biotického a abiotického stresu (Romero-Puertas *et al.*, 2007).

U rostlin byly nitrované proteiny poprvé detekovány u sóji (Delledonne *et al.*, 2001). U citrusů byla detekována zvýšená nitrace proteinů o molekulových hmotnostech 97, 66, 55 a 27 kDa v reakci na abiotický stres (Ziogas *et al.* 2013). V souvislosti s reakcí na abiotický stres byly detekovány nitrované proteiny s molekulovou hmotností 29–59 kDa v rostlinách hrachu (Corpas *et al.*, 2008). V olivových rostlinách vlivem salinitního stresu bylo pozorováno významné zvýšení L-arginin-dependentní NOS aktivity a detekováno množství proteinů vykazujících tyrosinovou nitrací v rozsahu molekulových hmotností 10-50 kDa (Valderrama *et al.*, 2007). Dále byly pozorovány nitrované proteiny u tabáku se sníženou aktivitou NR (10-50 kDa) (Morot-Gaudry-Talarmain *et al.*, 2002). U buněčné kultury tabáku BY-2 byly detekovány nitrované proteiny s molekulovou hmotností v rozsahu 20-50 kDa, jejich zvýšené množství bylo indukováno působením elicitoru z *Phytophthora infestans* INF1 (Obr. 37) (Saito *et al.*, 2006). Naopak Wilhelmová *et al.* (2006) uvádí, že u transgenních rostlin tabáku se zvýšenou hladinou cytokininů došlo k poklesu hladiny nitrovaných proteinů.

V rámci diplomové práce byly provedeny pilotní experimenty zaměřené na detekci nitrovaných proteinů po aplikaci studovaných elicitinů. Po aplikaci kryptogeinu byl detekován v souladu s publikovanými výsledky nitrací proteinů u tabáku a suspenze tabákových buněk (Morot-Gaudry-Talarmain *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2006) na rozdíl od kontrolních vzorků nitrovaný protein o molekulové hmotnosti 42 kDa (Obr. 24a).

Jedná se o předběžné výsledky, které v následujících experimentech musí být potvrzeny a nitrovaný protein identifikován.



Obr. 37 Detekce nitrotyrosinu proteinů tabákových buněk BY-2 1. a 6 h po ošetření  $50 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  elicitem INF1 (převzato ze Saito *et al.*, 2006).

#### 5.4 Kinetické parametry *S*-nitrosoglutathionreduktasy

Substrátem enzymu *S*-nitrosoglutathionreduktasy mohou být např. alkoholy se středně dlouhým řetězcem (cinnamylalkohol, geraniol, farnesol); dále také  $\omega$ -hydroxy-mastné kyseliny, aldehydy a adukty GSH (HMGS, GSNO) (Kubienová *et al.*, 2013). V rámci prezentované práce byly studovány kinetické parametry ( $K_M$  a  $V_{lim}$ ) redukční reakce GSNOR z *N. tabacum* cv. Samsung. Jako substrát sloužil *S*-nitrosoglutathion, který je dle současných poznatků fyziologicky nejvýznamnějším substrátem GSNOR. Bylo prokázáno, že lidská ADH3 má vyšší afinitu ke GSNO než k HMGS. Hodnota  $K_M$  pro HMGS je přibližně 100x vyšší než pro GSNO (Kubienová *et al.*, 2013).

V rámci diplomové práce byla stanovena Michaelisova konstanta GSNOR *N. tabacum*, jejíž hodnota  $52,27 \pm 1,66 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  je blízká hodnotě  $K_M$  GSNOR ze *S. lycopersicum*  $57 \pm 4 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (Kubienová *et al.*, 2013). V Tab. 6 jsou shrnuty Michaelisovy konstanty, které byly stanoveny u GSNOR různých organismů pro substrát GSNO. Nejvyšší hodnota byla stanovena u *Taiwanofungus camphoratus* (Huang *et al.*, 2009) a nejnižší  $K_M$  u krysy (Jensen *et al.*, 1998). Pro stanovení  $K_M$  u GSNOR ze *Staphylococcus aureus* (Tavares *et al.*, 2009), *S. cerevisiae* (Fernández *et al.*, 2003), *T. camphoratus* (Huang *et al.*, 2009), *Brachiostoma floridae* (Godoy *et al.*, 2006), *S. lycopersicum* (Kubienová *et al.*, 2013) a člověka (Green *et al.*, 2012), *B. oleracea* var. botrytis a *L. sativa* UCDM2 (Tichá, 2013) byly použity rekombinantně exprimované enzymy izolované z *E. coli*. Krysí GSNOR (Jensen *et al.*, 1998), byla izolována přímo z krysích jater.

*S. lycopersicum* GSNOR vykazuje až 98% sekvenční identitu s GSNOR z *N. attenuata*. Procenta identity SIGSNOR s aminokyselinovými sekvencemi dalších rostlinných GSNOR jsou: 90% s *A. thaliana* a *Z. mays*; 67% s hGSNOR a 61% s GSNOR ze *S. cerevisiae* (Kubienová *et al.*, 2013).

GSNOR z *B. oleracea* var. botrytis vykazuje 97% sekvenční identitu s GSNOR *A. thaliana*, 91% s SIGSNOR, 90% s GSNOR *L. sativa* UCDM2 a *Z. mays*. Vysoká hodnota sekvenční identity GSNOR z *B. oleracea* var. botrytis byla ještě u GSNOR *P. sativum* (89%); s hGSNOR byla 68% a s GSNOR *S. cerevisiae* (60%) (Tichá, 2013).

GSNOR z *L. sativa* UCDM2 vykazuje nejvyšší 90% sekvenční identitu s GSNOR *A. thaliana*, *B. oleracea* var. botrytis a *Z. mays*. A stále vysokou vysokou sekvenční totožnost (89%) s SIGSNOR a s GSNOR *P. sativum* (88%). Podobně jako SIGSNOR a *B. oleracea* var. botrytis vykazuje výrazně nižší sekvenční identitu s hGSNOR (69%) a s GSNOR *S. cerevisiae* (61%). Tyto poznatky potvrzují vysokou sekvenční identitu rostlinných GSNOR (Tichá, 2013).

