

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium proteinové S-nitrosylace v průběhu patogenese

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kateřina Marková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tereza Tichá
Rok:	2015

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a 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 7.5.2015

Děkuji své školitelce Mgr. Tereze Tiché z Katedry biochemie PřF UP za odborné vedení, konzultace a poskytnutí potřebných materiálů pro vypracování teoretické i experimentální části této práce.

Dále bych chtěla poděkovat paní doc. RNDr. Michaelě Sedlářové za pomoc s kultivací patogenu a následnou inokulaci rostlin a paní laborantce Věře Zoubkové za přípravu rostlinného materiálu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Marková
Název práce	Studium proteinové S-nitrosylace v průběhu patogenese
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Tereza Tichá
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

S-nitrosylace, reverzibilní navázání NO skupiny na thiolový postranní řetězec cysteinu v proteinech, představuje jednu z důležitých posttranslačních modifikací v rámci buněčné signalizace oxidu dusnatého. Má významnou úlohu v řadě fyziologických i patofyziologických procesech rostlin. Současný výzkum různých modelových systémů rostlin je zaměřen na identifikaci endogenně S-nitrosylovaných proteinů při působení řady stresových faktorů, ať už abiotické nebo biotické povahy.

Tato práce se zabývá studiem S-nitrosylace v průběhu patogenese *Phytophthora infestans* u tří genotypů rajčete *Solanum lycopersicum* cv. Amateur, *Solanum chmielewskii*, *Solanum habrochaites* v časech 0, 24, 48, 72 a 96 hodin po inokulaci. Vzorky byly značeny pomocí metody biotin-switch a S-nitrosylované proteiny byly imunochemicky detekovány či purifikovány afinitní chromatografií. Rovněž byl stanoven obsah proteinových S-nitrosothiolů Savillovou metodou a aktivita enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR). Inokulace patogenem způsobila lokální nárůst hladiny proteinových S-nitrosothiolů (RSNO) u všech studovaných genotypů zejména v čase 72 hpi. Naopak, došlo k poklesu aktivity GSNOR, klíčového enzymu katabolismu GSNO, který jako donor NO může ovlivňovat hladinu ostatních RSNO. Detekce a následná purifikace proteinových S-nitrosothiolů potvrdila zvýšenou S-nitrosylaci 72 hpi, a to zejména u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur.

Klíčová slova	Oxid dusnatý; S-nitrosylace; S-nitrosothioly; S-nitrosoglutathionreduktasa; patogenese; <i>Phytophthora</i>
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Marková
Title	Study of protein S-nitrosylation during the pathogenesis
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Tereza Tich
The year of presentation	2015

Abstract

S-Nitrosylation, the reversible attachment of the NO group to the thiol side chain of cysteine, is one of the most important protein post-translational modifications in the nitric oxide cell signaling. It plays an important role in many plant physiological and pathophysiological processes. Current research of the various model plant systems is focused on the identification of endogenously S-Nitrosylated proteins in various stress conditions.

This work deals with the study of protein S-Nitrosylation during the pathogenesis of *Phytophthora infestans* in three genotypes of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur, *Solanum chmielewskii*, *Solanum habrochaites*) 0, 24, 48, 72, 96 hours after inoculation. Samples were labeled by the biotin-switch method and S-Nitrosylated proteins were immunochemically detected or were purified by affinity chromatography. The protein S-nitrosothiols content was determined by Saville method and the enzyme activity of S-Nitrosogluthione reductase (GSNOR) was measured. Pathogen infection caused local increase of the protein S-nitrosothiols (RSNO) level especially at 72 hpi. Conversely, the GSNOR activity was decreased. GSNOR is the key enzyme in the catabolism of GSNO which as the NO donor may influence the level of other RSNO. Detection and subsequent purification of the protein S-nitrosothiols confirmed the increased S-Nitrosylation 72 hpi, especially for genotype *S. lycopersicum* cv. Amateur.

Keywords	Nitric oxide; S-Nitrosylation; S-Nitrosothiols; S-Nitrosogluthione reductase; pathogenesis; <i>Phytophthora</i>
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Reaktivní formy dusíku	2
2.2	Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku	3
2.2.1	Nitrace	5
2.2.2	S-glutathionylace	6
2.2.3	S-nitrosylace	6
2.2.3.1	Mechanismus	6
2.2.3.2	Stabilita a odbourávání S-nitrosothiolů	8
2.2.3.3	Biologické funkce a regulace významných rostlinných proteinů prostřednictvím S-nitrosylace	10
2.2.3.4	Přehled vybraných metod pro analýzu S-nitrosothiolů a S-nitrosylovaných proteinů	15
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
3.1	Materiál a přístroje	18
3.1.1	Chemikálie	18
3.1.2	Přístroje a vybavení	19
3.2	Biologický materiál	19
3.2.1	<i>Solanum</i> spp.	19
3.2.2	<i>Phytophthora infestans</i>	20
3.2.3	Inokulace	21
3.3	Experimentální metody	22
3.3.1	Biotin-switch	22
3.3.1.1	Detekce S-nitrosylovaných proteinů pomocí anti-biotin protilátky	24
3.3.1.2	Afinitní purifikace biotinylovaných proteinů	27
3.3.2	Stanovení aktivity GSNOR	28
3.3.3	Stanovení obsahu S-nitrosothiolů	29
3.3.4	Detekce GSNOR metodou Western blot	30
3.3.5	Stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové	31
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1	Vizuální hodnocení symptomů po inokulaci <i>P. infestans</i>	32
4.2	Optimalizace podmínek extrakce S-nitrosylovaných proteinů	33
4.3	Optimalizace metody biotin-switch	35
4.4	Detekce a purifikace S-nitrosylovaných proteinů v průběhu patogeneze <i>P. infestans</i>	37
4.5	Stanovení obsahu proteinových S-nitrosothiolů a GSNOR aktivity	42
4.6	Vliv mechanického poškození abaxiální strany listu na hladinu proteinových RSNO a aktivitu GSNOR	45
5	ZÁVĚR	46
6	LITERATURA	47
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	53

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo vypracování literární rešerše zaměřené na charakterizaci S-nitrosylace, klíčové posttranslační modifikace cysteinových residuí v proteinech (mechanismus, stabilita a odbourávání S-nitrosothiolů, význam u fyziologických i patofyziologických procesů rostlin).

V experimentální části práce bylo cílem detekovat S-nitrosylované proteiny pomocí metody biotin-switch u patosystému rajčete *Solanum lycopersicum* cv. Amateur, *Solanum chmielewskii*, *Solanum habrochaites* a houbového patogenu *Phytophthora infestans* (plíseň bramborová) 24, 48, 72 a 96 h po inokulaci. Dále byl stanoven obsah S-nitrosothiolů a změny aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy u modelového patosystému v rámci řešení úlohy reaktivní forem dusíku v obranném mechanismu rostlin.

1 Úvod

Oxid dusnatý (NO) patří k nejjednodušším biologicky aktivním molekulám. Uplatňuje se zejména v regulaci růstu rostlin, vývojových procesů a také signální kaskády vlivem stresových podmínek. Biosyntéza NO probíhá různými enzymatickými i neenzymatickými reakcemi v závislosti na povaze stimulace. S-nitrosothioly (RSNO) představují hlavní zásobní a transportní formy NO *in vivo*. Je známo, že v rostlinných systémech RSNO chrání buňky při fyziologických koncentracích proti nitrosativnímu nebo oxidativnímu stresu. S-nitrosoglutathion (GSNO), stabilní sloučenina vzniklá reakcí NO s glutathionem, představuje nejvýznamnější nízkomolekulární RSNO. Jeho NADH-dependentní denitrosylaci díky aktivitě S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) vzniká oxidovaný glutathion a amoniak. Díky své struktuře se GSNOR může podílet na katabolismu ostatních S-nitrosothiolů a přispívat k udržování homeostázy NO v buňkách.

S-nitrosylace je významnou posttranslační modifikací proteinů. Jedná se o reversibilní selektivní kovalentní vazbu –NO skupiny na cysteinová residua cílových proteinů. S-nitrosylace může ovlivnit funkci proteinu, jeho stabilitu a lokalizaci v buňce. Řada důležitých rostlinných proteinů podléhá regulaci prostřednictvím S-nitrosylace, což poukazuje na její významné zapojení v signálních drahách rostlinných hormonů, indukci apoptosy, regulaci aktivity antioxidantních enzymů a kontrole metabolismu sacharidů v buňce.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku (RNS) jsou významné signální molekuly v řadě fyziologických a patologických procesech u rostlin i živočichů. Tyto sloučeniny jsou odvozené od oxidu dusnatého (NO) a mohou vznikat jeho redukcí i oxidací. Vyskytují se ve formě nenabitého volného radikálu ($\cdot\text{NO}$), v redukované formě jako nitroxylový aniont (NO^-) nebo v oxidované formě jako nitrosoniový kationt (NO^+). Mezi další RNS patří oxid dusný (N_2O), oxid dusitý (N_2O_3) nebo oxid dusičitý (NO_2). V nabitě formě jsou dále dusitan (NO_2^-), dusičnan (NO_3^-), peroxydusitan (ONOO^-), peroxydusičnan (O_2NOO^-) a nitrosoperoxokarbonát (ONOOCO_2^-). Další významnou formu RNS představují S-nitrosothioly (RSNO) (Hill *et al.*, 2010).

Biologická aktivita NO je způsobena velikostí molekuly a díky lipofilní povaze může volně procházet buněčnou membránou. Další výhodou je krátký poločas rozpadu, a to méně jak 6 sekund, což přispívá k vysoké reaktivitě *in vivo* (Thomas *et al.*, 2001). U živočichů bylo zjištěno, že se podílí v řadě fyziologických procesů, jako je vasorelaxace, neurotransmise, regulace imunity, ale i patologických jevů (Luiking *et al.*, 2010). Velkou roli hraje v kardiovaskulární patologii, kdy ovlivňuje vysoký krevní tlak, aterosklerózu nebo angiogenezi (Chen, 2008), dále se podílí na vzniku diabetu způsobeného inzulinovou rezistencí, na vzniku hypercholesterolemie (Cai & Harrison, 2000) a v neposlední řadě můžou vysoké koncentrace NO vést k neurodegeneraci (Moncada & Bolanos, 2006). U rostlin se podílí na regulaci růstových a vývojových procesů, jako je například dormance semen a klíčení (Neill *et al.*, 2002), vegetativní růst stonku (Tun *et al.*, 2006) a vývoj kořenů (Stöhr & Stremlau, 2006). Důležitou roli má také v průběhu senescence (Leshem *et al.*, 1998) a jako regulátor řady enzymů v buněčných organelách, například mitochondriální cytochrom c oxidasy (Brown & Borutaite, 2002), peroxisomální katalasy i askorbátperoxidasy (Clarke *et al.*, 2000) a cytosolární akonitasy (Navarre *et al.*, 2000). NO je významným regulátorem signální kaskády vlivem stresových podmínek při působení abiotických i biotických stresových faktorů (Groß *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014) a podílí se na programované buněčné smrti (Vandelle *et al.*, 2006), hypersenzitivní reakci (Delledonne *et al.*, 1998) i na systémové odezvě (Capone *et al.*, 2004). Signální dráhy NO mohou být cGMP-závislé a cGMP-nezávislé. Podstatou dráhy závislé

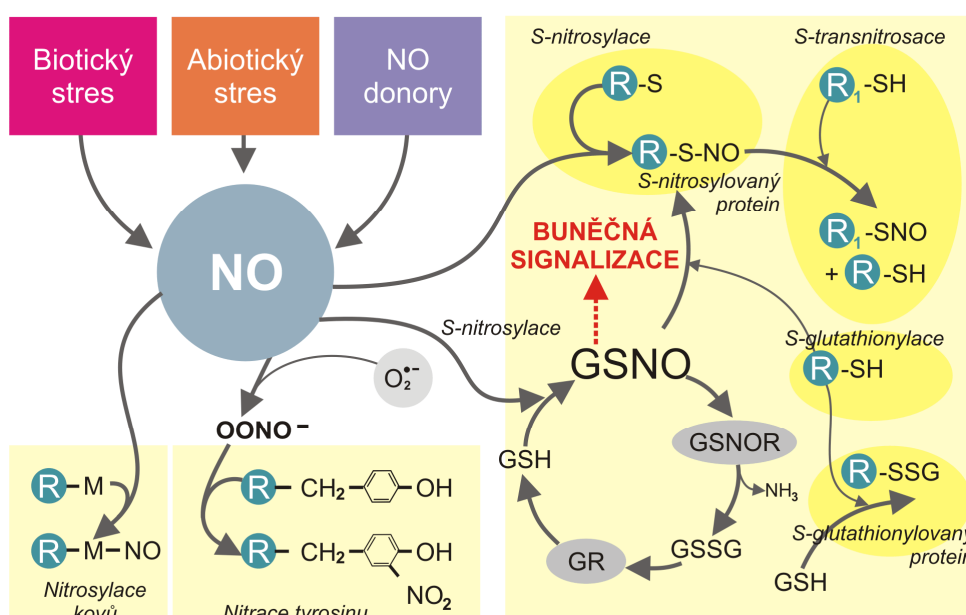
na cGMP je vazba NO na hemovou prosthetickou skupinu guanylátcyklasy, takto způsobené konformační změny výrazně zvýší produkci cGMP. cGMP-nezávislá dráha spočívá v aktivaci proteinkinasy aktivovaným mitogenem (Klessig *et al.*, 2000).

Vznik NO u živočichů je především podmíněn aktivitou NO-synthasy (EC 1.14.13.39). Tento enzym katalyzuje oxidaci L-argininu na L-citrulin a uvolňuje se NO. U rostlin může NO vznikat enzymatickou i neenzymatickou cestou. Klíčovou enzymatickou produkci NO představuje NAD(P)H-závislá redukce dusičnanů na dusitan (Yamasaki & Sakihama, 2000), která je katalyzována cytosolární nitrátreduktasou (EC 1.7.1.3) (Wendehenne *et al.*, 2001). Dalším zdrojem NO je nitrit:NO reduktasa (EC 1.7.2.1), která se nachází na cytoplasmatické membráně. V cytoplasmě i chloroplastech byl popsán výskyt enzymu podobnému NOS („NOS-like“ enzym, Daekyung *et al.*, 2006). U nižších rostlin byl charakterizován v zelené řase *Ostreococcus tauri* a porovnáváním aminokyselinových sekvencí bylo zjištěno, že je z 45% identický s lidskou indukibilní a neuronální NOS a z 44% identický s lidskou endoteliální NOS. U vyšších rostlin nebyly nalezeny homologní geny s NOS u savců či řas (Forresi *et al.*, 2010), avšak v izolovaných hrachových peroxisomech byla popsána intenzivní tvorba NO díky aktivitě enzymu podobnému NOS (Corpas & Barroso, 2014). Vznik NO může být podmíněn také neenzymatickou cestou, a to například vlivem nízkého pH nebo světelným zářením. Snížením pH v apoplastu dochází k redukci dusitanů, zredukovaný dusitan poté dismutuje na NO a dusičnan. Také může proběhnout chemická redukce dusitanu na NO za fyziologických podmínek pH v přítomnosti kyseliny askorbové, která se sama oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou. Za světelných podmínek je možné zredukovat NO₂ na NO, tento proces se vyskytuje v membráně chloroplastů a probíhá za katalýzy karotenoidy (Cooney *et al.*, 1994).

2.2 Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku

Mnoho proteinů je po translaci na ribozomech reverzibilně i ireverzibilně modifikováno a tyto úpravy jsou základním mechanismem buněčné signalizace. Proteiny mohou být upravovány například fosforylací, glykosylací, methylací, sulfatací nebo ubikvitinylací (Mann & Jensen, 2003). Významnou modifikací je také nitrace nebo nitrosylace, kdy proteiny interagují s RNS. *In vivo* byla charakterizována nitrace tyrosinu za tvorby 3-nitrotyrosinu a nitrace tryptofanu, kdy vzniká 6-nitrotryptofan.

Nitrosylace probíhá na thiolové skupině cysteinu a vzniká S-nitrosocystein. Další modifikací může být navázání RNS na kovová centra proteinů (Gow *et al.*, 2004). V případě, že s RNS interagují reaktivní formy kyslíku (ROS) a vznikají silná nitrosační činidla, jedná se o tzv. nitrosativní stres. Na Obr. 1 je uvedeno schéma posttranslačních modifikací, které jsou odvozeny od NO. Jak již bylo zmíněno, abiotické i biotické stresové faktory stimuluji vyšší produkci NO a dochází k nitrosylaci kovů, nitraci či S-nitrosylaci. Stabilní sloučeninu odvozenou od NO představuje S-nitrosoglutathion (GSNO), který vstupuje do řady reakcí a má významnou funkci v signálních dráhách.



Obr. 1 Posttranslační modifikace zprostředkované oxidem dusnatým a metabolismus S-nitrosoglutathionu v buňkách. Působením biotických i abiotických stresových faktorů a také přidavkem donorů NO dochází ke zvýšené produkci NO, který se může dále podílet v procesech nitrosylace kovů, nitrace tyrosinových residuí a S-nitrosylace. Vazbou NO na cysteinové residuum redukováného glutathionu (GSH) vzniká stabilní S-nitrosoglutathion (GSNO), ten může dále iniciovat buněčnou signalizaci. S-nitrosoglutathionreduktasa katabolizuje GSNO za vzniku glutathiondisulfidu (GSSG). GSSG je substrátem glutathionreduktasy (GR) a dochází k regeneraci redukováného GSH. GSNO představuje nejvýznamnější nízkomolekulární RSNO a specificky reaguje s volnými sulfhydrylovými skupinami proteinů (tzv. S-transnitrosace) a umožňuje tak vznik vysokomolekulárních RSNO. S-transnitrosační reakce může probíhat i mezi proteiny, S-nitrosylovaný protein (R-SNO) reaguje se sulfhydrylovou skupinou jiného proteinu (R₁-SH) za vzniku R₁-SNO. S-glutathionylace představuje reakci redukováného glutathionu (GSH) se specifickou sulfhydrylovou skupinou cílového proteinu. Upraveno podle Corpas *et al.*, 2013 a Freschi *et al.*, 2013.

2.2.1 Nitrace

Principem nitrace je selektivní navázání nitro skupiny (-NO₂) na tyrosinové, tryptofanové, cysteinové nebo methioninové residuum cílového proteinu. Nejtypičtějším případem nitrace je vznik 3-nitrotyrosinu, kdy se skupina -NO₂ naváže do *ortho*- polohy vzhledem k hydroxyly aromatického kruhu tyrosinového residua. Vlivem této vazby dochází ke změnám konformace proteinu a tím dochází ovlivnění jeho biologické aktivity. Navázání nitroskupiny silně snižuje pK_a hydroxylové skupiny a tím se také snižuje její reaktivitu při fosforylaci, což vede k útlumu některých signálních mechanismů (Gow *et al.*, 2004) Nitrace a fosforylace tyrosinu jsou tedy kompetitivní procesy, které jsou ovlivněné koncentrací RNS. Milimolární nárůst hladiny peroxydusitanu může způsobit inhibici fosforylace, zastavení signálních drah závislých na fosforylaci a v konečném důsledku je zahájena apoptosa (Klotz *et al.*, 2002).

Nitračním činidlem může být radikál oxidu dusnatého ($\cdot\text{NO}$), radikál oxidu dusičitého ($\cdot\text{NO}_2$), peroxydusitan (ONOO^-), dusitan (NO^-) nebo nitrosoniový kationt (NO^+). Selektivita reakce je ovlivněna třemi kritickými faktory. Prvním je vzdálenost místa syntézy nitračního činidla od cílového proteinu, dále množství proteinu a počet jeho tyrosinových residuí, nakonec primární sekvence v okolí potencionálně nitrovaného tyrosinu (Ischiropoulos, 2003). Intenzivnější nitrace proteinů je pozorována u rostlin, které jsou vystaveny stresovým podmínkám. Nitrovaný tyrosin je často považován za marker nitrosativního stresu. Bylo ale pozorováno, že vyšší hladiny nitrovaného tyrosinu se objevují nejen u rostlin vystavených abiotickým i biotickým stresovým podmínkám, ale i u zcela zdravých rostlin. Tento poznatek potvrzuje možnost regulace metabolických drah pomocí nitrace proteinů i za fyziologických podmínek (Chaki *et al.*, 2009). U proteomické analýzy *Arabidopsis*, která byla napadena patogenem *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* byl pozorován nárůst nitrace při hypersenzitivní reakci a identifikovalo se 11 specificky nitrovaných proteinů. Tyto proteiny se především účastní fotosyntézy, glykolýzy a asimilace dusičnanů (Cecconi *et al.*, 2009).

2.2.2 S-glutathionylace

Podstatou S-glutathionylace je vytvoření stabilní disulfidové vazby mezi reaktivními thiolovými skupinami cysteinových residuí proteinů a glutathionem (GSH, γ -glutamylcysteinylglycin). Reakci umožňují reaktivní intermediáty vznikající rozpadem GSNO. Tato modifikace proteinů ochraňuje cysteinová residua před jejich nevratnou oxidací, mění konformaci proteinů a tím ovlivňuje stabilitu a aktivitu modifikovaného proteinu.

S-glutathionylace u rostlinných proteinů hraje roli v mechanismech redoxní signalizace (Zaffagnini *et al.*, 2011). Tato reakce je katalytickou součástí všech enzymů, které jsou závislé na glutathionu, například glutathionreduktasy (EC 1.8.1.7), dehydroaskorbátreduktasy (EC 1.8.5.1), methioninsulfoxidreduktasy (EC 1.8.4.13) nebo některé glutaredoxiny a peroxiredoxiny (Arscott *et al.*, 2000; Dixon *et al.*, 2002; Tarrago *et al.*, 2009; Rouhier, 2010).

2.2.3 S-nitrosylace

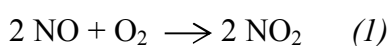
S-nitrosylace je reverzibilní modifikace proteinů a v současné době je považován za jeden z nejdůležitějších mechanismů posttranslační modifikace proteinů (Gaston *et al.*, 2003). Principem S-nitrosylace je kovalentní navázání skupiny -NO na thiolovou skupinu (-SH) cysteinového residua proteinu (Hoffmann *et al.*, 2003). Vzniklé produkty S-nitrosothioly mají obecnou strukturu RS-NO. S-nitrosylace je řazena mezi tzv. redoxní signální dráhy, které jsou založené na redoxních změnách efektorových molekul (Gaston *et al.*, 2003).

2.2.3.1 Mechanismus

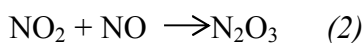
V závislosti na charakteru vznikající vazby mezi NO skupinou a thiolem rozlišujeme dva typy mechanismů, nitrosační a nitrosylační. Jako nitrosace je označena modifikace, při které vzniká mezi NO^+ skupinou a thiolem kovalentní vazba. Při nitrosylaci se vytváří koordinačně kovalentní vazba mezi thiolem a radikálem NO^\cdot . S-nitrosylace byla poprvé popsána roku 1992 u sérového albuminu (Stamler *et al.*, 1992). Později se prokázalo, že jde spíše o experimentální artefakt (Herold *et al.*, 2003). Později byla objevena řada dalších proteinů, které této modifikaci podléhají. Mechanismů bylo navrženo hned několik, ale stále není zcela zřejmé, který převládá *in vivo*.

NO reaguje s oxidanty, především s O₂, O₂⁻ a vznikají oxidy dusíku s vyšším oxidačním stavem (1). Reakcí s redukovanými thioley vznikají radikálové meziprodukty, které po odštěpení vodíkového protonu a jednoho elektronu poskytují S-nitrosothioly (RSNO) (4). Ionty přechodných kovů (Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Cr³⁺) reagují s NO za tvorby NO⁺ a slouží jako katalyzátory S-nitrosylace.

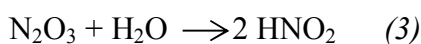
Možný mechanismus S-nitrosylace v anaerobním prostředí popsal Kharitonov *et al.*, 1995 jako proces probíhající prostřednictvím tvorby reaktivních oxidů dusíku jako je N₂O₃ nebo N₂O₄ (dimer NO₂). Celý tento mechanismus popisují čtyři základní rovnice a je schematicky uveden na Obr. 2. Prvním krokem je reakce NO s kyslíkem, který slouží jako akceptor elektronů (1).



Dalším krokem je tvorba nitrosačního činidla N₂O₃ (2).

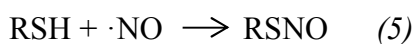


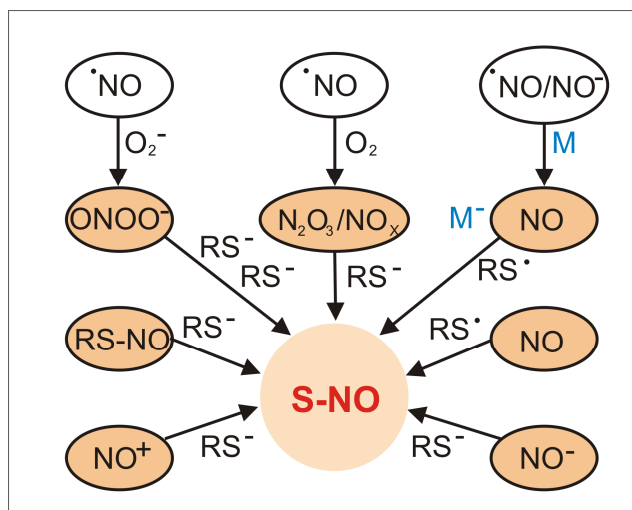
První i druhá reakce jsou limitujícími kroky rychlosti S-nitrosylace. Další reakcí je hydrolyzáza činidla a poslední je reakce s thioley (3).



Třetí reakce se čtvrtou reakcí kompetuje. Studie *in vitro* prokázaly, že již při milimolární koncentraci GSH veškerý N₂O₃ reaguje za tvorby GSNO (Kharitonov *et al.*, 1995).

Jiný mechanismus popisuje vznik RSNO reakcí thiolu s nitrosoniovým iontem (NO⁺) nebo reakcí thiolu s peroxydusitanem, který může vzniknout reakcí NO se superoxidem O₂⁻ (Lancaster *et al.*, 2008). Reakční mechanismus, který popisuje vznik RSNO přímo reakcí NO[•] (5) s thioley navrhl Gow *et al.*, 1997. Mechanismus běží i za anaerobních podmínek za účasti jiného akceptoru elektronů, např. NAD⁺. První krok reakce spočívá ve tvorbě radikálového meziprojektu, v dalším kroku se meziprojekt v přítomnosti akceptoru elektronů mění na RSNO (6).



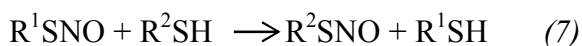


Obr. 2. Přehled nejdůležitějších cest vedoucích k tvorbě S-nitrosothiolů (S-NO). Oxid dusnatý ve formě volného radikálu NO· reaguje především se superoxidem (O_2^-), kyslíkem nebo s kovy (M), což vede ke tvorbě nitrosačních činidel jako je peroxydusitan ($ONOO^-$), oxidy dusíku (N_2O_3 , NO_x) nebo ke vzniku komplexu kovu s NO ($M-NO$). Kromě toho radikál NO· také reaguje s thiolovým radikálem (RS^\cdot). Dále může probíhat reakce nitroxylového aniontu (NO^-) či nitrosoniového kationtu (NO^+) s thiolovým aniontem (RS^-) za vzniku (R)S-NO. Také mohou probíhat transnitrosační reakce, kde dochází k přenosu NO skupiny mezi různými thioley (upraveno podle Kovacs & Lindermayr, 2013).

2.2.3.2 Stabilita a odbourávání S-nitrosothiolů

Vazba mezi atomem síry a -NO skupinou je silně polární a není nijak stericky chráněna, proto jsou RSNO poměrně nestabilní, snadno uvolňují NO a jsou vhodné jako zásobní a transportní molekuly NO *in vivo*. Byla také identifikována skupina velice stabilních RSNO (Paige *et al.*, 2008). Stabilita NO skupiny těchto proteinů je pravděpodobně zabezpečena změnou konformace proteinu, která dokáže NO skupinu ochránit před přístupem redukčních činidel. Míra stability jednotlivých RSNO je různá a odlišně stabilní RSNO mají v signálních drahách odlišnou funkci. RSNO mohou podléhat transnitrosačním reakcím, S-thiolaci nebo mohou působit přímo.

Reakci, při které dochází k přenosu -NO skupiny z RSNO na thiolovou skupinu jiného substrátu, nazýváme transnitrosační reakcí. Thiolátový aniont je nukleofil atakující dusík nitrosylové skupiny (7).



Tato reverzibilní reakce se považuje za jeden z regulačních mechanismů, neboť bylo prokázáno, že transnitrosace thiolových skupin ovlivňuje enzymovou aktivitu (Hogg, 2000).

S-thiolace je reakce, při které vzniká nitroxylový aniont a příslušný disulfid (8). Dříve byla S-thiolace považována za odpověď buňky na oxidační stres. Dnes je známo, že se tato reakce vyskytuje v prostředí s vyšší koncentrací RSNO.

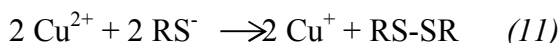
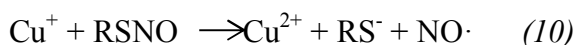


Dalším efektem RSNO je samotné přímé působení. GSNO může sloužit jako substrát i inhibitor enzymů využívajících glutathion například γ -glutamyltranspeptidasa (EC 2.3.2.2) nebo glutathionperoxidasa (EC 1.11.1.9) (Hogg, 2000).

RSNO jsou degradovány enzymatickou i neenzymatickou cestou. Stabilitu ovlivňují světelné podmínky, teplota, pH, přítomnost O₂ a kationtů některých kovů. RSNO se rozkládají monomolekulární reakcí nebo redukčním štěpením za přítomnosti kationtů, zejména měďných, stříbrných či rtuťnatých (Swift & Williams, 1997). Monomolekulární štěpení vazby mezi thiolovou skupinou a nitro skupinou může být heterolytické za vzniku NO⁺ nebo NO⁻, nebo homolytické za vzniku NO a disulfidu. Homolytické štěpení je fyziologicky významnější neboť má nižší energii. Radikály NO[•] a RS[•] vznikají homolytickým štěpením na ultrafialovém světle (9) (Noble & Williams, 2000).



Rozklad RSNO katalyzován Cu⁺ ionty (10,11).

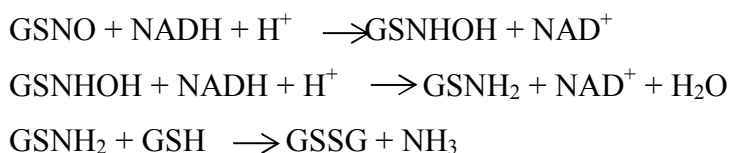


Rozklad je v tomto případě významně ovlivněn strukturou S-nitrosylovaného proteinu a je možné ho potlačit přítomností chelatačního činidla jako je například ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) nebo neocuproin. Ionty Cu⁺ vznikají redukcí thiolátů RS⁻ nebo se mohou tvořit z Cu²⁺ iontů navázaných na proteinech. Rozklad S-nitrosothiolů je katalyzován i dalšími ionty kovů, například ionty rtuti, čehož se využívá při Savillově metodě pro spektrofotometrické stanovení RSNO.

S-nitrosothioly jsou také odbourávány redukčním prostředím cytosolu. Účinným redukčním činidlem je například glutathion (GSH), jehož intracelulární koncentrace přímo ovlivňuje některé RSNO (Clementi *et al.*, 1998) a S-nitrosylace probíhá pouze při vysoké hladině NO. Před tímto prostředím jsou RSNO chráněny v buněčné membráně, ve váčcích nebo obklopeny hydrofobními částicemi (Rafikova *et al.*, 2002).

Mechanismus transnitrosace a katabolismus nízkomolekulárních RSNO byl již popsán, ale stále není jasná specifická regulace. Největší význam má S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR; EC 1.1.1.284), dříve označovaná jako

glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa, která se vyskytuje ve většině tkání či pletiv. Tento enzym je klíčový pro katabolismus GSNO a tím nepřímo ovlivňuje i hladinu ostatních RSNO v buňce (Liu *et al.*, 2001). GSNOR patří mezi alkoholdehydrogenasy třídy III a katalyzuje za účasti NADH ireverzibilní přeměnu GSNO na glutathiondisulfid (GSSG) a amoniak:



Další možností odbourávání S-nitrosylovaných proteinů je pomocí thioredoxinreduktasy (TR, EC 1.8.1.9), kdy dochází transnitrosační reakci mezi RSNO a thioredoxinem (Mitchell *et al.*, 2007). Thioredoxin je S-nitrosylován na Cys69 a může být redukován TR. Mechanismus není stále objasněn, ale je jisté že tento systém má význam při ochraně intracelulárního prostředí před nitrosačním stresem (Haendeler *et al.*, 2002).

2.2.3.3 Biologické funkce a regulace významných rostlinných proteinů prostřednictvím S-nitrosylace

S-nitrosothioly jsou významnou součástí signálních drah NO. Jsou hlavními donory NO v biologických systémech a jejich účinnost je založena na jeho uvolňování po reakci s volnými kyslíkovými i lipidovými radikály, které mohou mít toxický účinek (Shahani & Sawa, 2011). U rostlin zabezpečují RSNO ve fyziologických koncentracích ochranu buněk před nitrosativním nebo oxidativním stresem a jejich zvýšené hladiny můžeme pozorovat u rostlin napadených patogenem (Feechen *et al.*, 2005). Jak již bylo zmíněno, zásadní roli při regulaci hladiny NO a GSNO má enzym GSNOR katalyzující tvorbu glutathiondisulfidu a amoniaku z dvou molekul GSNO (Sakamoto *et al.*, 2002). Ačkoli nebylo dosud prokázáno, že by tento enzym byl přímo regulován S-nitrosylací, je jisté, že GSNOR ovlivňuje rychlost S-nitrosylace. Při zvýšené hladině S-nitrosylovaných proteinů můžeme pozorovat nízkou aktivitu GSNOR (Chaki *et al.*, 2011). GSNOR má tedy významnou roli v kontrole hladiny S-nitrosylovaných proteinů a to pravděpodobně tak, že řídí proces transnitrosylace mezi GSH a S-nitrosylovanými proteiny.

Transnitrosační reakcí RSNO může dojít k přenosu NO skupiny na jinou proteinovou strukturu. Navázání NO na thiolovou skupinu cysteinového residua ovlivňuje celkovou konformaci proteinu, a tím také mění jeho některé vlastnosti. Významná je změna aktivity takto modifikovaného proteinu, která se uplatňuje v řadě fyziologických i patologických procesech (Haendeler *et al.*, 2002).

Významný proces, který je S-nitrosylací regulován je apoptosa neboli programovaná buněčná smrt. K zahájení k apoptotické signální kaskády slouží kaspasy, což jsou proteasy obsahující ve svém aktivním místě cystein. Prvním krokem je vytvoření proenzymu kaspasy, který je dále štěpen za vytvoření aktivního tetramerního enzymu. Iniciační kaspasy poté mohou aktivovat efektorové kaspasy, které již mohou štěpit specifické proteiny a dochází tak k aktivaci celého procesu buněčné smrti (Martínez-Ruiz *et al.*, 2007). S-nitrosylace cysteinových residuí v aktivním místě kaspas má anti-apoptotický účinek. Proto je většina proenzymů kaspas za klidových podmínek v buňce S-nitrosylována (Kim *et al.*, 1997). U *Arabidopsis* byla popsána S-nitrosylace cysteinu 147 u metakaspasy 6 (Belenghi *et al.*, 2007). Při apoptose se takto modifikovaný proenzym uvolní z mitochondrie do cytoplasmy. Redukční prostředí cytoplasmy poté denitrosyluje kaspasu a tím je aktivována. Za určitých podmínek mohou NO, peroxydusitan i RSNO působit proapoptoticky. Vysoká hladina NO vede k otevření pórů vnitřní mitochondriální membrány a cytochrom c se tak může uvolnit do cytosolu a aktivovat apoptotickou signální dráhu (Brookes *et al.*, 2002; Schonhoff *et al.*, 2003).