Tab. 6 Srovnání stanovené hodnoty  $K_M$  (zeleně) pro substrát GSNO u GSNOR z *N. tabacum* cv Samsung a publikovaných hodnot  $K_M$  pro GSNO u GSNOR z různých organismů a) i b). Uvedené hodnoty jsou v  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vysvětlivky: \* převzato z Tavares *et al.*, 2009; † převzato z Fernández *et al.*, 2003; ‡ převzato z Huang *et al.*, 2009; § převzato z Jensen *et al.*, 1998; \*\* převzato Green *et al.*, 2012; †† převzato z Godoy *et al.*, 2006; ††† převzato z Tichá, 2013; §§ převzato z Kubienová *et al.*, 2013.

a)

GSNOR	<i>S. aureus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. camphoratus</i>	Krysa	Člověk
$K_M$	181*	150 <sup>†</sup>	280 <sup>‡</sup>	28 <sup>§</sup>	37 <sup>**</sup>

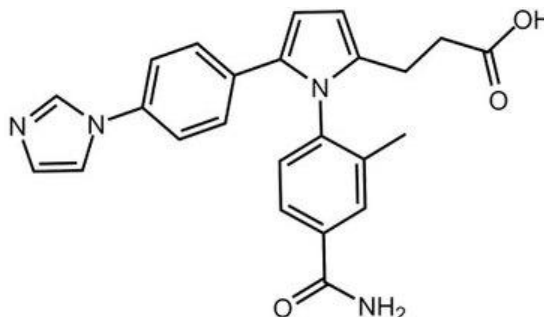
b)

GSNOR	<i>B. floridae</i>	<i>L. sativa</i>	<i>B. oleracea</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>N. tabacum</i>
$K_M$	56 <sup>††</sup>	45 <sup>†††</sup>	53 <sup>†††</sup>	57 <sup>§§</sup>	52

## 5.5 Hodnota $IC_{50}$ inhibitoru GSNOR N6022

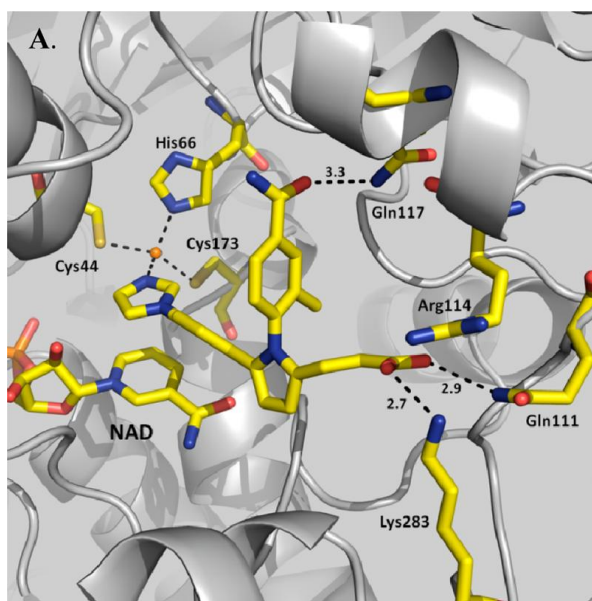
Organická sloučenina 3-(5-(4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylfenyl)-1H-pyrrol-2-yl) propionová kyselina (Obr. 38), zkráceně označovaná jako N6022 je poměrně nedávno vyvinuté léčivo první třídy sloužící k inhibici lidské GSNOR, enzymu metabolizujícím GSNO a udržujícím homeostázu NO (Green *et al.*, 2012). Při inhibici GSNOR látkou N6022 dochází k akumulaci GSNO, zablokováním jeho metabolismu.

U živočichů zvýšená hladina GSNO indukuje mj. iniciaci protizánětlivé signalizace (Reyneart *et al.*, 2004). Tato inhibice se u živočišných modelů astmatu a zánětlivých onemocnění plic nebo střev jeví jako bezpečná a účinná. V současné době je N6022 v rané fázi klinického testování i u lidí (Sun *et al.*, 2011; Green *et al.*, 2012).



Obr. 38 Chemická struktura inhibitoru N6022.

Tato malá molekula (414.46 kDa) je rychle a pevně se vážající plně reverzibilní specifický inhibitor GSNOR, který u hGSNOR vykazuje hodnotu  $IC_{50}$   $8 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a inhibiční konstantu  $K_i$   $2,5 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . U hGSNOR se váže do vazebného místa GSNO a reaguje mechanismem nekompetitivní inhibice. Vazba do aktivního místa je tvořena interakcí propionové kyseliny bočního řetězce inhibitoru se všemi třemi residui enzymu hGSNOR tvořícími anion-vazebnou kapsu (Obr. 39) (Green *et al.*, 2012).



Obr. 39 Vazba inhibitoru N6022 do aktivního místa lidské GSNOR. Interakce  $\text{N6022} \cdot \text{GSNOR} \cdot \text{NAD}^+$  ukazuje, že inhibitor interaguje s anion-vazebnou kapsou svou kyselou komponentou, centrální region inhibitoru se podílí na hydrofobních interakcích s mnoha residui podél vazebné štěrbině a také že inhibitor je součástí tetrahedrální koordinace zinku. Vzdálenost vazeb (angströmy) je uvedena čárkovaně (převzato z Green *et al.*, 2012).

Inhibiční účinky inhibitoru N6022 byly také testovány u GSNOR ze *S. lycopersicum*, kde byla stanovena hodnota  $IC_{50}$  o dva řády vyšší než u hGSNOR a to na  $300 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , příslušná hodnota inhibiční konstanty byla  $429 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a byl stejně jako u hGSNOR prokázán nekompetitivní charakter inhibice (Kubienová *et al.*, 2013). SIGSNOR však vykazovala mnohem nižší inhibiční účinnost než hGSNOR a výsledky uvedené v publikaci Kubienová *et al.* (2013) potvrzují, že vazba N6022 je slabší v porovnání s lidskou GSNOR. Důvodem těchto rozdílů, stejně jako pozměněné substrátové specifity může být rozdílné složení residuí tvořících anion-vazebnou kapsu u lidské a rostlinné GSNOR. Kubienová *et al.* (2013) uvádí, že SIGSNOR postrádá v anion-vazebné kapse glutamin.