U *Arabidopsis thaliana* bylo identifikována asi 100 proteinů, které jsou S-nitrosylovány (Lindermayr *et al.*, 2005). Většinou jsou modifikovány signální, regulační nebo stresové proteiny a také i antioxidantní enzymy (Tab. 1). V současné době jsou nejčastěji studovány S-nitrosylované proteiny účastníci obranných reakcí rostlin, zejména peroxiredoxin II E (PrxIIIE), Nonexpressor of Pathogenesis-Related proteins 1 (NPR1), NADPH oxidasa, glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH), metakaspasa (AtMC3), protein vázající kyselinu salicylovou (SABP3) nebo transkripční faktor (TGA1).

Peroxiredoxiny představují skupinu thiol-specifických enzymů schopných detoxifikovat řadu peroxidových substrátů. PrxIIIE je lokalizován ve stromatu chloroplastů (Dietz, 2011). Podílí se na redoxní signalizaci během fotosyntézy či respiraci. Díky jeho významným antioxidantním účinkům je také důležitý při odstraňování reaktivních forem kyslíku produkovaných za stresových podmínek (Perazzolli *et al.*, 2004). S-nitrosylace PrxIIIE byla popsána u *Arabidopsis* infikovaných

avirulentním bakteriálním patogenem *Pseudomonas syringae*, kdy byla pozorována změna aktivity navázáním NO na cystein 121 (Romero-Puertas *et al.*, 2007). S-nitrosylace byla popsána také u cytosolární formy Prx II B a mitochondriální Prx II F po přidavku GSNO k buněčné kultuře *Arabidopsis* (Lindermayr *et al.*, 2005).

Tab. 1 Příklady vybraných rostlinných proteinů regulovaných prostřednictvím S-nitrosylace.

Funkční třída proteinu	Identifikovaný protein	Stimulace	Efekt	Cys-NO	Rostlina
Metabolismus	GADPH	GSNO, salinita, patogen, nadměrné ozáření	(-)	155, 159	<i>A. thaliana</i>
					<i>N. tabacum</i>
Fotosyntéza	Methioninadenosyltransferasa 1	GSNO	(-)	144	<i>A. thaliana</i>
					<i>A. thaliana</i>
	Velká podjednotka RUBISCO	GSNO, nízká teplota	(-)	192, 427	<i>B. juncea</i>
					<i>K. pinnata</i>
Fotosystém I apoprotein A2	Konstitutivní	?	559	<i>A. thaliana</i>	
				<i>B. juncea</i>	
Signalizace	Tubulin β	GSNO	?	56	<i>A. thaliana</i>
	Auxinový receptor TIR1	GSNO	(+)	140	<i>A. thaliana</i>
	Transkripční faktor MYB2	GSNO	(-)	53	<i>A. thaliana</i>
	NPR1	GSNO	(-)	156	<i>A. thaliana</i>
	TGA1	GSNO	(+)	172, 287	<i>A. thaliana</i>
Zpracování genetické informace	Kalnexin CNX1	Konstitutivní	?	108	<i>A. thaliana</i>
	Elongační faktor EF-1 α	GSNO	?	87	<i>A. thaliana</i> <i>B. juncea</i>
Transportéry a kanály	Vakuolární ATPasová podjednotka	Konstitutivní	?	201	<i>A. thaliana</i>
	Fosfátový transportér (PHT3;1)	Konstitutivní	?	104	<i>A. thaliana</i>
	Adenylátový translokátor	Konstitutivní	?	130	<i>A. thaliana</i>
Produkce ROS	NADPH oxidasa	GSNO, patogen	(-)	890	<i>A. thaliana</i>
Detoxifikace ROS	Askorbátperoxidasa	GSNO, plynný NO	(-)	32	<i>A. thaliana</i> <i>A. toxicaria</i> <i>C. aurantium</i>
Detoxifikace ONOO ⁻	Katalasa	GSNO	(-)	230	<i>P. sativum</i>
	Peroxiredoxin II E	GSNO, patogen	(-)	121	<i>A. thaliana</i>
Štěpení proteinů	Metakaspasa AtMC9	Konstitutivní	(-)	147	<i>A. thaliana</i>
	Cystein-proteasa RD21	Konstitutivní	?	233, 342	<i>A. thaliana</i>

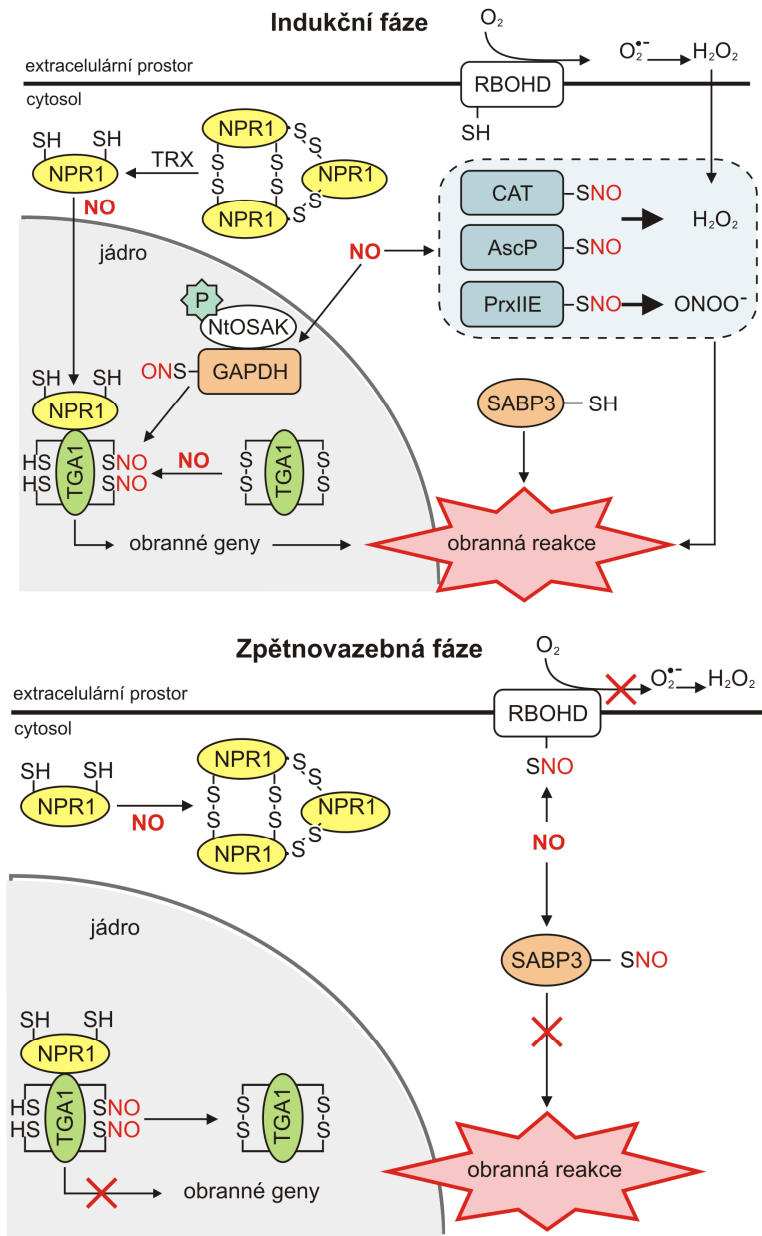
Konstitutivní = konstitutivní S-nitrosylace; (+) aktivace, (-) inhibice, ? efekt není znám; Cys-NO = specifické cysteinové residuum podléhající S-nitrosylaci; *A. thaliana*, *Arabidopsis thaliana*; *N. tabacum*, *Nicotiana tabacum*; *C. aurantium*, *Citrus aurantium*; *K. pinnata*, *Kalanchoe pinnata*; *O. sativa*, *Oryza sativa*; *B. juncea*, *Brassica juncea*; *A. toxicaria*, *Antiaris toxicaria*

Yun *et al.*, 2011 provedli rozsáhlejší studii *in vivo Arabidopsis* infikovaných *Pseudomonas syringae pv. tomato* (avrB). Mikrobiální infekce vede k rychlé syntéze NO a také ROS, generovaných především NADPH oxidasou, které jsou klíčové pro spuštění programované buněčné smrti v místě infekce. Bylo zjištěno, že po infekci vedla zvýšená hladina S-nitrosothiolů ke změně průběhu hypersenzitivní reakce, byl pozorován pokles hladiny kyseliny salicylové i intermediátů ROS. Vysoká hladina NO způsobila S-nitrosylaci Cys890, klíčovém residuu NADPH oxidasy u *Arabidopsis* (AtRBOHD), a došlo tak ke snížení její aktivity. Experimenty provedené *in vitro* s rekombinantním enzymem a mutace konzervovaného Cys890 potvrdily snížení aktivity AtRBOHD prostřednictvím S-nitrosylace. Tímto způsobem patrně rostliny regulují vývoj buněčné smrti v průběhu hypersenzitivní reakce.

Klíčovým regulátorem obranných reakcí je protein NPR1. Neaktivní protein je tvořen oligomery, které jsou vzájemně spojené disulfidovými můstky. Pokud dojde k rozpadu disulfidové vazby, uvolní se monomer, který je již aktivní (Dong, 2004). Oligomerizace je podpořena S-nitrosylací cysteinu 156 (Tada *et al.*, 2008). Aktivní monomer je poté transportován z cytosolu do jádra, kde stimuluje aktivaci transkripčních faktorů, jako je TGA1 (Dong, 2004). NO také přímo ovlivňuje TGA1. S-nitrosylace na cysteinu 172 a 287 aktivuje vazebnou aktivitu na příslušnou sekvenci a vede tak k transkripci obranných genů (Lindermayr *et al.*, 2010).

Další redoxně regulovaný enzym je glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH). U rostlin má tento glykolytický enzym dvě isoformy, jednu v cytosolu, druhou a v plastidech. Obě tyto izoformy jsou translokovány do jádra (Anderson *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že enzym má i neglykolytické funkce, kterými je obrana proti virové infekci, DNA-vazebná aktivita nebo vývoj kořene a pylu (Holtgreffe *et al.*, 2008; Prasanth *et al.*, 2011). Bylo zjištěno, že tabákové izoformy GAPDH interagují s protein kinasou NtOSAK (osmoticky stresem aktivovaná proteinkinasa u *Nicotiana tabacum*) v cytosolu. Vlivem fosforylace NtOSAK poté tvoří komplex s GAPDH a tímto způsobem ji aktivují (Burza *et al.*, 2006).

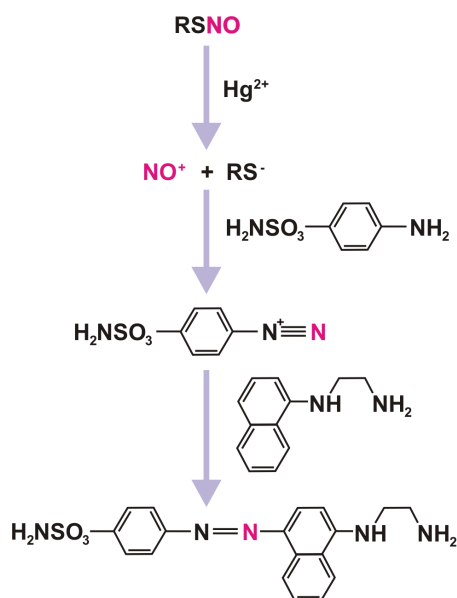
Na Obr. 3 je ilustrován hypotetický model, jehož cílem je objasnit zapojení S-nitrosylace v obranných reakcích rostlin, a to v indukční i zpětnovazebné fázi.



Obr. 3 Hypotetický model zapojení S-nitrosylace v obranné reakci rostliny. V indukční fázi NO vznikající v reakci na patogen způsobuje translokaci monomerní NPR1 do jádra. Přeměna NPR1 z oligomeru na monomer je podporována thioredoxinem (TRX). V jádře interaguje monomerní NPR1 s transkripčním faktorem TGA1, který je aktivován S-nitrosylací. Vznik komplexu TGA1-NPR1 umožňuje vazbu TGA1 na sekvenční element 1, který je nedílnou součástí obranných genů a dochází tak k jejich expresi. Jiná, avšak více spekulativní hypotéza je popsána v případě tzv. nitrosylasové aktivity GAPDH. S-nitrosylace TGA1 může být zprostředkována S-nitrosylací GAPDH tvořící komplex s NO-aktivovanou proteinkinasou NtOSAK. Úloha GAPDH/NtOSAK komplexu není příliš známá. Díky S-nitrosylaci dochází k inhibici katalasy (CAT), askorbátperoxidasy (AscP) a peroxiredoxinu II E (PrxIIIE), což vede ke zvyšování produkce H₂O₂ a ONOO⁻. NADPH-oxidasa, resp. RBOHD, vytváří oxidační podmínky, které jsou přínosné pro expresi genů obranných reakcí (Mittler *et al.*, 2011). Ve zpětnovazební fázi je deaktivována NPR1/TGA1 dráha díky S-nitrosylaci monomerního NPR1 a jeho oligomerizaci vytvořením disulfidových vazeb mezi monomery NPR1. S-nitrosylací je také inhibována aktivita RBOHD a zprostředkovatel obranné reakce SABP3 je také vazbou NO inaktivován. Dohromady tyto procesy potlačují expresi obranných genů (upraveno podle Astier *et al.*, 2012).

2.2.3.4 Přehled vybraných metod pro analýzu S-nitrosothiolů a S-nitrosylovaných proteinů

Obsah S-nitrosothiolů (RSNO) v biologickém materiálu je stanoven na základě uvolňování NO a jeho detekcí např. chemiluminiscenčně, kolorimetricky, fluorescenčně či elektrochemicky. Principem vysoce citlivé chemiluminiscenční metody je smísení plynného NO ze vzorku s generovaným ozónem za vzniku NO_2 , který je z části v excitovaném stavu (NO_2^*). Množství fotonu uvolněného při návratu do základního stavu je přímo úměrné množství NO (Pinder *et al.*, 2007). Savillova metoda využívá uvolňování NO^+ z S-nitrosothiolů katalyzované Hg^{2+} solí. Poté dochází k reakci se sulfanilamidem za tvorby diazoniové soli, která následně kopuluje s N-(1-naftyl)ethylendiaminem (NED). Princip metody je uveden na Obr. 4. Vzniklé azobarvivo je detekováno spektrofotometricky při 540 nm (Saville, 1958). Fluorescenční metoda (Park & Kostka, 1997) je založena na detekci fluorescenční sloučeniny 1-[H]-naftotriazolu vytvořeného reakcí 2,3-diaminonaftalenu a kyseliny dusité, která se uvolňuje z RSNO působením chloridu rtuťnatého v kyselém prostředí.



Obr. 4 Princip Savillovy metody. V prvním kroku dochází uvolnění NO^+ z S-nitrosothiolů vlivem katalýzy rtuťnatých iontů. Poté NO^+ reaguje se sulfanilamidem za vzniku příslušné diazoniové soli, která dále kopuluje s N-(1-naftyletylen)diaminem a tvoří azobarvivo.

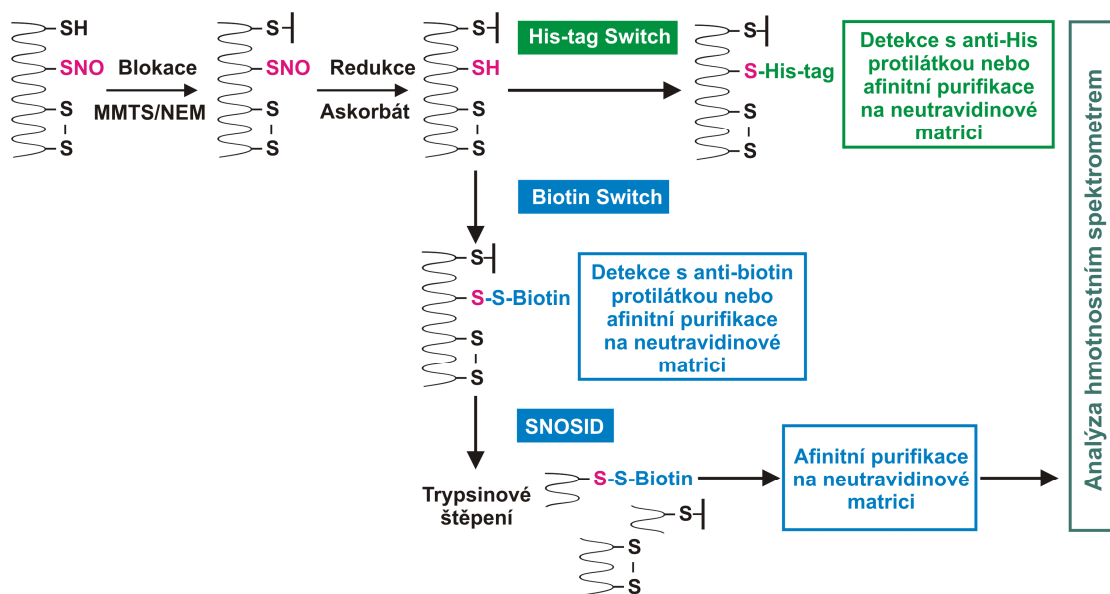
Nejpoužívanější strategií pro detekci a identifikaci S-nitrosylovaných proteinů je tzv. metoda biotin switch (BST), navržená Jaffreyem a jeho kolegy v roce 2001. Je založena na třech krocích. Prvním krokem je blokování volných cysteinových residuí pomocí

methylačního činidla S-methylmethanthiosulfonátu (MMTS). Pro dosažení efektivity blokace je přidán dodecylsírán sodný (SDS) a vzorek je zahříván při teplotě 50°C. Nadbytek MMTS je odstraněn precipitací proteinů v acetonu. Dalším krokem je transnitrosační reakce, kdy dochází k převedení –SNO skupiny na thiolovou skupinu –SH pomocí askorbátu. Bylo popsáno, že askorbát může způsobovat redukci disulfidových vazeb nebo jiné oxidační modifikace, které vedou k nesprávným výsledkům (Landino *et al.*, 2006; Huang & Chen, 2006). Kallakunta *et al.*, 2009 nově popsali použití sinapové kyseliny (3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina), která nenarušuje disulfidové vazby v proteinech. Forrester *et al.*, 2009 uvedli, že pravděpodobnou příčinou artefaktů vznikajících při redukci askorbátem jsou náhodné expozice světlu či přítomnost kontaminujících látek ve vzorku. Třetím krokem je značení zredukovaného cysteinu pomocí thiol-specifického biotinu-HPDP [(N-(6-(biotinamido)hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)propionamid)]. Značený protein je poté možné detekovat pomocí anti-biotin protilátky nebo purifikovat na (neutr)avidin-agarosové matrici. Po eluci pufrém s přidavkem redukčního činidla DTT nebo β-merkptoethanolu, které je schopné odstranit biotinovou značku, lze vypurifikované S-nitrosylované proteiny identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).

Metoda BST byla extenzivně modifikována a na jejím principu byla vyvinuta řada dalších technik (Obr. 5). Jednou z nich je SNOSID (S-Nitrosothiols-Site Identification, Hao *et al.*, 2009). V této metodě po biotinylnaci následuje krok štěpení proteinů trypsinem před afinitní purifikací. Tento postup umožňuje selektivní purifikaci proteinů obsahující S-nitrosylovaná místa, která mohou být dále identifikována MS. Další modifikaci BST představuje His-Tag switch (Camerini *et al.*, 2007). Principem je nahrazení biotinu-HPDP za His-Tag značení. Pro imunochemickou detekci je využita anti-His-tag protilátka a purifikace je provedena na matrici s imobilizovanými nikelnatými nebo kobaltnatými ionty. Takto značená cysteinová residua mohou být ihned analyzována MS. Třetí metoda, 2D-SNO-DIGE (2D-Difference Gel Electrophoresis) kombinuje 2D gelovou elektroforézu a fluorescenční značení pomocí červeného Cy5 (indodikarbocyanin) a zeleného Cy3 (indokarbocyanin). Tato barviva tvoří selektivně adukty s proteinovými S-nitrosothioly při pH 7, které nepodléhají redukci při elektroforéze běžně používanými redukčními činidly na rozdíl od značení biotinem-HPDP (Kettenhofen *et al.*, 2008). Výhodou této metody představuje možnost přímého porovnání vzorků v jednom gelu pomocí fluorescenčních zobrazovacích

technik a vysoká citlivost se uplatňuje při analýze méně abundantních S-nitrosylovaných proteinů. Další technika spočívá v přímé purifikaci proteinů modifikovaných S-nitrosylací pomocí thiol-reaktivní matrice obsahující imobilizované rtuťnaté ionty (SNO-RAC, S-Nitrosothiols Resin-Assisted-Capture; Forrester *et al.*, 2009). Nejprve jsou volná cysteinová residua účinně blokována, poté jsou Cys-NO redukována a váží se na thiol-reaktivní matrici s imobilizovanými rtuťnatými ionty. Zjednodušení představuje vynechání značení biotinem-HPDP a možnost štěpení trypsinem, což urychlí postup při identifikaci S-nitrosylovaných proteinů. Další metody jsou založeny na vysoce reaktivních sloučeninách fenylyrtuti specificky vázajících RSNO. Tyto sloučeniny mohou být imobilizovány na agarosové kuličky nebo na biotin a využity pro purifikaci RSNO (Doulias *et al.*, 2010).

Všechny jmenované metody umožňují detekci a identifikaci S-nitrosylovaných proteinů. Nicméně jde o metody nepřímé, protože všechny vyžadují krok značení. Přímá detekce je ale velmi komplikovaná díky labilnímu charakteru S-NO vazby a je stále předmětem výzkumu.



Obr. 5 Metody pro detekci S-nitrosylovaných proteinů - biotin switch, His-tag switch a SNOSID. Prvním krokem u všech metod je blokování volných nemodifikovaných thiolů činidlem MMTS nebo NEM. Modifikované thiohy jsou redukovány pomocí askorbátu. Následně jsou zredukované skupiny značeny pomocí biotin-HPDP nebo His-tag v závislosti na použité metodě. Dalším krokem je detekce specifickou protilátkou nebo afinitní purifikací s následnou detekcí MS. V případě použití techniky SNOSID je protein značen biotinem, štěpen trypsinem, purifikován a identifikován MS (upraveno podle Lindermayr *et al.*, 2009).

3 Experimentální část

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Acros Organics (USA): thiosíran sodný; Triton X-100.

AppliChem (Německo): dodecylsíran sodný, hovězí sérový albumin frakce V.

Bio-Rad (USA): blotovací pufr Trans-Blot Turbo, marker molekulové hmotnosti Precision Plus Dual Xtra Standards.

Duchefa Biochemie (Nizozemsko): dithiotreitol.

Lachema (Česká republika): hydroxid draselný, hydroxid sodný.

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

Life Technologies (Novex, USA): Bolt ®Bis-Tris Plus Precast gels kit.

Millipore (Německo): Luminata Classico Western HRP substrát.

MP Biomedicals (Francie): tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Penta (Česká Republika): chlorid sodný.

Roche (Švýcarsko): inhibitor proteas Complete ULTRA tablety.

Sigma-Aldrich (Německo): aceton, akrylamid; agar; askorbát; bisakrylamid; β-merkapt ethanol; bromfenolová modř; diethylenetriaminepentaoctová kyselina; dimethylsulfoxid; dihydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný; dusitan sodný; dusičnan stříbrný; ethyendiamidtetraoctová kyselina; glycerin; hydrogenfosforečnan draselný, hydrogenufosforečnan sodný; 2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonová kyselina; *N,N*-dimethylformamidfenylmethansulfonyl fluorid; *N,N'*-tetramethyldiamin; nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem; octová kyselina; persíran amonný; Ponceau S; primární monoklonální myší anti-biotin protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase; redukovaný glutathion; redukovaný nikotinamidadenindinukleotid; sacharosa; sekundární anti-králičí protilátka (imunizace kozy) IgG značená křenovou peroxidase; S-methylmethanthiosulfát; sušené odtučněné mléko; Triton X-100; Tween 20; uhličitan sodný

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

Primární polyklonální protilátka anti-SIGSNOR: Protilátka byla připravena standardní metodou (Harlow & Lane, 1988) intradermální aplikací purifikovaného rekombinantního proteinu GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur (Kubienová *et al.*, 2013a).

3.1.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo); dokumentační zařízení Gel-Doc (Bio-Rad, USA); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); kolony NAP-10 (GE Healthcare, USA); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA); nitroceluloseová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA); skener Li-COR C-DiGit Blot (LI-COR Biotechnology, Německo); termoblok (BioSan, Litva); třepačka 3D (BioSan, Litva); vortex (Stuart, UK); zařízení pro rychlý transfer proteinů na membránu Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA); zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (Bio-Rad, USA).

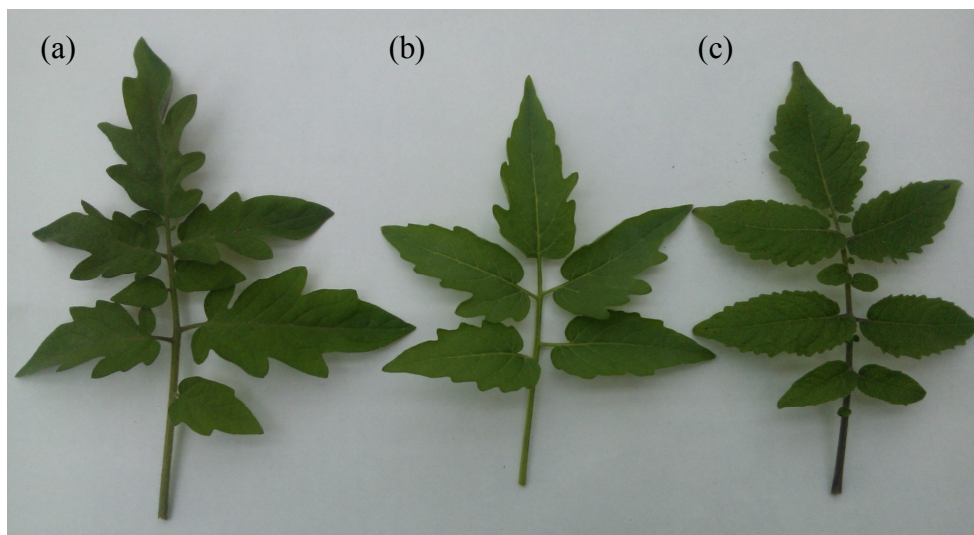
3.2 Biologický materiál

3.2.1 *Solanum* spp.

Jako modelové rostliny pro studium proteinové S-nitrosylace v průběhu patogenese byly vybrány tři genotypy rajčete *Solanum* spp., které jsou na našem pracovišti intenzivně studovány v souvislosti s problematikou ROS, RNS či heat-shock proteinů (Kubienová *et al.*, 2013a, 2013b; Piterková *et al.*, 2013, 2012, 2011, 2009; Tománková *et al.*, 2006; Mlíčková *et al.*, 2004). Studované genotypy, *Solanum lycopersicum* cv. Amateur, *Solanum chmielewskii* a *Solanum habrochaites*, se vyznačují rozdílnou odolností resp. rezistencí vůči významnému biotrofnímu patogenu padlí rajčatového *Oidium neolyopersici*. *S. lycopersicum* cv. Amateur představuje náchylný genotyp, *S. chmielewskii* středně rezistentní a *S. habrochaites* silně rezistentní genotyp rajčete (Obr. 6).

Semena byla vyseta do navlhčeného perlitu. Zhruba 10 dní staré semenáčky, které měly plně vyvinuté děložní listy, byly přesazeny do směsi zahradního substrátu

a rašeliny v poměru 2:1. Rostliny byly pěstovány ve skleníku v plastových květináčích o průměru 7 cm, pravidelně zalévány a hnojeny. Podmínky pro pěstování byly: teplota 20/18°C, fotoperioda 12/12 h (den/noc). Pro experimenty byly použity 8 týdenní rostliny.

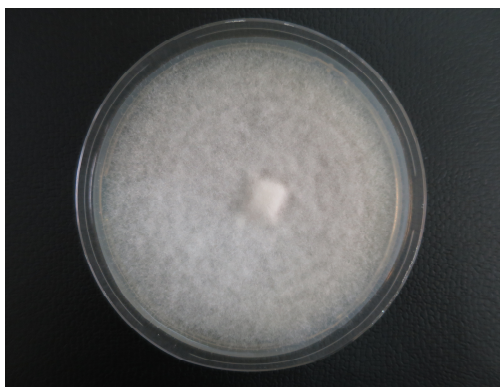


Obr. 6 Listy tří genotypů *Solanum* spp.. (a) Náchylný genotyp *S. lycopersicum* cv. Amateur. (b) Středně rezistentní genotyp *S. chmielewskii*. (c) Silně rezistentní genotyp *S. habrochaites*.

3.2.2 *Phytophthora infestans*

Zástupci rodu *Phytophthora* spp. jsou řazeni do třídy oomycet *Peronosporales* a čeledi *Pythiaceae*. Jedná se o hemibiotrofní patogeny se značným hospodářským dopadem. *Phytophthora infestans* (plíseň bramborová), která je v České republice velice rozšířená, vyvolává u lilkovitých rostlin, zejména bramboru a rajčete, žlutohnědé až tmavě hnědé nekrózy na listech. Během vlhkého počasí a mírných teplot může zničit celou úrodu během týdne.

Pro naši studii jsme vybrali patosystém: *Solanum* spp. x *P. infestans*, a to z důvodu poměrně snadné kultivace *Phytophthora* spp. na médiích v porovnání s biotrofním patogenem *O. neolycopersici*. *P. infestans* byla kultivována na žitném agaru za podmínek 25°C a stálého osvětlení. Po 4 týdenní kultivaci, byla z média vyříznuta krychlička se vzdušným bílým myceliem o rozměru 7x7 mm, přenesena do Petriho misky obsahující nové médium a kultivována další 3-4 týdny (Obr. 7).



Obr. 7 Soustředný nárůst mycelia 30 denní *Phytophthora infestans* kultivované na žitném agaru.

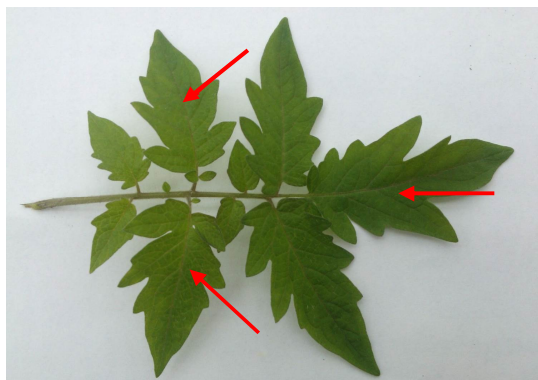
Příprava kultivačního média:

- Žitný agar: 60 g žitných obiliek bylo ponecháno 24 h při laboratorní teplotě v 1 l destilované vody. Druhý den byly rozmixovány ve stolním mixéru 20 s při maximálním výkonu. Směs byla přefiltrována a poté přenesena do skleněných lahví. Následovalo přidání agaru ($1,5\text{--}2\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Médium bylo autoklávováno po dobu 20 min při 121°C . Po ochlazení na teplotu 60°C byla do média přidána sacharosa o koncentraci $20\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.2.3 Inokulace

Izolace zoospor byla provedena smytím ze sporangií za sterilních podmínek po aplikaci 5 ml sterilní deionizované vody na jednu Petriho misku porostlou myceliem. Pro izolaci zoospor byly použité tři Petriho misky porostlé myceliem, bylo získáno celkem 15 ml suspenze zoospor. Hustota zoospor byla stanovena mikroskopicky počítáním v Bürkerově komůrce. Připravené inokulum mělo hustotu 31250 zoospor/1 ml. Rostliny byly inokulovány metodou infiltrace injekční stříkačkou bez použití jehly. U lichožpeřeného listu (5.–6. pravý list rostliny) byly vybrány tři listy (Obr. 8 (a)), do jejichž pravé poloviny abaxiální strany bylo po opatrném narušení plastovou špičkou vtačeno zhruba 15 μl suspenze patogenu obsahující přibližně 500 zoospor (Obr. 8 (b)).

(a)



(b)



Obr. 8 Inokulace rostlinného materiálu metodou jednobodové infiltrace do pravé poloviny listů. (a) Lichožpeřený list *S. lycopersicum* cv. Amateur s vyznačenými místy aplikace patogenu. (b) Ukázka aplikace patogenu do abaxiální strany listu po mechanickém narušení pokožky.

Odběry infikovaných i kontrolních rostlin byly provedeny v časech 0, 24, 48, 72 a 96 hodin po inokulaci (hpi). Rovněž byly paralelně odebrány vzorky listů po narušení abaxiální strany jako kontrola mechanického poškození. Všechny vzorky byly ihned po odběru zamrazeny v tekutém dusíku, poté byly homogenizovány v třecí misce na jemný prášek a uchovány v 15ml zkumavkách ve tmě při -80°C . Pro jednotlivé analýzy bylo odebráno příslušné množství homogenizovaného materiálu. Celkem byly získány tři nezávislé série vzorků.

3.3 Experimentální metody

3.3.1 Biotin-switch

Pro studium S-nitrosylovaných proteinů byla použita metoda dle publikace Jaffrey *et al.*, 2001 a bylo provedeno několik modifikací pro náš rostlinný materiál.

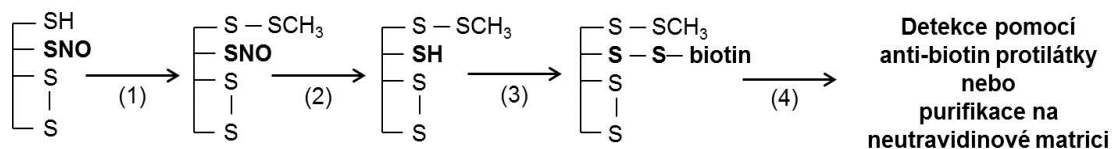
Byl odebrán 1 g rostlinného materiálu homogenizovaného v tekutém dusíku. Poté byl ke vzorkům přidán extrakční pufr v poměru 1:2 (tj. na 1 g rostlinného materiálu 2 ml pufru). V tomto kroku byla provedena optimalizace výběru extrakčního pufru tak, aby byl zajištěn maximální výtěžek S-nitrosylovaných proteinů již při jejich extrakci. Byly vyzkoušeny celkem 3 pufrů: HENT, HEND, TEGN (jejich složení uvedeno níže). Vzorky byly promíchány a inkubovány na ledu ve tmě po dobu 20 minut. Následovala

centrifugace extraktu po dobu 30 minut při 14000x g a 4°C. Supernatant byl přenesen do nových mikrozkuvek a opět uchován na ledu ve tmě. Koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena metodou Bradfordové (viz. Podkapitola 3.3.5). Objem vzorku obsahující 1 mg proteinu byl přenesen do nové mikrozkuvky a byly přidány příslušné objemy činidel pro metodu BST.