V prezentované diplomové práci byla stanovena hodnota  $IC_{50}$  inhibitoru N6022  $371,2 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  u GSNOR *N. tabacum* cv. Samsung, která odpovídá hodnotě získané u SIGSNOR, což může souviset s vysokou sekvenční identitou rostlinných GSNOR (98% v případě *S. lycopersicum* GSNOR a GSNOR z *N. attenuata* (Kubienová *et al.*, 2013)). Výsledky uvedené v předložené diplomové práci jsou v souladu i s daty získanými a prezentovanými v diplomové práci Tichá (2013). V Tab. 7 jsou uvedeny hodnoty inhibičních konstant stanovených pro GSNOR původem z *B. oleracea* var. botrytisa *L. sativa* UCDM2 (Tichá, 2013) a *S. lycopersicum* (Kubienová *et al.*, 2013) (rekombinantní enzymy). Hodnoty  $IC_{50}$  GSNOR *N. tabacum* cv. Samsung jsou řádově shodné se stanovenými hodnotami  $K_i$  pro rekombinantní GSNOR rostlinného původu. Na základě těchto poznatků se inhibitor N6022 jeví atraktivním cílem *in vivo* studií rostlinných GSNORs.

Tab. 7 Hodnoty inhibičních konstant stanovených pro rostlinné GSNOR. Uvedené hodnoty jsou v  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vysvětlivky: \* převzato z Tichá 2013; † převzato z Kubienová *et al.*, 2013.

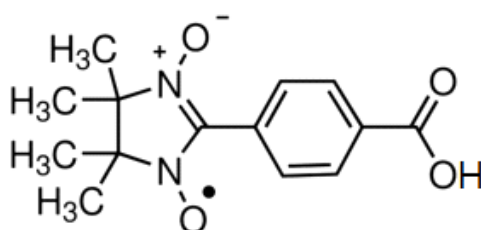
GSNOR	<i>B. oleracea</i>	<i>L. sativa</i>	<i>S. lycopersicum</i>
$K_i$ (inhibitor N6022)	$326 \pm 8^*$	$331 \pm 13^*$	$429 \pm 30^\dagger$

## 5.6 Vliv aplikace modulátorů na S-nitrosoglutathionreduktasu

Karboxy-PTIO, GSNO a inhibitor GSNOR N6022 jsou látky modulující hladinu RNS. V rámci diplomové práce byl testován vliv jejich aplikace na aktivitu enzymu GSNOR za současné aktivace obranné reakce kryptoginem X24.

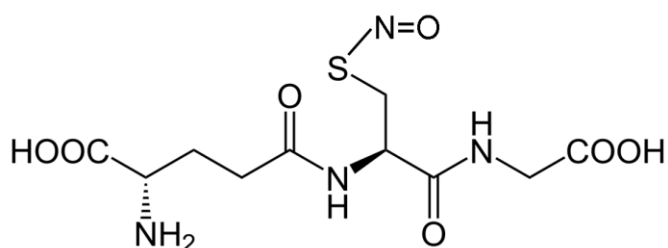
Sloučenina 2-4-karboxyfenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxid (Obr. 40) označovaná jako cPTIO patří mezi nitronylnitroxidy je karboxyderivátem 2-fenyl-4,4,5,5,-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxidu. Jedná se o stabilní organický radikál reagující s NO s rychlostní konstantou  $10^4 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  za vzniku iminonitroxidu a  $\text{NO}_2$ .

Účinek látky cPTIO jako specifického lapače NO byl potvrzen v řadě studií (Fernandéz-Marcos *et al.*, 2012; D'Alessandro *et al.*, 2013), v rostlinném výzkumu je cPTIO hojně využíván v kombinaci s fluorescenčním barvivem 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofloresceinem tzv. DAF-FM. Bylo však prokázáno, že schopnost cPTIO vychytávat NO může být snížena v přítomnosti různých redukcujících sloučenin, jako jsou glutathion nebo askorbát (D'Alessandro *et al.*, 2013).



Obr. 40 Strukturální vzorec látky cPTIO (převzato z D'Alessandro *et al.*, 2013)

S-nitrosoglutathion (GSNO) systematickým názvem 2S-2-amino-5-[[2R-1-(karboxymethyl-amino)-3-nitrososulfanyl-1-oxopropan-2-yl]amino]-5-oxopentanová kyselina (Obr. 41) je nejrozšířenější nízkomolekulární S-nitrosothiol a protože je významným zdrojem NO *in vivo* bývá v rámci experimentů v rostlinných i živočišných systémech využíván jako fyziologický donor NO (Liu *et al.*, 2001).



Obr. 41 Strukturální vzorec S-nitrosoglutathionu (převzato z Kubienová *et al.*, 2013).

Látka cPTIO aplikovaná tlakově do pletiva listu nevyvolala detekovatelné změny struktury pletiva listu ani 48 h po aplikaci látky (Obr. 29c). V kombinaci s kryptogeinem X24 byl do 24 h pozorován srovnatelný účinek jako v případě aplikace pouze kryptogeinu (Obr. 29b), zatímco reakce 48 h po aplikaci cPTIO v kombinaci s kryptogeinem byla výrazně silnější než po aplikaci pouze kryptogeinu (Obr. 29c).

Na rozdíl od působení cPTIO tlaková aplikace GSNO indukovala po 48 h slabou nekrotickou aktivitu v místě aplikace látky (Obr. 29c). Současná aplikace GSNO s kryptogeinem X24 vykazovala slabší nekrotickou aktivitu v porovnání s aplikací samotného kryptogeinu nebo kryptogeinu spolu s cPTIO (Obr. 29a,b,c).

Na základě zaznamenaných změn lze předpokládat, že po aplikaci kryptogeinu dochází k zapojení NO v mechanismu obranné reakce rostliny. Jednou z možností může být antioxidační funkce NO. Reakcí s reaktivními formami kyslíku se NO může podílet na ochraně rostlin před oxidativním stresem (Beligni *et al.*, 2002; Guo a Crawford, 2005). Snížení hladiny NO po aplikaci cPTIO s kryptogeinem může mít za následek vyšší hladinu ROS (zvýšená produkce ROS po aplikaci kryptogeinu byla prokázána) podílející se na intenzivnější hypersenzitivní reakci vedoucí k destrukci rostlinného pletiva.