Na Obr. 9 je přehledně uveden postup pro přípravu a značení vzorku. Před samotným značením bylo nutné vzorky sloužící jako pozitivní kontroly inkubovat s donory NO ve tmě při laboratorní teplotě. Byl použit 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ S-nitrosoglutathion (GSNO) a nitroprussid sodný (SNP). Taktéž redukční činidlo glutathion (GSH) bylo se vzorky inkubováno v koncentraci 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. K blokaci volných SH- skupin bylo použito methylační činidlo S-methylmethanthiosulfonát (MMTS) ve finální koncentraci 0,02 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako negativní kontrola pro blokaci sloužil vzorek bez přídavku MMTS, pouze s odpovídajícím objemem rozpouštědla DMF. Pro zefektivnění tohoto kroku byl rovněž přidán dodecylsírán sodný (2%) a vzorky byly zahřáty 30 minut při 50°C ve tmě. Po inkubaci byl nadbytek MMTS odstraněn precipitací proteinů (čtyřnásobek objemu vzorku) v 80% ledově vychlazeném acetonu po dobu 30 minut v -20°C. Pro precipitaci proteinů byla vyzkoušena rovněž trichloroctová kyselina v 10% finální koncentraci (TCA) nebo směs chloroform/methanol v poměru 1:3:4:1 (objem vzorku, vody, methanolu a chloroformu). Po precipitaci proteinů následovala centrifugace po dobu 30 minut při 14000x g a 4°C. Poté byl sediment promyt 1 ml acetonu či TCA nebo směsí voda/methanol/chloroform. Vzorky byly centrifugovány po dobu 10 minut při 14000x g a 4°C. Poté bylo k sedimentu přidáno 100 μl HENS pufru. Následovalo přidání askorbátu do finální koncentrace 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a ihned byl přidán biotin-HPDP ve finální koncentraci 4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vzorky byly opatrně promíchány a inkubovány 1 h při laboratorní teplotě ve tmě. V případě kontrolních vzorků pro biotinylation byl namísto biotinu-HPDP přidán odpovídající objem DMF a pro negativní kontrolu bylo přidáno redukční činidlo 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT narušující vazbu protein-biotin-HPDP. Na závěr byl ke vzorkům přidán 1 ml ledově vychlazeného acetonu, TCA nebo směsí voda/methanol/chloroform a následovala precipitace vzorků přes noc při -20°C.

Druhý den byly vzorky centrifugovány po dobu 30 minut při 14000x g a 4°C. Poté byl sediment promyt 1 ml ledově vychlazeného acetonu, TCA nebo směsí voda/methanol/chloroform a rozpuštěn v příslušném objemu HENS pufru tak, aby

finální koncentrace proteinů byla $2,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Třetina vzorku proteinu byla použita pro imunochemickou detekci a dvě třetiny pro afinitní purifikaci.



Obr. 9 Schéma značení proteinu metodou biotin-switch. V případě použití SNP/GSNO jako donoru NO nebo GSH jako negativní kontroly je před přípravou vzorku nutná inkubace 30 min ve tmě při 25°C . (1) Volná thiolová residua jsou blokována pomocí MMTS, (2) transnitrosační reakce modifikovaných residuí Cys-NO pomocí askorbátu, (3) značení zredukovaných Cys residuí thiol-specifickým biotinem-HPDP. (4) Proteiny jsou separovány SDS-PAGE za neredukujících podmínek, následuje transfer na membránu a imunochemická detekce anti-biotin protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfátasou. Značené proteiny je dále možné purifikovat na neutravidinové matrici.

Použité roztoky:

- HENT pufr: $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HEPES, pH 7,7; $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA; $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ neocuproin; 1% Triton X-100.
- HENS pufr: $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HEPES, pH 7,7; $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA; $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ neocuproin; 1% SDS.
- HEND pufr: $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HEPES, pH 7,7; $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA; $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ neocuproin; $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ DTPA.
- TEGN pufr: $500 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8; $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA; 15% glycerol; $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ neocuproin.

3.3.1.1 Detekce S-nitrosylovaných proteinů pomocí anti-biotin protilátky

Proteiny byly separovány metodou SDS-PAGE v 10% dělicím polyakrylamidovém gelu, pH 8,8 a v 4% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu, pH 6,8 (Laemmli, 1970). Dělení v zaostřovacím gelu probíhalo při konstantním napětí 120 V, pro separaci v dělicím gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V.

Příprava vzorků pro SDS-PAGE: Vzorek proteinu byl smíchán v poměru 1:1 s Laemmliho vzorkovacím pufrem za neredukujících podmínek bez obsahu DTT či β -merkптоethanolu (0,125 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 0,2% bromfenolová modř). Inkubace vzorku v termobloku nebyla rovněž provedena vzhledem k labilitě vazby proteinu s biotinem-HPDP. Poté byly připravené vzorky nanесeny do jamek v objemu tak, aby obsažené množství proteinu bylo ve všech jamkách 100 μ g. Na každý gel byl rovněž nanесen standard molekulové hmotnosti (Precision Plus Protein Dual Xtra Standards) v objemu 5 μ l. Jeho výhodou je možnost sledování separace v gelu díky barevnému značení jednotlivých separovaných bandů.

Použité roztoky:

- Elektrodový pufr: 0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl; 0,192 mol·l⁻¹ glycin; 0,1% SDS, pH 8,3.
- V Tab. 2 je uveden rozpis roztoků na přípravu 2 gelů pro skla s mezeríky 1,5 mm.

Tab. 2 Příprava polyakrylamidových gelů.

Gel (%)	Deionizovaná voda (ml)	Akrylamid/Bis (T 30%, C 2,67%) (ml)	Pufr* (ml)	10% (w/v) SDS (ml)	TEMED (ml)	10% (w/v) APS † (ml)
4% (zaostřovací)	6,1	1,3	2,5	0,1	0,02	0,2
10% (dělicí)	8,2	6,6	5	0,2	0,02	0,2

* Pro zaostřovací gel byl použit jako 1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 8,8. Pro dělicí gel byl použit 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 6,8.

† Polymerace zahájena přidávkem 10% APS.

Separované proteiny metodou SDS-PAGE byly přeneseny z gelu na povrch nitrocelulosové membrány pomocí zařízení pro rychlý transfer proteinů Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) s nastavením: 25 V; 2,5 A; doba transferu 10 minut. Veškerý použitý materiál (papíry, membrána, gel) bylo nutné před přenosem inkubovat v blotovacím pufru po dobu 10 minut. Na spodní část kazety (anodu) byl položen blotovací papír, na něj membrána, poté gel a na něj druhý blotovací papír. Pomocí válečku byly odstraněny vzduchové bubliny a byla vložena horní část kazety (katoda). Záporně nabitě proteiny obalené SDS jsou pomocí elektrického proudu přeneseny z gelu směrem dolů, tj. na

povrch membrány. Po ukončení přenosu byly z kazety vyjmuty membrána i gel. Úspěšnost transferu byla ověřena dvěma způsoby. Prvním bylo vizuální sledování přenosu barevného markeru molekulové hmotnosti. Druhým bylo barvení pomocí Ponceau S, což je vodou smývatelné diazobarvivo využívané pro reverzibilní barvení proteinů na membráně.

Prvním krokem imunochemické detekce S-nitrosylovaných proteinů (resp. biotinylovaných) na membráně je tzv. blokace membrány, aby se na povrch membrány nenavázaly následně přidané molekuly imunoglobulinů. Blokování těchto nespecifických míst bylo provedeno po dobu 2 h pomocí 1% roztoku sušeného mléka obsahujícího 1% BSA v TBS pufru obsahujícího Tween 20 (0,05%, TBST) jako detergent. Po blokování byla membrána přenesena do roztoku primární monoklonální anti-biotin protilátky konjugované s alkalickou fosfatase (1:10000) v 1% roztoku sušeného mléka v TBS pufru. Inkubace s primární protilátkou probíhala za mírného míchání přes noc při 4 °C. Po promytí roztokem TBST (3x 50 ml) byla membrána přenesena do barvicího roztoku chromogenního substrátu NBT-BCIP. Na membránu byly nanесeny 3 ml komerčního roztoku NBT-BCIP a následovala inkubace po dobu 5 minut do vyvinutí tmavě fialového zbarvení detekovaných bandů. Reakce byla zastavena přidáním destilované vody, membrána byla vysušena a vyfocena v dokumentačním systému Gel-Doc (Bio-Rad). Detekované bandy denzitometricky vyhodnoceny pomocí softwaru VisionWorks®LS Analysis.

Použité roztoky a protilátky:

- Blotovací pufr: 0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl; 0,192 mol·l⁻¹ glycin, 20% methanol, pH 8,3.
- Barvicí roztok s Ponceau S: 0,2% Ponceau S; 10% kyselina octová.
- Pufr pro imunodetekci (TBS): 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, 500 mmol·l⁻¹ chlorid sodný, pH 7,5.
- Primární protilátka: primární monoklonální myší anti-biotin protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase (1:1000 v 1% nízkotučném sušeném mléku v TTBS).

3.3.1.2 Afinitní purifikace biotinylovaných proteinů

Pro afinitní purifikaci bylo použito 250 μg značených proteinů. Nejprve byl příslušný objem neutravidinové matrice (v závislosti na výchozím množství proteinů, doporučuje se 35 μl matrice na 250 μg značených proteinů) promyt 2x 100 μl neutralizačního pufru. V tomto kroku je důležité, aby každý vzorek byl nanášen na stejné množství matrice. Poté následovala centrifugace při 200x g a supernatant byl odstraněn. Matrice byla ekvilibrována 100 μl neutralizačního pufru a následovala inkubace po dobu 30 min na orbitální míchačce. Poté následovala centrifugace při 200x g a supernatant byl odstraněn a k matrici bylo přidáno 100 μl neutralizačního pufru společně se vzorky. Vzorky byly s matricí inkubovány po dobu 1 h za laboratorní teploty ve tmě na orbitální míchačce. Po 1 min centrifugace při 200x g byl odstraněn supernatant. Matrice byla promyta 350 μl promývacího pufru celkem 4x. Nakonec bylo k matrici přidáno 150 μl promývacího pufru a byla přenesena do prázdných a uzavřených kolonek. Eluce navázaných proteinů byla provedena přidavkem 100 μl elučního pufru obsahujícím 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ β -merkptoethanolu. Před samotnou elucí byl pufr zahřát po dobu 5 min na 95°C. Purifikované proteiny byly precipitovány přes noc v acetonu při -20°C. Druhý den byly vzorky centrifugovány 30 min při 14000x g, sediment byl promyt 1 ml vychlazeného acetonu a opět centrifugován 15 min při 14000x g. Sediment byl rozpuštěn v 20 μl HENS pufru.

Po afinitní purifikaci byly proteiny elektroforeticky separovány za denaturujících podmínek v komerčních gelech Bolt [®]Bis-Tris Plus (4-12%) dle protokolu dodaného výrobcem Novex. Ke vzorkům v 20 μl HENS pufru bylo přidáno 6,7 μl vzorkovacího pufru Bolt LDS (4x) a 2,7 μl redukčního činidla Bolt (10x). Po promíchání byl vzorek zahřát po dobu 10 min při 70°C. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit Novex Sharp Pre-stained Protein Standard v objemu 5 μl . Elektroforéza probíhala 45 min při konstantním napětí 165 v prostředí 1x Bolt MES pufru. Po separaci proteinů byl gel barven stříbrem (Tab. 3), poté vyfocen a vyhodnocen v dokumentačním systému Gel-Doc (Bio-Rad).

Použité roztoky:

- Neutralizační pufr: 20 mmol·l⁻¹ HEPES-NaOH, pH 7,7; 100 mmol·l⁻¹ chlorid sodný; 1 mmol·l⁻¹ EDTA; 0,5% (v/v) Triton X-100.
- Promývací pufr: 20 mmol·l⁻¹ HEPES-NaOH, pH 7,7; 600 mmol·l⁻¹ chlorid sodný; 1 mmol·l⁻¹ EDTA; 0,5% (v/v) Triton X-100.
- Eluční pufr: 20 mmol·l⁻¹ HEPES-NaOH, pH 7,7; 100 mmol·l⁻¹ chlorid sodný; 1 mmol·l⁻¹ EDTA; 100 mmol·l⁻¹ β-merkapt ethanol.

Tab. 3 Barvení gelů stříbrem.

Krok	Čas	Složení roztoků
1. Fixace	2x 15 min	50% MeOH 12% octová kyselina 0,05% formaldehyd
2. Promytí	3x 10 min	50% EtOH
3. Ustalovač	1 min	0,2 g/l thiosíran sodný
4. Promytí	1 min	Destilovaná voda
5. Barvení*	20 min	2 g/l dusičnan stříbrný 0,075% formaldehyd
6. Promytí	1 min	Destilovaná voda
7. Vývojka	Až do vyvinutí zbarvení (přibližně 2 min)	60 g/l uhličitan sodný 5 mg/l thiosíran sodný 0,05% formaldehyd
8. Zastavení barvení	10 min	50% MeOH 12% octová kyselina
9. Skladovací roztok	20 min	20% EtOH 2% glycerin

3.3.2 Stanovení aktivity GSNOR

Aktivita byla měřena spektrofotometricky při 340 nm 96 jamkových mikrotitračních destičkách po dobu 10 minut. Do jamek bylo naneseo 200 μl 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pufru (pH 8) a 40 μl vzorku. Poté bylo přidáno 30 μl čerstvě připraveného 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku NADH. Reakce byla odstartována přidavkem 30 μl čerstvě připraveného 4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku GSNO a ihned byla měřena absorbance v daném časovém intervalu při 340 nm. Pouze do slepého vzorku bylo namísto GSNO použito 30 μl deionizované vody.

Příprava vzorku: Do 1 g dusíkem homogenizované rostlinné hmoty byly přidány 2 ml extrakčního pufru (50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5; 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF; 0,2% (v/v) Triton X-100). Poté byl extrakt ponechán 20 minut na misce s ledem. Homogenát byl centrifugován 30 minut při 16 000 g a při teplotě 4°C. Pro přečištění supernatantu byla použita kolonka NAP-10. Ta byla nejprve ekvilibrována 15 ml 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na-fosfátovým pufrům (pH 6,8). Na kolonku se poté nanese 1 ml supernatantu a po vsáknutí se přidaly 2 ml 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru (pH 7,8). Poté bylo zachycováno 1,5 ml eluátu do mikrozkuřavky. Kolonka byla promyta 25 ml deionizované vody.

Příprava GSNO dle Moore & Mani, 2002: Ve 3 ml 0,5 M HCl bylo rozpuštěno 614 mg glutathionu (0,66 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Směs byla umístěna do ledové lázně a za stálého míchání bylo přidáno 138 mg NaNO_2 (0,66 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Po 40 minutách byla pomocí Büchnerovy nálevky odsáta vzniklá červená sraženina. Sraženina byla promyta 20 ml ledově vychlazené deionizované vody, 20 ml vychlazeného acetonu, poté 20 ml vychlazeného diethyletheru. Promytá sraženina byla uložena do alobalu a přes noc byla ponechána v exikátoru. Poté byla zamrazena a uchována při -20 °C.

3.3.3 Stanovení obsahu S-nitrosothiolů

S-nitrosothioly se stanovují Savillovou metodou, která je založena na uvolňování NO^+ katalyzovaného Hg^{2+} solí. Vzniklá sloučenina tvoří v kyselém prostředí reakcí se sulfanilamidem diazoniovou sůl. Tato sloučenina kopuluje

s N-(1-naftyletylen)diaminem (NED) a vzniká azobarvivo, které je možné detekovat spektrofotometricky při 540 nm (Saville, 1958).

Stanovení bylo prováděno v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Do jamek bylo nanášeno 195 μl činidla Griess B v případě blanku bylo namísto Griess B použito činidlo Griess A. Poté bylo přidáno 5 μl přečištěného rostlinného extraktu na kolonkách NAP-10, v případě slepého vzorku 5 μl deionizované vody. Po 5 minutách inkubace bylo nanášeno 100 μl činidla NED. Po dalších 5 minutách byla měřena absorbance při 540 nm.

Koncentrace S-nitrosothiolů byla odečtena z rovnice lineární regrese, která byla sestavena z měření kalibračních standardů GSNO. Byly použity 0,5; 1; 1,25; 2,5; 5; 10; 50; 100; 200 a 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoky GSNO v 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl.

Použité roztoky:

- Griess A: 3,5% sulfanilamid v 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl.
- Griess B: 3,5% sulfanilamid v 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl a 1% HgCl_2 .
- NED: 0,1% N-(1-naftyletylen)diamin v deionizované vodě.

3.3.4 Detekce GSNOR metodou Western blot

Proteiny byly nejprve separovány metodou denaturující SDS-PAGE v 10% dělicím polyakrylamidovém gelu, pH 8,8 a v 4% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu, pH 6,8 (Laemmli, 1970). Dělení v zaostřovacím gelu probíhalo při konstantním napětí 120 V, pro separaci v dělicím gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V.

Příprava vzorků pro SDS-PAGE: Vzorek proteinu byl smíchán v poměru 1:1 s Laemmliho vzorkovacím pufrům (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 0,2% bromfenolová modř; 5% merkptoethanol), poté 5 minut inkubován v termobloku při teplotě 100°C. Po ochlazení byly připravené vzorky nanášeny do jamek v objemu tak, aby obsažené množství proteinu bylo ve všech jamkách stejné. Na každý gel byl rovněž nanášen standard molekulové hmotnosti (Precision Plus Protein Dual Xtra Standards, Bio-Rad, USA) v objemu 5 μl bez inkubace při teplotě 100°C.

Separované proteiny metodou SDS-PAGE (viz. Podkapitola 3.3.1.1) byly přeneseny z gelu na povrch nitrocelulosové membrány pomocí zařízení pro rychlý transfer proteinů Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) jak je uvedeno výše v podkapitole 3.3.1.1. Prvním

krokem imunochemické detekce proteinu GSNOR na membráně bylo blokování nespecifických míst v 5% roztoku sušeného mléka v TTBS pufru po dobu 2 h. Po blokování byla membrána přenesena do roztoku primární polyklonální anti-GSNOR protilátky (1:1000) v 1% roztoku sušeného mléka v TBS pufru. Inkubace s primární protilátkou probíhala za mírného míchání přes noc při 4 °C. Po promytí roztokem TBST (3x 50 ml) byla membrána přenesena do roztoku sekundární protilátky (1:10000) značené alkalickou křenovou peroxidasou (HRP) v 1% roztoku sušeného mléka v TBS pufru. Následovalo promytí roztokem TBST (3x 50 ml) a poté vizualizace chemiluminiscence. Na membránu byl nanesen 1 ml komerčního roztoku luminolu a následovala inkubace po dobu 5 minut, poté byla membrána vložena na skener Li-COR C-DiGit Blot. Skenování membrány probíhalo 5 min, poté byly detekované bandy denzitometricky vyhodnoceny pomocí softwaru VisionWorks®LS Analysis.