Při působení biotických stresových faktorů má NO významnou funkci v programované buněčné smrti (Vandelle *et al.*, 2006), hypersenzitivní reakci (Delledonne *et al.*, 1998) a systémové odezvě (Capone *et al.*, 2004). Byly prokázány stimulační případně inhibiční účinky NO na aktivitu enzymů u rostlin (např. nitrátreduktasa, superoxiddismutasa, askorbátperoxidasa, katalasa (Misra *et al.*, 2011). NO také moduluje expresi řady genů. Vedle obranných genů (*PR-1*) a enzymu fenylalaninamoniaklyasy (EC 4.3.1.24) také indukuje expresi peroxidasy (EC 1.11.1.x) a ferritinu (1.16.3.1), klíčových enzymů biosyntézy kyseliny jasmonové (del Río *et al.*, 2003). Působení RNS v organismu je označováno jako tzv. nitrosativní stres a může vést k poškození případně modifikaci důležitých buněčných součástí, jako je DNA, proteiny, lipidy a jiné.

Oxid dusnatý a superoxid reagují rychle za vzniku oxidačního a nitračního činidla peroxodusitanu. Spolu s hemperoxidasou zprostředkovávají oxidaci a nitraci tyrosinu (van der Vliet *et al.*, 1997). Rostoucí množství důkazu poukazuje, že k nitraci tyrosinu dochází u rostlin v reakci na působení biotických a abiotických stresových faktorů, kdy dochází k současnému uvolnění NO a ROS (Moreau *et al.*, 2010). Významnou roli v regulaci proteinů má *S*-nitrosylace, ke které dochází v reakci proteinu s NO nebo přenosem NO z nitrosothiolu na sulfhydrylovou skupinu cysteinového residua, tzv. transnitrosylace (Moreau *et al.*, 2010). *S*-nitrosylací klíčových komponent antioxidačního obranného systému, které fungují jako běžné spouštěče pro ROS a NO zprostředkované signalizační reakce, reguluje NO efekt svých reaktivních forem (Moreau *et al.*, 2010). Vliv zvýšené hladiny NO na živý organismus potvrzuje



experiment, kdy po tlakové aplikaci GSNO byla pozorována slabá nekrotická aktivita v místě aplikace látky, na rozdíl od aplikace lapače NO, která vede naopak ke snížení koncentrace NO v pletivu listu. Vyšší hladina NO po aplikaci kryptogeinu v kombinaci s GSNO by se mohla podílet na interakci s ROS vedoucí ke snížení oxidativního stresu.

Vedle lapače NO cPTIO a donoru NO GSNOR byl v experimentech použit další modulátor hladiny NO – inhibitor GSNOR N6022. Inhibitor GSNOR N6022 byl původně vyvinut pro inhibici hGSNOR jeho inhibiční účinky byly prokázány i v případě rostlinné SIGSNOR. S ohledem na vysokou sekvenční podobnost rostlinných GSNOR, byl prokázán jeho inhibiční účinek i na GSNOR z *N. tabacum* cv. Samsung. V listech ošetřených pouze inhibitorem nebyla pozorována hypersenzitivní reakce spojená s nekrotickou aktivitou. Lze předpokládat, že na rozdíl od přímé aplikace GSNO, inhibice GSNOR nevedla k významně zvýšené hladině NO, která by se projevila nekrotickou aktivitou. Účinek inhibitoru ve spojení s kryptogeinem X24 po 48 hod aplikace byl silnější než v případě aplikace pouze kryptogeinu, ale slabší než v případě aplikace kryptogeinu s lapačem NO (cPTIO). Lze předpokládat, že hladina GSNO, případně NO bude po inhibici GSNOR vyšší, což se projeví intenzivnější nekrotickou reakcí rostliny. Předpoklad lze v následujících experimentech potvrdit stanovením hladiny GSNO po aplikaci modulátorů hladiny NO.

Modulátory NO cPTIO, GSNO i inhibitor GSNOR významně ovlivnily aktivitu enzymu GSNOR v obou částech listu (v místě přímé aplikace a v druhé polovině listu). Největší změny, téměř 20 násobný nárůst aktivity byl zaznamenán 24 h po aplikaci cPTIO, pouze 10 násobný nárůst GSNOR aktivity byl detekován po aplikaci GSNO a překvapivě byl významný nárůst aktivity GSNOR detekován i po aplikaci inhibitoru GSNOR. Otázkou zůstává, zda nedošlo zejména v případě aplikace inhibitoru GSNOR k aktivaci exprese daného enzymu. Této otázce se budou věnovat následující experimenty. Zajímavá je reakce rostliny i mimo místo přímé aplikace modulátoru, kde byla rovněž detekována významně zvýšená GSNOR aktivita.

Změny v aktivitách GSNOR po aplikaci modulátorů v kombinaci s kryptogeinem nebyly tak výrazné jako v případě samotných modulátorů. Vliv cPTIO v místě aplikace na aktivitu GSNOR po elicitaci kryptogeinem byl minimální. V případě aplikace GSNO a inhibitoru N6022 bylo zaznamenáno cca dvojnásobné zvýšení aktivity již 2 h po aplikaci modulátoru s kryptogeinem. V případě aplikace všech modulátorů současně s elicitinem byla aktivita GSNOR 24 případně 48 h po aplikaci nedetekovatelná. Zajímavým výsledkem byla reakce pletiva v případě testování cPTIO v kombinaci

s kryptogeinem X24 vedle místa přímé aplikace elicitinu, kdy byl zaznamenán podobně, jako v případě aplikace pouze samotného cPTIO, významný nárůst aktivity GSNOR. Vysvětlení pozorovaných změn za daného stavu poznatků, nelze podat. Je nutná navazující studie, která povede ke zdokumentování aktivace dílčích regulačních mechanismů, jako je aktivace/inhibice enzymů, exprese proteinů s danou funkcí, regulace nitrací a nitrosylací, ovlivnění úrovně oxidativního stresu v rostlině. V předložené diplomové práci se jedná o první realizované experimenty v rámci dané problematiky, na které navážou následující studie.

## 6 ZÁVĚR

- Výsledky studia vlivu aplikace elicitinů do listů tabáku (*N. tabacum* cv. Samsung) poukazují na možné zapojení GSNOR v obranné reakci modelové rostliny v místě aplikace elicitinů případně i v rámci lokální indukované reakce v případě elicitinů indukujících intenzivní nekrotické odezvy, tj. kryptogeinu X24 a jeho mutantní formy V84F.
- Byly stanoveny kinetické parametry  $K_M$  a  $V_{lim}$  GSNOR *N. tabacum* cv. Samsung.
- Byla stanovena hodnota IC50 inhibitoru GSNOR N6022 u GSNOR *N. tabacum* cv. Samsung. V následných experimentech bude vhodné stanovit další parametry inhibiční aktivity N6022 jako je inhibiční konstanta  $K_i$  a typ inhibice.
- Experimenty založenými na aplikaci modulátorů NO v kombinaci s kryptogeinem byl potvrzen vliv hladiny NO na nekrotickou aktivitu v rámci aktivace obranných mechanismů u listů tabáku (*N. tabacum* cv. Samsung). Nejvýraznější nekrotická aktivita byla pozorována při kombinaci látky cPTIO s kryptogeinem.
- Byl detekován vliv aplikace modulátorů hladiny RNS (lapač NO – cPTIO, donor NO – GSNO, inhibitor GSNOR N6022) na zvýšení aktivity GSNOR.
- Změny GSNOR aktivity po aplikaci modulátorů hladiny NO v kombinaci s kryptogeinem byly v porovnání s vlivem samotných modulátorů výrazně nižší.

## 7 LITERATURA

- Airaki M., Leterrier M., Mateos R.M., Valderrama R., Chaki M., Barroso J.B., Del Rio L.A., Palma J.M., Corpas F.J. (2012): Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant, cell & environment* **35**, 281-295.
- Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F.J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M.C., Valderrama R., Sandalio L.M., del Río L.A. (2006): Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of experimental botany* **57**, 1785- 1793.
- Barroso J., Valderrama R., Corpas F (2013): Immunolocalization of S-nitrosoglutathione, S-nitrosoglutathione reductase and tyrosine nitration in pea leaf organelles. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 2635-2640.
- Beligni M. V., Lamattina L. (2000): Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**, 215-221.
- Bethke P.C., Badger M.R., Jones R.L. (2004): Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant cell* **16**, 332-341.
- Boissy G., de La Fortelle E., Kahn R., Huet J.C., Bricogne G., Pernollet J.C., Brunie S. (1996): Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* **4**, 1429-1439.
- Bonnet P., Poupet A., Abad P., Venard P., Cardin L. (1986): Induction de nécroses foliaires, de protéines b et de résistance dans les interactions tabac-*Phytophthora*. *Agronomie* **6**, 829- 837.
- Bradford 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.
- Capone R., Tiwari B. S., Levine A. (2004): Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant physiology and biochemistry*. **42**, 425-428.
- Corpas F.J., Chaki M., Fernandez-Ocana A., Valderrama R., Palma J.M. , Carreras A., Begara-Morales J.C., Airaki M., del Rio L.A., Barroso J.B. (2008): Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant & cell physiology* **49**, 1711-1722.
- d'Alessandro S., Posocco B., Costa A., Zahariou G., Lo Schiavo F., Carbonera D., Zottini M. (2013): Limits in the use of cPTIO as nitric oxide scavenger and EPR probe in plant cells and seedlings. *Frontiers in plant science* **4**, 1-7.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- del Rio L. A., Corpas F. J., Sandalio L. M., Palma J. M., Barroso J. B. (2003): Plant Peroxisomes, Reactive Oxygen Metabolism and Nitric Oxide. *IUBMB Life* **55**, 71-81.
- Díaz M., Achkor H., Titarenko E., Martínez M.C. (2003): The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS letters* **543**, 136-139.
- Díaz M., Fernandez M. R., Martinez M. C. (2004): Histochemical assay to detect class III ADH activity in situ in *Arabidopsis* seedlings. *Biotechnic & histochemistry* **79**, 91-94.

- Dobeš P., Kmuniček J., Mikeš V., Damborský J. (2004): Binding of fatty acids to  $\beta$ -cryptogein: quantitative structure-activity relationships and design of selective protein mutants. *Journal of chemical information and modeling* **44**, 2126-2132.
- Dokládál L., Obořil M., Stejskal K., Zdráhal Z., Ptáčková N., Chaloupková R., Damborský J., Kašparovský T., Jeandroz S., Žďárská M., Lochman J. (2012): Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *Journal of experimental botany* **63**, 2203-2215.
- Dolferus R., Osterman J.C., Peacock W.J., Dennis E.S. (1997): Cloning of the *Arabidopsis* and rice formaldehyde dehydrogenase genes: implications for the origin of plant ADH enzymes. *Genetics* **146**, 1131-1141.
- Durner J., Wendehenne D., Klessig D.F. (1998): Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America* **95**, 10328-10333.
- Espunya M.C., Díaz M., Moreno-Romero J., Martínez M.C. (2006): Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant, cell & environment* **29**, 1002-1011.
- Feechan A., Kwon E., Yun B.W., Wang Y., Pallas J.A., Loake G.J. (2005): A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America* **102**, 8054-8059.
- Fefeu S., Bouaziz S., Huet J.C., Pernollet J.C., Guittet A. (1997): Three-dimensional solution structure of  $\beta$ -cryptogein, a  $\beta$ -elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Science* **6**, 2279-2284.
- Fernández-Marcos M., Snaz L., Lorenzo O. (2012): Nitric oxide An emerging regulator of cell elongation during primary root growth. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 196-200.
- Fernández M.R., Biosca J.A., Parés X. (2003): S-nitrosogluthathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localisation. *Cellular and molecular life sciences* **60**, 1013-1018.
- Garabagi F., Strommer J. (2004): Distinct Genes Produce the Alcohol Dehydrogenases of Pollen and Maternal Tissues in *Petunia hybrida*. *Biochemical genetics* **42**, 199-208.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006): Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular plant-microbe interactions* **19**, 711-724.
- Giese M., Bauer-Doranth U., Langebartels C., Sandermann H., Jr. (1994): Detoxification of Formaldehyde by the Spider Plant (*Chlorophytum comosum* L.) and by Soybean (*Glycine max* L.) Cell-Suspension Cultures. *Plant physiology* **104**, 1301-1309.
- Godoy L., González-Duarte R., Albalat R. (2006): S-nitrosogluthathione reductase activity of amphioxus ADH3: insights into the nitric oxide metabolism. *International journal of biological sciences* **2**, 117-124.
- Goretski J.T., Hollocher T.C. (1988): Trapping of nitric-oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. *The Journal of biological chemistry* **263**, 2316-2323.
- Grasemann H., Gaston B., Fang K., Paul K., Ratjen F. (1999): Decreased levels of nitrosothiols in the lower airways of patients with cystic fibrosis and normal pulmonary function, *The Journal of pediatrics* **135**, 770-772.