Použité protilátky:

- Primární protilátka: králičí primární polyklonální protilátka anti-SIGSNOR (1:1000 v 1% nízkotučném sušeném mléku v TTBS, Kubienová *et al.*, 2013).
- Sekundární protilátka: komerční sekundární anti-králičí protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou peroxidasou (1:10000 v 1% nízkotučném sušeném mléku v TTBS).

3.3.5 Stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové

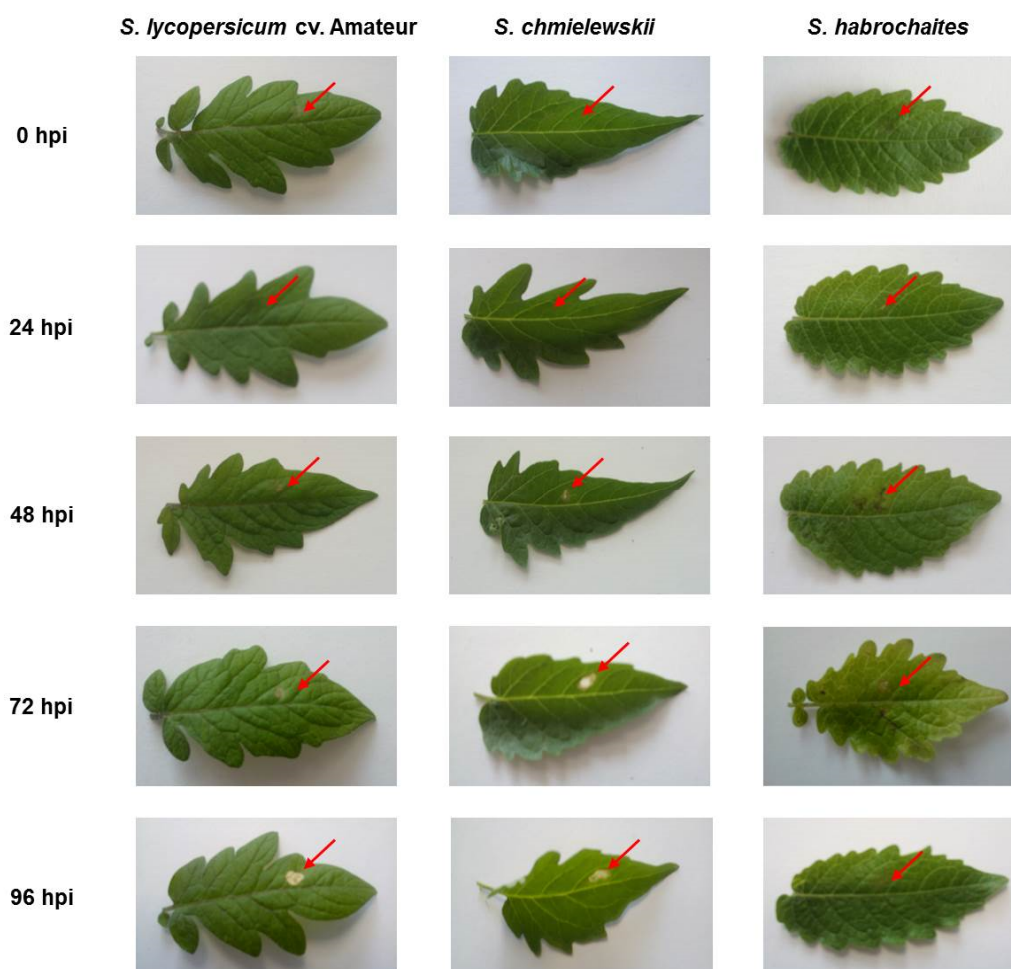
Principem metody Bradfordové je vznik stabilního komplexu proteinu s barvivem Coomasie Blue G-250 v kyselém prostředí. Tento komplex můžeme spektrofotometricky stanovovat při 595 nm (Bradford, 1976).

Měření bylo prováděno na 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Do jamek bylo nanášeno 45 µl deionizované vody a 5 µl vzorku. Pro slepý vzorek použijeme namísto vzorku 5 µl vody. Poté bylo přidáno 200 µl činidla Bradfordové (0,5 mg·ml⁻¹ Coomasie Brilliant Blue G250; 0,25 mol·l⁻¹ methanol; 0,5 mol·l⁻¹ 85% kyselina fosforečná). Po 5 min byla měřena absorbance při 595 nm. Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí rovnice lineární regrese, která byla sestavena z měření kalibračních standardů BSA. Koncentrace standardů byla 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 a 1,4 mg·ml⁻¹.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Vizuální hodnocení symptomů po inokulaci *P. infestans*

Hemibiotrofní patogen *P. infestans* byl infiltrován v jednom bodě do pravé poloviny listu příslušného genotypu *Solanum* spp.. Hodnocení symptomů probíhalo v časovém úseku 0–96 hodin po inokulaci (hpi). Z Obr. 10 je zřejmé, že symptomy napadení vznikaly v místě infiltrace patogenu a jejich intenzita se měnila v celém časovém úseku, což je nejlépe vidět u *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. chmielewskii*. V případě těchto dvou genotypů lze pozorovat postupný vývoj nekrózy pletiva listu od 24 hpi, kdy největšího rozsahu dosáhla 96 hpi. U *S. habrochaites* byla pozorována nižší intenzita symptomů po napadení patogenem, avšak 48 hpi byl zaznamenán nejintenzivnější rozsah nekrózy, která se již dále nerozšiřovala.

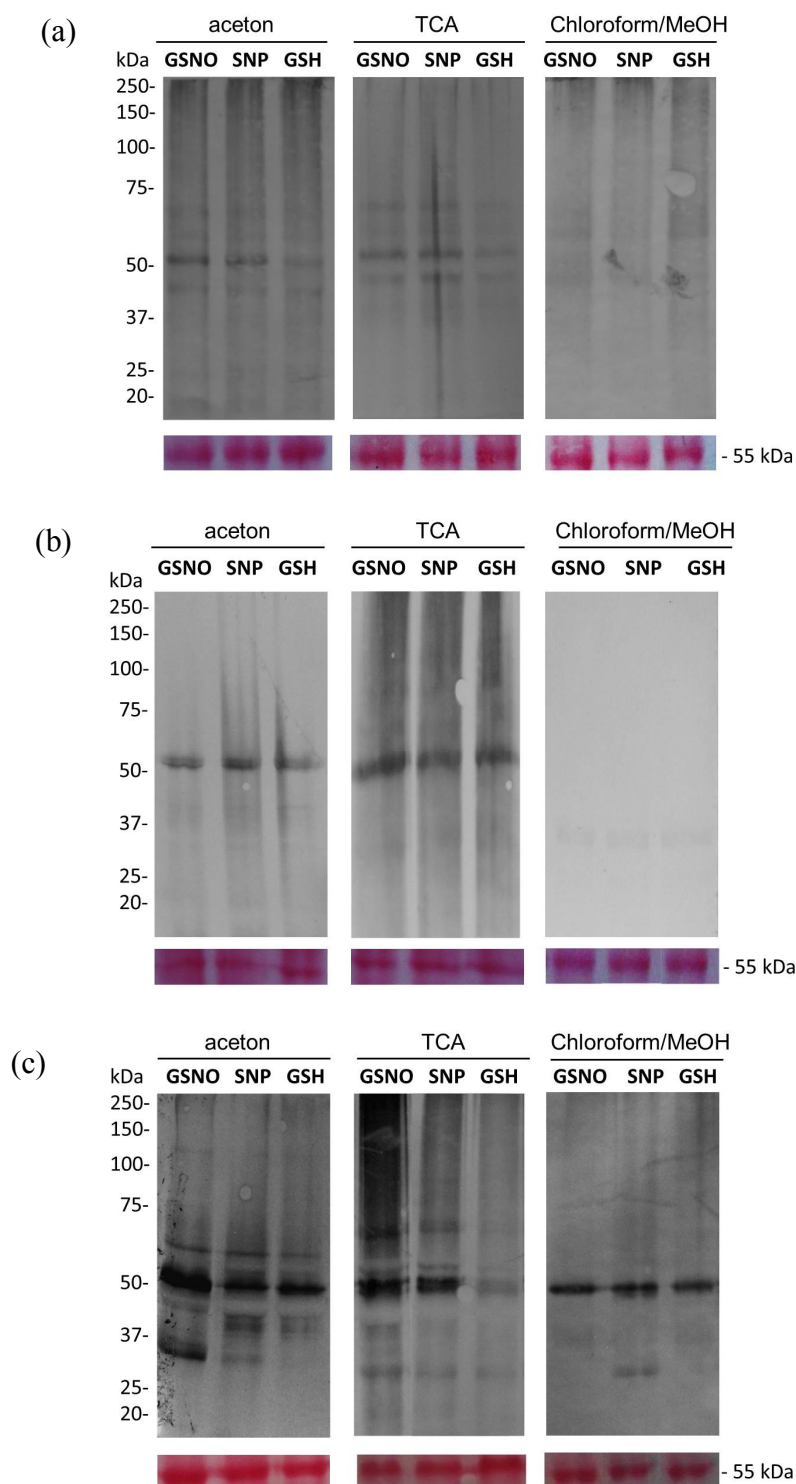


Obr. 10 Průběh patogenese *P. infestans* u *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites* v časovém intervalu 0–24 hpi.

4.2 Optimalizace podmínek extrakce S-nitrosylovaných proteinů

Na základě publikace Lindermayr *et al.*, 2005 byla provedena metoda biotin-switch pro detekci S-nitrosylovaných proteinů v listech tří genotypů *Solanum* spp..

Proteiny byly extrahovány v HENT pufru a po dobu 30 min inkubovány s donory NO. GSNO slouží jako nejvýznamnější donor NO *in vivo*, jako druhý donor byl použit nitroprussid sodný (SNP). Oba byly použity v koncentraci 250 μM . Pro negativní kontrolu sloužila inkubace s 250 μM GSH, což je redukční činidlo, které zamezuje navázání biotinu-HPDP na thiolovou skupinu proteinu. Po separaci značených proteinů byla provedena imunodetekce s využitím anti-biotin protilátky. Byly detekovány S-nitrosylované proteiny, nicméně detekovaný signál byl poměrně slabý (Obr. 11 (a)). Mírně zvýšená intenzita byla pozorována po aplikaci obou donorů NO, avšak slabý signál byl zaznamenán také v případě 250 μM GSH, což mohlo být způsobeno jeho nízkou koncentrací (Obr. 11 (a)). Možnou příčinou nízkého signálu mohla být přítomnost interferujících látek např. měďnatých iontů či askorbátu v extraktu, což bylo popsáno v publikaci Dicks & Williams, 1996. Bylo tedy nutné vyzkoušet řadu optimalizací metody. Autoři zabývající se proteomickou studií S-nitrosylovaných proteinů v listech a hlízách bramboru *Solanum tuberosum* (Kato *et al.*, 2013) se potýkali se stejným problémem. Pro extrakci proteinů byly rovněž vyzkoušeny pufrы obsahující různé koncentrace chelatačních činidel, a to: HEND pufr obsahující 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTPA a 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, a také TEGN pufr s 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA. Po imunodetekci bylo evidentní, že složení extrakčního pufru má významný vliv pro odstranění rušivých látek z extraktu před samotným provedením metody biotin-switch. Nejvyšší signál byl detekován po extrakci v TEGN pufru, což souhlasí s výsledky publikovanými pro detekci S-nitrosylovaných proteinů v listech bramboru (Kato *et al.*, 2013) (Obr. 11 (c)). Nejvyšší intenzita byla detekována u bandu, který odpovídal molekulové hmotnosti 55 kDa a jedná se pravděpodobně o velkou podjednotku enzymu Rubisco, nejhojněji zastoupený protein v listech rostlin. Řada studií potvrzuje, že velká podjednotka enzymu Rubisco podléhá S-nitrosylaci (Lindermayr *et al.*, 2005; Abat *et al.*, 2008; Fares *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2013) Abat *et al.*, 2009 studovali u *Brassica juncea* rozdíly v S-nitrosoproteomu při působení chladového stresu a zjistili, že S-nitrosylace Rubisco vede ke ztrátě jeho karboxylasové aktivity.



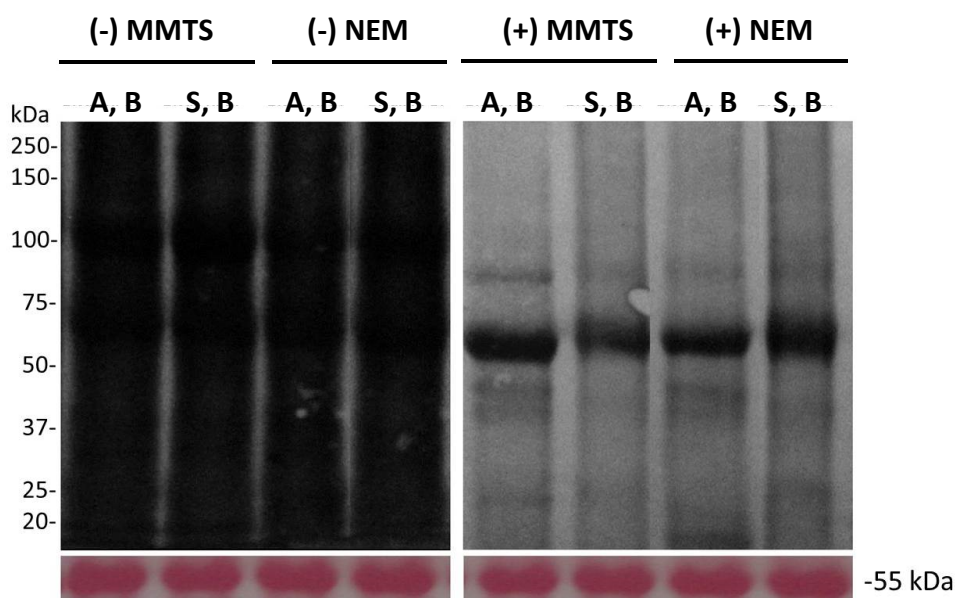
Obr. 11 Optimalizace podmínek extrakce S-nitrosylovaných proteinů v listech 8 týdenního rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur. Extrakce proteinů v pufru (a) HENT, (b) HEND, (c) TEGN. 1 mg proteinů vzorku inkubován s donory NO: 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO a SNP, redukčním činidlem 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH. Následovalo značení metodou biotin switch (blokování 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMTS, redukce 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ k. askorbová, značení 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ biotin-HPDP). Precipitace proteinů byla provedena 80% acetonem/10% TCA/směsí chloroform-methanol-voda 1:4:3. Proteiny byly separovány SDS-PAGE za neredukujících podmínek, přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Do jamek bylo nanášeno 100 μg celkových proteinů. Pro kontrolu správného nanášení sloužilo barvení membrány pomocí Ponceau S (výřez pro protein o molekulové hmotnosti 55 kDa (Rubisco)).

Na základě získaných výsledků byly pro další analýzy proteiny extrahovány v TEGN pufu a pro značení metodou biotin-switch byl použit 1 mg proteinů jako výchozí množství vzorku. Pro precipitaci proteinů, která následovala po krocích blokace volných thiolů a značení biotinem-HPDP, byl použit 80% aceton, 10% TCA a směs chloroform-methanol-voda v poměru 1:4:3. Nejlepší výsledky byly dosaženy po extrakci vzorku v TEGN pufu a precipitaci v 80% acetonu i 10% TCA. Avšak dále byl použit 80% aceton, a to vzhledem k obtížnému rozpouštění sedimentu v TEGN pufu po odstranění 10% TCA, což potvrdili v práci Kato *et al.*, 2013 při přípravě vzorků z listů bramboru.

4.3 Optimalizace metody biotin-switch

Lindermayr *et al.*, 2005 ve své zavedené metodice BST pro listy *Arabidopsis* popisují pro efektivní blokaci volných cysteinů $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMTS v kombinaci s 2% SDS a inkubaci 30 min při 50°C . Je známo, že maleimidy jsou vynikající činidla pro thiol-selektivní modifikace, kvantifikaci a analýzu. Při této reakci dochází k nukleofilní adici thiolu na dvojnou vazbu maleimidu, čímž vzniká thioether. Optimální pH této reakce je v rozmezí 6,5-7,5 (Kowaltowski *et al.*, 1997). Ve studii zabývající se detekcí S-nitrosylovaných proteinů v listech topolu vystavených působením ozonu (Vanzo *et al.*, 2014) přidali $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NEM přímo do extrakčního pufu, aby došlo k maximálně efektivní blokaci volných cysteinových residuí, která je dále zvýšena inkubací po dobu 30 min při 37°C . Obě tyto možnosti blokace volných thiolů byly vyzkoušeny a na základě výsledků lze usoudit, že mají stejnou účinnost. Některé publikace (Huang & Chen, 2006; Forrester *et al.*, 2009) uvádějí, že redukce pomocí askorbátu může vést k experimentálním artefaktům, jejichž příčinou může být redukce disulfidových vazeb nebo jiné oxidační modifikace. Rovněž vyšší koncentrace askorbátu či delší inkubace vede k detekci falešně-positivního signálu. Na základě těchto poznatků bylo v práci Kallakunta *et al.*, 2009 popsáno použití sinapové kyseliny jako redukčního činidla s vyšší specificitou. Kyselina sinapová byla použita v $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ finální koncentraci, která byla použita ve studii Vanzo *et al.*, 2014. Ihned po jejím přidavku byl přidán $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ biotin-HPDP a následovala inkubace při 25°C ve tmě. Kyselina askorbová byla použita v $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci, podmínky inkubace byly stejné jako v případě sinapové kyseliny. Z našich výsledků je zřejmé, že pro

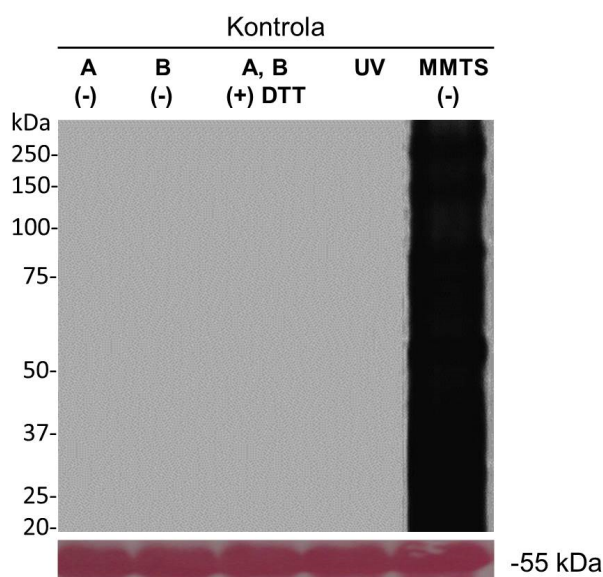
redukcí NO- modifikovaných cysteinů je vhodné použití jak kyseliny sinapové, tak i askorbové, která byla použita v dalších experimentech (Obr. 12).



Obr. 12 Optimalizace detekce S-nitrosylovaných proteinů v listech 8 týdenního rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur – výběr činidla pro blokování volných thiolů a redukcí modifikovaných cysteinových residuí. Pro blokování volných cysteinových residuí bylo použito $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ MMTS nebo $30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NEM. Vlevo je uvedena detekce negativní kontroly, kdy volná cysteinová residua v proteinech před redukcí a značením nebyla blokována, u vzorků vpravo bylo blokování provedeno. Vpravo jsou porovnány vzorky, u nichž byla provedena redukce NO-modifikovaných cysteinových residuí k. askorbovou (A, $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) nebo k. sinapovou (S, $3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), značení biotinem-HPDP (B, $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Separace SDS-PAGE za neredukujících podmínek, přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu. Do jamek bylo nanášeno $100 \mu\text{g}$ celkových proteinů. Pro kontrolu správného nanášení sloužilo barvení membrány pomocí Ponceau S (výřez pro protein o molekulové hmotnosti 55 kDa (Rubisco)).

Při provádění metody biotin-switch by neměly být opomenuty příslušné kontroly klíčových kroků. První kontrolou je vynechání blokačního činidla MMTS či NEM před samotným značením, což vede k biotinylnaci cysteinových residuí řady proteinů a projeví se po imunodetekci silným signálem na membráně (Obr. 12 vlevo, Obr.13). Druhou kontrolou je inkubace vzorku bez askorbátu, kdy se ke vzorku přidá příslušný objem vody. Třetí kontrolou je inkubace vzorku bez biotinu-HPDP s přidavkem odpovídajícího objemu dimethylformamidu. Pro kontrolu endogenní biotinylnace se používá po samotné biotinylnaci přidavek silného redukčního činidla, zpravidla $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ DTT, které zaručí rozpad vazby proteinu s biotinem-HPDP a není detekován žádný signál (Lindermayr *et al.*, 2005). Jako kontrolu lze také využít RSNO

fotolýzy pomocí inkubace vzorku na UV transiluminátoru, jelikož je známo, že RSNO se na světle rychle rozkládají (Forrester *et al.*, 2009). Všechny kontrolní kroky potvrzují, že metoda biotin-switch je specifická pro detekci S-nitrosylovaných proteinů (Obr. 13).



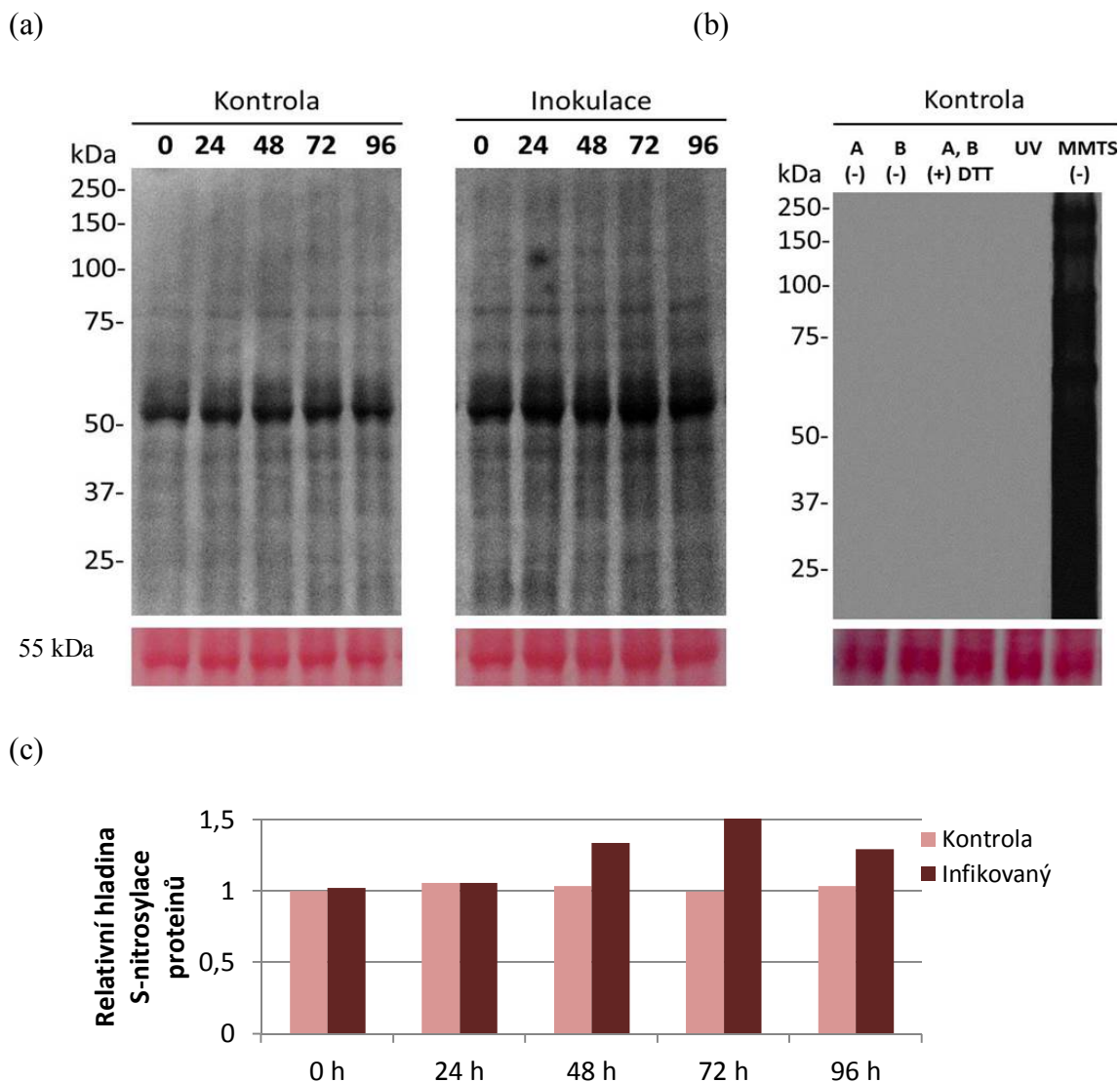
Obr. 13 Kontrolní experiment pro metodu biotin-switch provedený u vzorku listů 8 týdenního rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur. Inkubace vzorku bez askorbátu A (-), bez biotinu B (-), přidavek $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT po biotinylaci vzorku (A, B, + DTT) pro redukcí vazby thiolu s biotinem, vzorek po UV fotolýze RSNO před značením, vynechání činidla MMTS (-) pro blokaci volných thiolů před samotným značením. Separace SDS-PAGE za neredukujících podmínek, přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu. Do jamek bylo naneseno $100 \mu\text{g}$ celkových proteinů. Pro kontrolu správného nanášení sloužilo barvení membrány pomocí Ponceau S (výřez pro protein o molekulové hmotnosti 55 kDa (Rubisco)).

4.4 Detekce a purifikace S-nitrosylovaných proteinů v průběhu patogeneze *P. infestans*

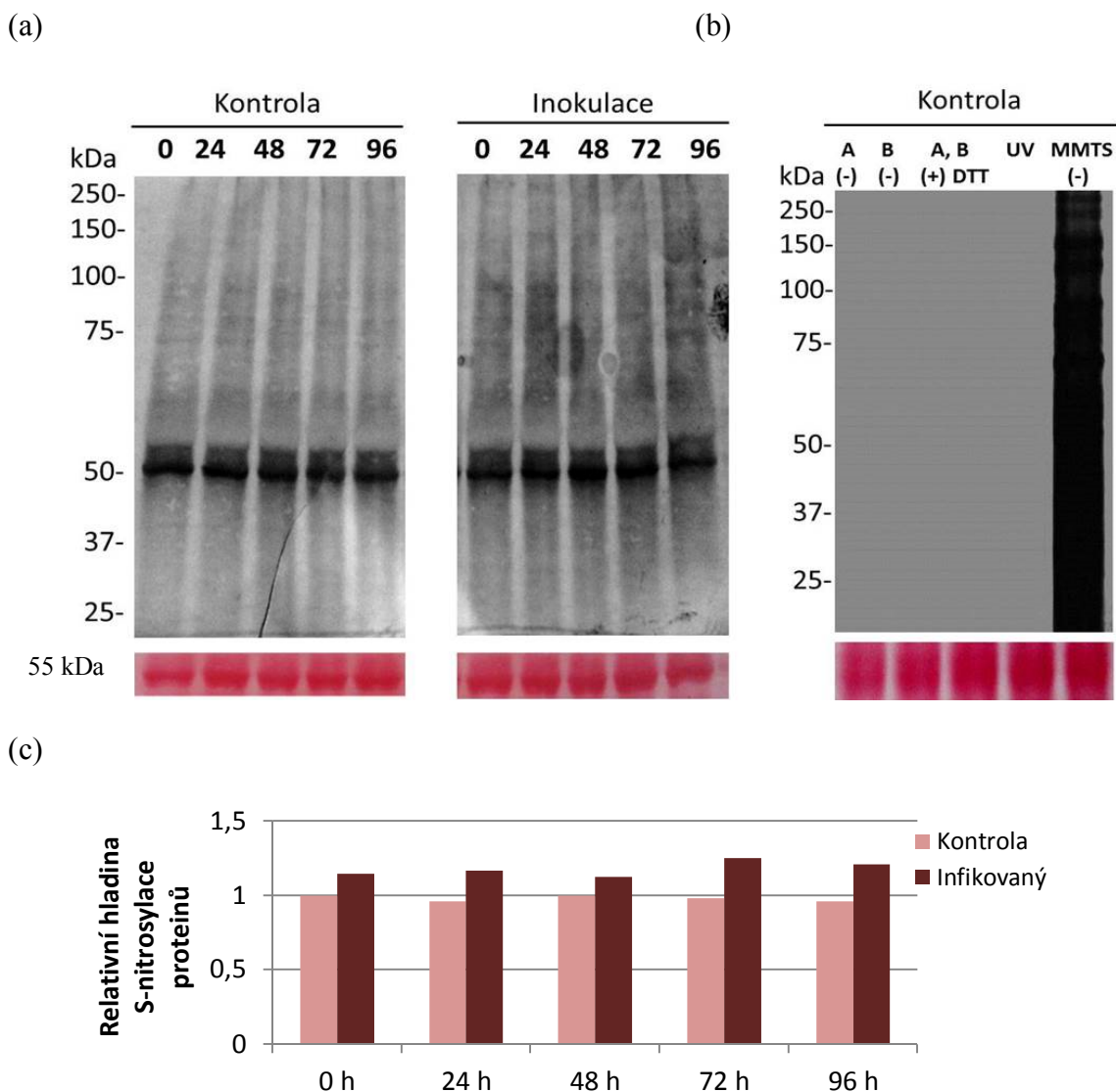
S využitím optimalizované metody biotin-switch byly analyzovány vzorky tří genotypů *Solanum* spp. infikované patogenem *P. infestans* v časech 0, 24, 48, 72 a 96 hodin po inokulaci (hpi).

U všech genotypů došlo po infekci k nárůstu hladiny proteinových RSNO již od 24 hpi, přičemž nejvyšší hladina byla pozorována 72 hpi (Obr. 14, 15, 16). Data korelují s hypotézou, že v buňkách u nichž probíhá obranná reakce úspěšně, dochází k nárůstu RSNO vlivem zvýšené produkce NO a buňky jsou chráněny před šířením infekce (Feechan *et al.*, 2005; Rusterucci *et al.*, 2007; Chaki *et al.*, 2009). Romero-Puertas *et al.*, 2008 provedli proteomickou analýzu S-nitrosylovaných proteinů u *Arabidopsis* infikované *P. syringae* pv. tomato (Pst) s využitím metod 2D-elektroforézy a hmotnostní spektrometrie. Bylo identifikováno celkem 16 proteinů s odlišnou S-nitrosylací během hypersenzitivní reakce (HR). Přechodná S-nitrosylace během HR byla identifikována u serinové proteasy Clp1, významného proteinu degradace proteinů thylakoidní membrány. Dále u allen-oxidcyklasy, která je regulátorem biosyntetické dráhy kyseliny jasmonové. Další skupina zahrnuje redoxní proteiny či antioxidační enzymy, protože je známo, že při HR dochází k akumulaci ROS a RNS (Durner *et al.*, 1998). Germin-like protein má funkci v buněčné odolnosti vůči stresu, zejména při patogenezi. Monodehydroaskorbátreduktasa je součástí glutathion-askorbátového antioxidačního cyklu a nedávno bylo prokázáno, že její aktivita je negativně ovlivněna S-nitrosylací (Kato *et al.* 2013). Peroxiredoxin IIE patří do skupiny thiol-specifických enzymů, které se podílí na detoxifikaci řady peroxidových substrátů. Mezi ostatní identifikované proteiny patří významné metabolické enzymy, což naznačuje, že NO je regulátorem řady metabolických procesů. Jedná se o glykolytické enzymy fosfoglycerátkinasu, triosafosfátisomerasu, GAPDH. Rovněž byla popsána S-nitrosylace fosforibulosakinasy, klíčového enzymu pentosafosfátové dráhy produkující redukční ekvivalent NADPH či ribosa-5-fosfát nezbytný pro syntézu nukleotidů a nukleových kyselin. Dále také S-nitrosylace mitochondriální NAD⁺-dependentní malátdehydrogenasy, enzymu malát-aspartátového člunku, umožňuje přenos redukčního ekvivalentu NADH z cytosolu do mitochondrií, kde se snadno reoxiduje v dýchacím řetězci. Velká podjednotka enzymu Rubisco je rovněž S-nitrosylována, což bylo popsáno již dříve po aplikaci GSNO k suspenzním buňkám *Arabidopsis* (Lindermayr *et al.*, 2005). Maldonado-Alconada *et al.*, 2011 provedli proteomickou studii u *Arabidopsis* napadené virulentním Pst a také i avirulentním Pst avrRpt2. Bylo identifikováno 127 S-nitrosylovaných proteinů zapojených v kompatibilní i nekompatibilní reakci. Řada byla již identifikována v předchozích studiích, avšak 63 % představuje nové cíle NO. Nejvyšší zastoupení 41 % představovaly metabolické proteiny, dále také 14 % proteiny s regulační funkcí či 10 %

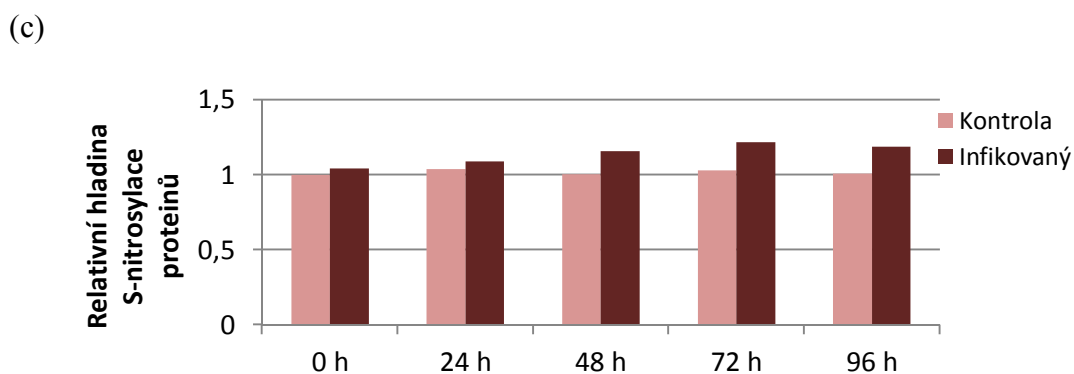
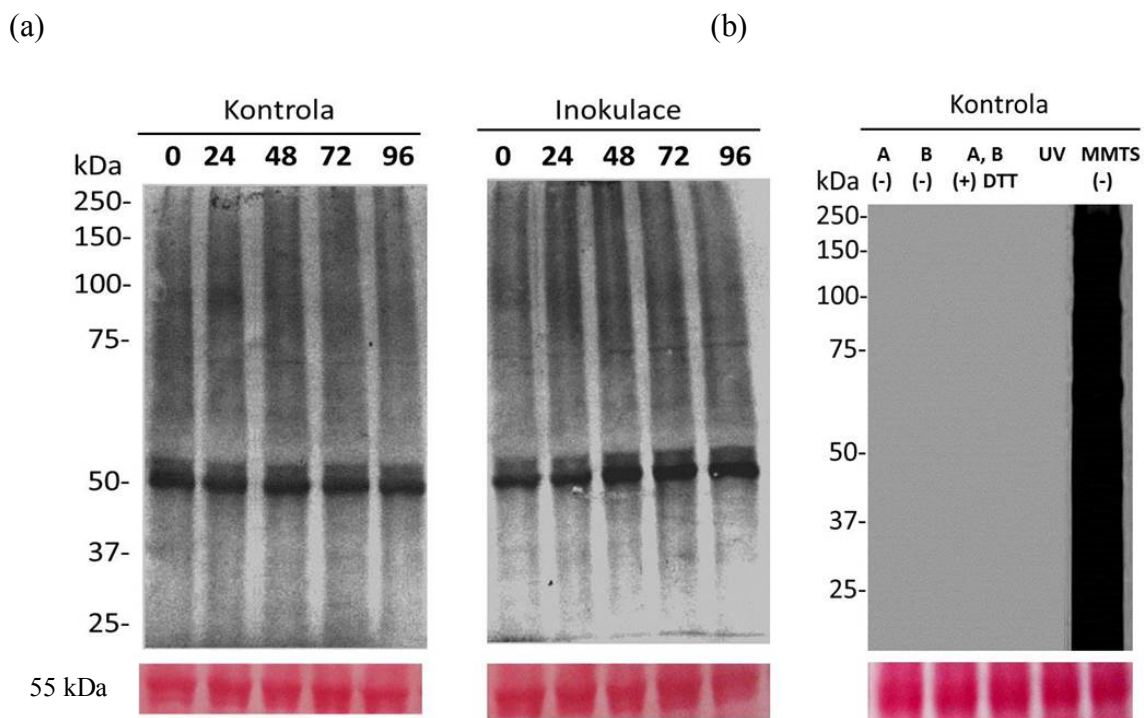
proteiny zapojené v obranné reakci. Zajímavé cíle S-nitrosylace byly nalezeny u proteinů zapojených v metabolismu dusíku, síry, cyklu aktivovaného methylu a biosyntéze mastných kyselin.