- Green L. S., Lawrence E. C., Patton A. K., Sun X., Rosenthal G. J., Richards J. P. (2012): Mechanism of Inhibition for N6022, a First-in-Class Drug Targeting S-Nitrosoglutathione Reductase. *Biochemistry* **51**, 2157-2168.
- Guo F. Q., Crawford N. M. (2005): Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant cell* **17**, 3436–3450.
- Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T. (2011): On the origins of nitric oxide. *Trends in plant science* **16**, 160-168
- Harper J.E. (1981): Evolution of nitrogen oxide(s) during *in vivo* nitrate reductase assay of soybean leaves. *Plant Physiology* **68**, 1488-1493.
- 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**, 150-166.
- Holzmeister C., Fröhlich A., Sarioglu H., Bauer N., Durner J., Lindermayr C. (2011): Proteomic analysis of defense response of wildtype *Arabidopsis thaliana* and plants with impaired NO-homeostasis. *Proteomics* **11**, 1664-1683.
- Hong J.K., Yun B.W., Kang J.G., Raja M.U., Kwon E., Sorhagen K., Chu Ch., Wang Y., Loake G.J. (2008): Nitric oxide function signalling in plant disease resistance. *Journal of experimental botany* **59**, 147-154.
- Huang C., Ken C., Wen L., Lin C. (2009 ): An enzyme possessing both glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase from *Antrodia camphorata*. *Food chemistry* **112**, 795-802.
- Huet J.C., Pernollet, J-C. (1993): Sequences of acidic and basic elicitor isoforms secreted by *Phytophthora megasperma*. *Phytochemistry* **33**, 797-805.
- Huet J.C., Salle-Tourne M., Pernollet J.C. (1994): Amino acid sequence and toxicity of the a elicitor secreted with ubiquitin by *Phytophthora infestans*. *Molecular plant-microbe interactions* **7**, 302-304.
- Huet J.C., Le Caer J.P., Nespoulous C., Pernollet J.C. (1995): The relationships between the toxicity and the primary and secondary structures of elicitor-like protein elicitors secreted by the phytopathogenic fungus *Pythium vexans*. *Molecular plant-microbe interactions* **8**, 302-310.
- Chaki M., Fernández-Ocana A.M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F.J., Luque F., Gómez-Rodríguez M.V., Begara-Morales J.C., Corpas F.J., Barroso J.B. (2009): Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant & cell physiology* **50**, 265-279.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocana A.M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V., Pedrajas .R., Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B. (2011): Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of experimental botany* **62**, 1803-1813.
- Chen J, Harman GE, Comis A, Cheng GW (2005): Proteins Related to the Biocontrol of *Pythium* Damping-off in Maize with *Trichoderma harzianum* Rifai. *Journal of integrative plant Biology* **47**, 988-997.
- Ignarro L.J. (1990): Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annual review of pharmacology and toxicology* **30**, 535-560.
- Jensen D.E., Belka G.K., Du Bois G.C. (1998): S-nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *The Biochemical journal* **331**, 659-668.

- Kaiser W.M., Brendle-Behnisch E. (1995): Acid-base modulation of nitrate reductase in leaf tissues. *Planta* **196**, 1-6.
- Kamoun S., Klucher K.M., Coffey M.D., Tyler B. (1993a): A gene encoding a host specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Molecular plant-microbe interactions* **6**, 573-581.
- Kamoun S., Young M., Glascock C., Tyler, B. (1993b): Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: Host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. *Molecular plant-microbe interactions* **6**, 15-25.
- Kamoun S., Young M., Förster H., Coffey M.D., Tyler B.M. (1994): Potential role of elicitors in the interaction between *Phytophthora* species and tobacco. *Applied and environmental microbiology* **60**, 1593-1598.
- Kawamura Y., Hase S., Takenaka S., Kanayama Y., Yoshioka H., Kamoun S., Takahashi H. (2009): INF1 elicitor activates jasmonic acid- and ethylene- mediated signalling pathways and induces resistance to bacterial wilt disease in tomato. *Journal of phytopathology* **157**, 287-297.
- Keller H, Bonnet P, Galiana E, Pruvot L, Friedrich L, Ryals J, Ricci P. (1996): Salicylic acid mediates elicitor-induced systemic acquired resistance, but not necrosis in tobacco. *Molecular plant-microbe interactions* **9**, 696-703.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tâche R., Luhová L., Barroso J. B., Petřivalský M. (2013): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosogluthione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889-902.
- Kubienová L, Tichá T, Jahnová J, Luhová L, Mieslerová B, Petřivalský M (2014): Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosogluthione reductase in plants. *Planta* **239**,139-146.
- Lebrun-Garcia A., Bourque S., Binet M.N., Ouaked F., Wendehenne D., Chiltz A., Schäffner A., Pugin A. (1999): Involvement of plasma membrane proteins in plant defense responses. Analysis of the cryptogein signal transduction in tobacco. *Biochimie* **81**, 663-668.
- Lee U., Wie C., Fernandez B.O., Feelisch M., Vierling E. (2008): Modulation of nitrosative stress by S-nitrosogluthione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **20**, 786-802.
- Leitner M., Vandelle E., Gaupels F., Bellin D., Delledonne M. (2009): NO signals in the haze. Nitric oxide signalling in plant defence. *Current opinion 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-nitrosogluthione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant signaling & behavior* **6**, 789-793.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J.S. (2001): A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490-494.
- Lochman J., Kašparovský T., Damborský J., Osman H., Marais A., Chaloupková R., Ponchet M., Blein J.P., Mikeš V. (2005): Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry* **44**, 6565-6572.
- Lochman J., Kašparovský T., Damborský J., Osman H., Marais A., Chaloupková R., Ponchet M., Blein J.P., Mikeš V. (2005): Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry* **44**, 6565-6572.

- Lucas K.A., Pitari G.M., Kazerounian S., Ruiz-Stewart I., Parl J., Schulz S., Chepenik K.P., Waldman S.A. (2000): Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological reviews* **52**, 357-413.
- Misra A. N., Misra M., Singh R. (2011): Nitric oxide ameliorates responses in plants. *Plant, soil and environment* **57**, 95–100.
- Moore K. P., Mani A. R. (2002): Measurement of Protein Nitration and S-Nitrosothiol Formation in Biology and Medicine. *Methods in enzymology* **359**, 256-268.
- Moreau M., Lindermayr Ch., Durner J., Klessig D.F. (2010): NO synthesis and signaling in plants - where do we stand? *Physiologia plantarum* **138**, 372-383.
- Morot-Gaudry-Talarmain Y., Rockel P., Moureaux T. (2002): Nitrite accumulation and NO emission in relation to cellular signaling in NiR antisense tobacco. *Planta* **215**, 708-715.
- Moulis J.M., Holmquist B., Vallee B.L. (1991): Hydrophobic anion activation of human liver chi chi alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **30**, 5743-5749.
- Nespoulous C., Huet J.C., Pernollet J.C. (1992): Structure-function relationships of  $\alpha$  and  $\beta$  elicitors, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. *Planta* **186**, 551-557.
- Odonohue M.J., Gousseau H., Huet J.C., Tepfer D., Pernollet J.C. (1995): Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding beta-cryptogein, an elicitor produced by *Phytophthora cryptogea*. *Plant molecular biology* **27**, 577-586.
- Osman H., Vauthrin S., Mikes V., Milat M. L., Panabieres F., Marais A., Brunie S., Maume B., Ponchet M., Blein J. P. (2001): Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Molecular biology of the cell* **12**, 2825-2834.
- Palmer R.M.J., Hickery M.S., Charles I.G., Moncada S., Bayliss M.T. (1993): Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **193**, 398-405.
- Picard K., Ponchet M., Blein J.-P., Rey P., Tirilly Y., Benhamou N. (2000): Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant physiology* **124**, 379-395.
- Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008): Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chemické Listy* **102**, 410-416.
- Plešková V., Kašparovský T., Obořil M., Ptáčková N., Chaloupková R., Dokládál L., Damborský J., Lochman J. (2011): Elicitor membrane interaction is driven by a positive charge on the protein surface: Role of Lys13 residue in lipids loading and resistance induction. *Plant physiology and biochemistry* **49**, 321-328.
- Ponchet M., Panabières F., Milat M.L., Mikes V., Montillet J.L., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y., Blein J.P. (1999): Are elicitors cryptograms in plant-*Oomycete* communications? *Cellular and molecular life sciences* **56**, 1020-1047.
- Reumann S., Babujee L., Ma C., Wienkoop S., Siemsen T., Antonicelli G.E., Rasche N., Lüder F., Weckwerth W., Jahn O. (2007): Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *The Plant cell* **19**, 3170-3193.
- Reynaert N. L., Ckless K., Korn S. H., Vos N., Guala A. S., Wouters E. F., van der Vliet A., Janssen-Heininger Y. M. (2004): Nitric oxide represses inhibitory  $\kappa$ B kinase through S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **101**, 8945-8950.
- Rockel P., Strube F., Rockel A. Wildt J. Kaiser W.M. (2002): Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of experimental botany* **53**, 103-110.



- Romero-Puertas M.C., Campostrini N., Matte 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.
- Rümer S., Gupta K.J., Kaiser W.M. (2009): Plant cells oxidize hydroxylamines to NO. *Journal of experimental botany* **60**, 2065-2072.
- Rusterucci C., Espunya M.C., Díaz M., Chabannes M., Martínez M.C. (2007): S-nitrosogluthione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant physiology* **143**, 1282-1292.
- Saito S., Yamamoto-Katou A., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K. (2006): Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant and cell physiology* **47**, 689-697.
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002): *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosogluthione reductase. *FEBS letters* **515**, 20-24.
- Sanghani P.C., Robinson H., Bosron W.F., Hurley T.D. (2002a): Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary, and inhibitory ternary complexes. *Biochemistry* **41**, 10778-10786.
- Sanghani P.C., Bosron W.F., Hurley T.D. (2002b): Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structural changes associated with ternary complex formation. *Biochemistry* **41**, 15189-15194.
- Sanghani P.C., Davis W.I., Fears S.L., Green S.L., Zhai, L. Tang Y., Martin E., Bryan N.S., Sanghani S.P. (2009): Kinetic and cellular characterization of novel inhibitors of S-nitrosogluthione reductase. *The Journal of biological chemistry* **284**, 24354-24362.
- Satková P., Ilík P., Luhová L., Piterková J., Lochman J., Kašparovský T., Petřivalský M: Elicitin-induced ultra-weak photon emission from tobacco as a tool for monitoring of pathogenesis process pathogen infection (nepublikovaná data).
- Serrano C., Valero A., Picado C. (2004): Nasal nitric oxide. *Archivos de bronconeumología* **40**, 222-230.
- Snyder A.H., McPherson M.E., Johnson M., Stamler J.S., Gaston B. (2002): Acute effects of aerosolized S-nitrosogluthione in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **165**, 922-926.
- Souza J.M., Peluffo G., Radi R. (2008): Protein tyrosine nitration - functional alteration or just a biomarker? *Free radical biology & medicine* **45**, 357-366.
- Staab C. A., Hellgren M., Höög J.-O. (2008): Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosogluthione reductase activities. *Cellular and molecular life sciences* **65**, 3950-3960.
- Sun X., Wasley J. W., Qiu J., Blonder J. P., Stout A. M., Green L. S., Strong S. A., Colagiovanni D. B., Richards J. P., Mutka S. C., Chun L., Rosenthal G. J. (2011): Discovery of S-nitrosogluthione reductase inhibitors: Potential agents for the treatment of asthma and other inflammatory diseases. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2**, 5849-5853.
- Tavares A.F., Nobre L.S., Melo A.M., Saraiva L.M. (2009) A novel nitroreductase of *Staphylococcus aureus* with S-nitrosogluthione reductase activity. *Journal of bacteriology* **191**, 3403-3406.
- Tesniere C., Abbal P. (2009) Alcohol dehydrogenase genes & proteins in grapevine. In *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology* (Roubelakis-Angelakis K. A., ed.), pp. 141 – 160, Springer, The Netherlands

- Tichá T. (2013) *Biochemická charakterizace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z Brassica oleracea a Lactuca sativa*, diplomová práce, UP Olomouc, Česká republika
- Tischner R., Galli M., Heimer Y.M., Bielefeld S., Okamoto M., Mack A., Crawford N.M. (2007): Interference with the citrulline-based nitric oxide synthase assay by argininosuccinate lyase activity in *Arabidopsis* extracts. *Federation of European Biochemical Societies journal* **274**, 4238-4245.
- Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernandez-Ocana A., Chaki M., Luque F., Gomez-Rodriguez M.V., Colmenero-Varea P., del Río L.A, Barroso J.B. (2007): Nitrosative stress in plants. *FEBS letters* **581**, 453-461.
- Vandelle E., Poinssot B., Wendehenne D., Bentéjac M., Alain P. (2006): Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Molecular plant-microbe interactions* **19**, 429-440.
- van der Vliet A., Eiserich J.P., Halliwell B., Cross C.E. (1997): Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite - a potential additional, mechanism of nitric oxide dependent toxicity. *The Journal of biological chemistry* **272**, 7617-7625.
- Vlot A.C., Klessig D.F., Park S.-W. (2008): Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current opinion in plant biology* **11**, 436-442.
- Wang Y.Q., Feechan A., Yun B.W., Shafiei R., Hofmann A., Taylor P., Xue P., Yang F.Q., Xie Z.S., Pallas J.A., Chu C.C., Loake G.J. (2009): S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *The Journal of biological chemistry* **284**, 2131-2137.
- Wilhelmová N., Fuksová H., Srbová M., Miková D., Mýtinová Z., Procházková D., Vytásek R., Wilhelm J. (2006): The effect of plant cytokinin hormones on the production of ethylene, nitric oxide, and protein nitrotyrosine in ageing tobacco leaves. *Biofactors* **27**, 203-211.
- Wünsche H., Baldwin I.T., Wu J. (2011): S-Nitrosoglutathione reductase (GSNOR) mediates the biosynthesis of jasmonic acid and ethylene induced by feeding of the insect herbivore *Manduca sexta* and is important for jasmonate-elicited responses in *Nicotiana attenuata*. *Journal of experimental botany* **62**, 4605-4616.
- Yang, Z. N., Bosron, W. F., Hurley, T. D. (1997): Structure of human chi chi alcohol dehydrogenase: a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Journal of molecular biology* **265**, 330-343.
- Yu L. M. (1995): Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4088-4094.
- Ziogas V, Tanou G, Filippou P, Diamantidis G, Vasilakakis M, Fotopoulos V, Molassiotis A (2013): Nitrosative responses in citrus plants exposed to six abiotic stress conditions. *Plant physiology and biochemistry* **68**, 118-126.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA/BIS	akrylamid- <i>N,N</i> -bisakrylamid
ADH3	alkoholdehydrogenasy třídy III
APS	persíran amonný
AtGSNOR	<i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasa z <i>A. thaliana</i>
BSA	hovězí sérový albumin
cADPR	cyklická adenosinfosforibosa
cPTIO	2-4-karboxyfenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxid
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
FADH	formaldehyddehydrogenasa
FW	fresh weight (čerstvá váha)
Glc	glukosa
GSH	glutathion
GSNH <sub>2</sub>	glutathionsulfinamid
GSNHOH	<i>N</i> -hydroxysulfinamidový intermediát
GSNO	<i>S</i> -nitrosoglutathion
GSNOR	<i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasa
GSOH	glutathionsulfinová kyselina
GSSG	glutathiondisulfid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
hGSNOR	lidská <i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasa
HMGSH	<i>S</i> -(hydroxymethyl)glutathion
HR	hypersenzitivní reakce
IgG	imunoglobulin G
IP <sub>3</sub>	inositoltrifosfát
LDS	dodecylsulfát lithný
MAPK	mitogen-aktivovaná proteinkinasa
MPO	myeloperoxidasa
N <sub>2</sub> O	oxid dusný
NBT	Nitroterazolium Blue chlorid
NBT-BCIP	Nitroterazolium Blue chlorid ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem
NH <sub>2</sub> OH	hydroxylamin

NH <sub>3</sub>	amoniak
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	amoniový ion
NO <sup>-</sup>	nitroxylový anion
NO	oxid dusnatý
NO <sup>+</sup>	nitrosoniový kation
NO <sup>•</sup>	radikál oxidu dusnatého
NO <sup>2-</sup>	dusitan
NO <sub>2</sub>	oxid dusičitý
NO <sub>2</sub> -BSA	nitrovaný hovézí sérový albumin
NO <sup>3-</sup>	dusičnan
NOS	syntasy oxidu dusnatého
NR	nitrátreduktasa
nsHB	nesymbiotické hemoglobiny
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superoxid
ONOO <sup>-</sup>	peroxodusitan
PK	proteinkinasa
PMS	<i>N</i> -methylphenazoniummethylsulfát
PMSF	phenylmethylsulfonylfluorid
PP	fosfatasa
PR-1	patogenesis related protein (s patogenesí související protein)
Prx	peroxiredoxiny
RNS	reactive nitrogen species (reaktivní formy dusíku)
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
RS-NO	<i>S</i> -nitrosothioly
SA	kyselina salicylová
SDS	dodecylsulfát sodný
SIGSNOR	<i>S</i> -nitrosoglutathionreduktasa ze <i>S. lycopersicum</i>
SNOs	<i>S</i> -nitrosothioly
SOD	superoxiddismutasa
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylendiamin
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	tyrosinová nitrace (v Obr. 1)
WT	wilde type (divoký typ)
3-NT	3-nitrotyrosin