Obr. 14 Detekce S-nitrosylovaných proteinů v listech 8 týdenního rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur v průběhu patogenese *P. infestans* v časech 0-96 hpi. (a) Imunochemická detekce S-nitrosylovaných proteinů u kontrolních a infikovaných listů pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:10000). Blokování volných thiolů pomocí 20 mmol·l⁻¹MMTS, S-nitrosylovaná cysteinová residua byla redukována 1 mmol·l⁻¹ k. askorbovou a značena biotinem-HPDP (1 mmol·l⁻¹). (b) Kontrolní experiment pro metodu biotin-switch provedený u vzorku kontroly 0 hpi. Inkubace vzorku bez askorbátu A (-), bez biotinu B (-), přídavek 100 mmol·l⁻¹ DTT po biotinylationi vzorku (A, B, + DTT) pro redukcii vazby thiolu s biotinem, vzorek po UV fotolýze RSNO před značením, vynechání činidla MMTS (-) pro blokaci volných thiolů před samotným značením. Separace SDS-PAGE za neredukujících podmínek, přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu. Do jamek bylo naneseno 100 μg celkových proteinů. Pro kontrolu správného nanášení sloužilo barvení membrány pomocí Ponceau S (výřez pro protein o molekulové hmotnosti 55 kDa (Rubisco)). (c) Denzitometrické vyhodnocení hladiny S-nitrosylace proteinu o molekulové hmotnosti 55 kDa u kontrolních a infikovaných listů v programu VisionWorks®LS Analysis.



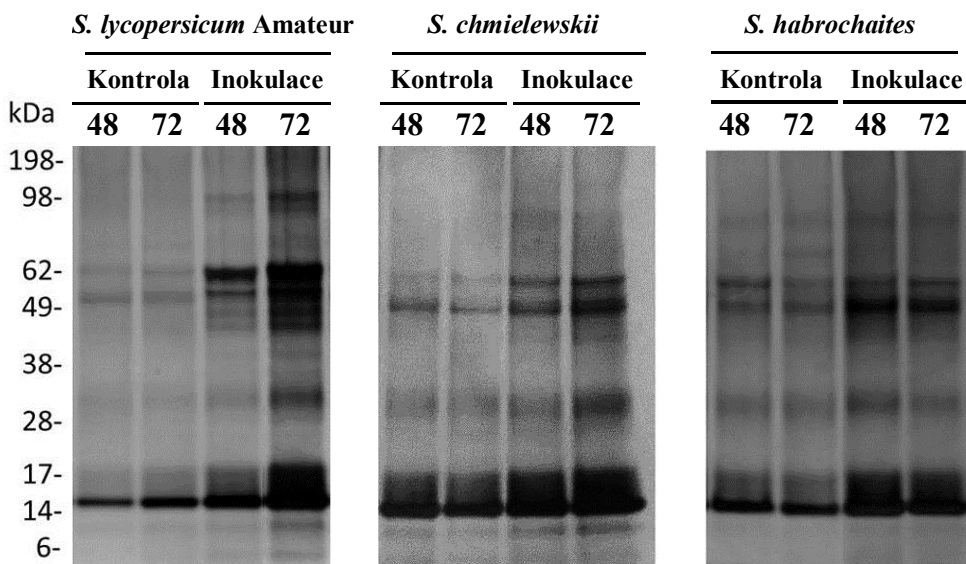
Obr. 15 Detekce S-nitrosylovaných proteinů v listech 8 týdenního rajčete *S. chmielewskii* v průběhu patogenese *P. infestans* v časech 0-96 hpi. (a) Imunochemická detekce S-nitrosylovaných proteinů u kontrolních a infikovaných listů pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:10000). Blokování volných thiolů pomocí $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMTS, S-nitrosylovaná cysteinová residua byla redukována $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ k. askorbovou a značena biotinem-HPDP ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). (b) Kontrolní experiment pro metodu biotin-switch provedený u vzorku kontroly 0 hpi. Inkubace vzorku bez askorbátu A (-), bez biotinu B (-), přidavek $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT po biotinylnaci vzorku (A, B, + DTT) pro redukcí vazby thiolu s biotinem, vzorek po UV fotolýze RSNO před značením, vynechání činidla MMTS (-) pro blokaci volných thiolů před samotným značením. Separace SDS-PAGE za neredukujících podmínek, přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu. Do jamek bylo naneseno $100 \mu\text{g}$ celkových proteinů. Pro kontrolu správného nanášení sloužilo barvení membrány pomocí Ponceau S (výřez pro protein o molekulové hmotnosti 55 kDa (Rubisco)). (c) Denzitometrické vyhodnocení hladiny S-nitrosylace proteinu o molekulové hmotnosti 55 kDa u kontrolních a infikovaných listů v programu VisionWorks®LS Analysis.



Obr. 16 Detekce S-nitrosylovaných proteinů v listech 8 týdenního rajčete *S. habrochaites* v průběhu patogenese *P. infestans* v časech 0-96 hpi. (a) Imunochemická detekce S-nitrosylovaných proteinů u kontrolních a infikovaných listů pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:10000). Blokování volných thiolů pomocí $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ MMTS, S-nitrosylovaná cysteinová residua byla redukována $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ k. askorbovou a značena biotinem-HPDP ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). (b) Kontrolní experiment pro metodu biotin-switch provedený u vzorku kontroly 0 hpi. Inkubace vzorku bez askorbátu A (-), bez biotinu B (-), přidavek $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ DTT po biotinylnaci vzorku (A, B, + DTT) pro redukcí vazby thiolu s biotinem, vzorek po UV fotolýze RSNO před značením, vynechání činidla MMTS (-) pro blokaci volných thiolů před samotným značením. Separace SDS-PAGE za neredukujících podmínek, přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu. Do jamek bylo nanášeno $100 \mu\text{g}$ celkových proteinů. Pro kontrolu správného nanášení sloužilo barvení membrány pomocí Ponceau S (výřez pro protein o molekulové hmotnosti 55 kDa (Rubisco)). (c) Denzitometrické vyhodnocení hladiny S-nitrosylace proteinu o molekulové hmotnosti 55 kDa u kontrolních a infikovaných listů v programu VisionWorks®LS Analysis.

Pro afinitní purifikaci S-nitrosylovaných proteinů značených biotinem byly zvoleny kontrolní a infikované vzorky všech genotypů v časech 48 a 72 h. Vizualizace

purifikovaných proteinů pomocí barvení stříbrem prokázala, že nejvíce proteinů bylo obsaženo ve vzorku 72 hpi a s nejvyšší intenzitou u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur (Obr. 17).



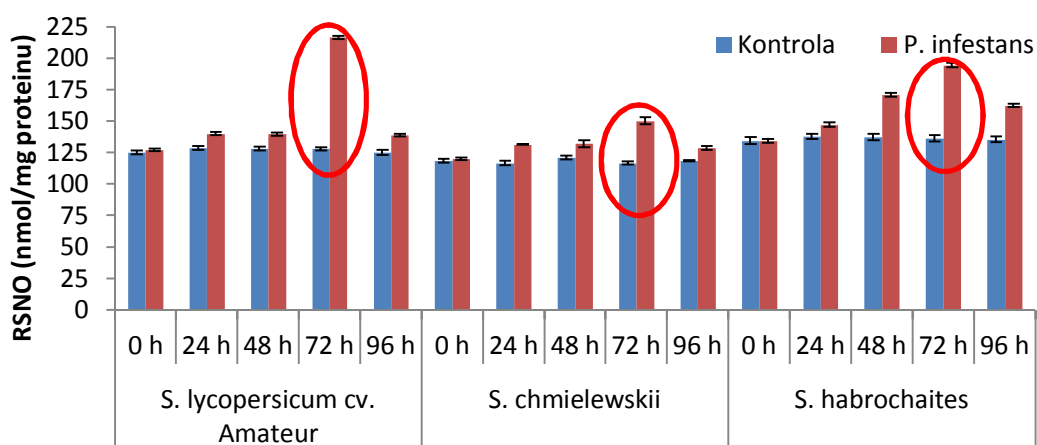
Obr. 17 S-nitrosylované proteiny značené metodou biotin-switch po afinitní purifikaci. 250 μ g proteinů bylo purifikováno pomocí neutravidinové matrice. Proteiny byly separovány SDS-PAGE za redukujících podmínek a vizualizovány pomocí barvení stříbrem. Do jamek bylo nanášeno 20 μ l z purifikované frakce proteinů.

4.5 Stanovení obsahu proteinových S-nitrosothiolů a GSNOR aktivity

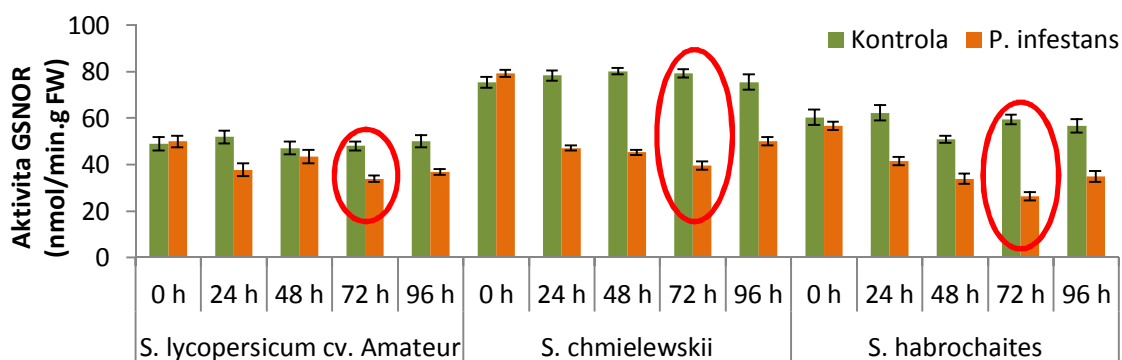
Enzym GSNOR má klíčovou funkci v regulaci GSNO uvnitř buněk a bylo rovněž prokázáno, že nepřímo reguluje hladinu ostatních RSNO a ovlivňuje tak celkový metabolismus NO, resp. RNS v buňkách (Liu *et al.*, 2001). Řada studií potvrzuje významnou roli GSNOR v obranné reakci při působení různých stresových faktorů, ať už abiotické či biotické povahy. V případě biotického stresu přinesly výsledky několika publikací rozporuplné hypotézy. Snížená aktivita GSNOR a naopak, vyšší hladiny RSNO způsobují snížení bazální i nehostitelské rezistence u *Arabidopsis* po infekci bakterií *Pseudomonas syringae* (Feechen *et al.*, 2005) či u rezistentního kultivaru slunečnice vůči houbovému patogenu *Plasmopara halstedii* (Chaki *et al.*, 2009). Práce Rusterucci *et al.*, 2007 popisuje zvýšenou bazální odolnost vůči biotrofnímu patogenu *Peronospora parasitica* u transgenních rostlin *Arabidopsis* se sníženou hladinou GSNOR. Byly pozorovány vysoké hladiny RSNO a také konstitutivní aktivace obranného genu *PR-1* a zvýšení systémově získané rezistence

(SAR). Opačný efekt byl pozorován u rostlin s nadexpresí GSNOR, které tak vykazovaly oslabení SAR. Na základě těchto poznatků byla vytvořena hypotéza, podle níž je aktivita GSNOR přechodně snížena po rozpoznání patogenu, což vede k přechodnému nárůstu hladiny RSNO, včetně GSNO. Vzhledem k popsané lokalizaci GSNOR ve floému, GSNO může mít funkci mobilního signálu, který je veden cévním systémem a aktivuje SAR (Espunya *et al.*, 2012). Zdá se, že GSNO působí synergicky s rostlinnými hormony (zejména s SA a JA) a aktivuje tak obranné geny lokálně i systémově. Po rozpoznání patogenu dochází k prudkému nárůstu hladiny NO, ROS a hormonu SA, které spouští hypersenzitivní reakci (HR) a další obranné odpovědi v rámci genové exprese. Aktivita enzymu GSNOR působí jako klíčový regulátor. Jejím snížením dojde k nárůstu RSNO uvnitř buněk a k posílení imunity rostliny v lokální i systémové úrovni.

Na Obr. 18 jsou uvedeny výsledky stanovení obsahu proteinových RSNO. Od 24 hpi lze vidět postupný mírný nárůst hladiny proteinových RSNO, přičemž maximální hodnota byla dosažena 72 hpi u všech tří genotypů. Nejvyšší nárůst je evidentní u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. Na Obr. 19 je graf porovnání GSNOR aktivity v jednotlivých vzorcích. V kontrastu s hladinou proteinových RSNO aktivita enzymu GSNOR od 24 hpi klesala. Nejvýrazněji se pokles aktivity projevil opět 72 hpi u všech genotypů, avšak s nejvyšší intenzitou u *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*.

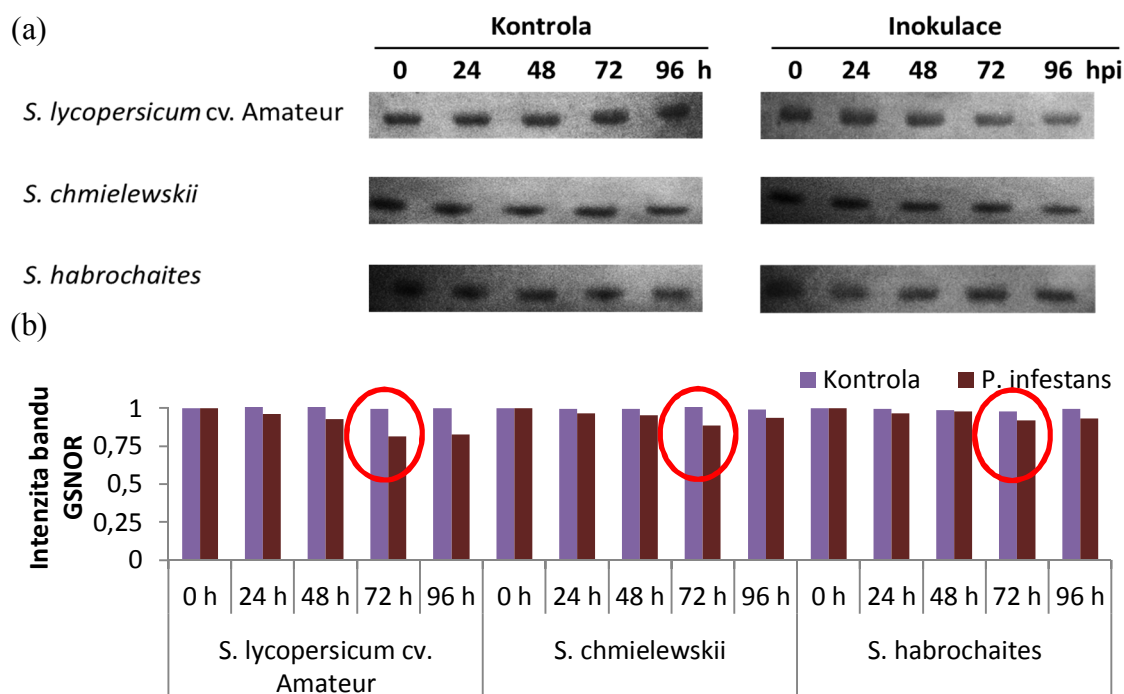


Obr. 18 Stanovení obsahu proteinových S-nitrosothiolů v průběhu patogenese *P. infestans* u tří genotypů *Solanum* spp. v přečištěných extraktech kolorimetricky při 540 nm Savillovou metodou.



Obr. 19 Stanovení GSNOR aktivity v průběhu patogenese *P. infestans* u tří genotypů *Solanum* spp.. Reduktasová aktivita enzymu GSNOR byla měřena Warburgovým optickým testem při 340 nm. Koenzym $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADH, substrát $0,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO.

S využitím primární polyklonální protilátky anti-SIGSNOR byly pomocí chemiluminiscence specificky detekovány bandy proteinu GSNOR (Obr. 20) o přibližné molekulové hmotnosti 45 kDa, což bylo prokázáno v publikaci Kubienová *et al.*, 2013a. Z výsledků denzitometrického vyhodnocení je zřejmé, že v čase 72 hpi byl u všech genotypů zaznamenán pokles intenzity detekovaného bandu, což koresponduje s výsledky stanovení aktivity GSNOR, kdy se aktivita 72 hpi významně snižovala.

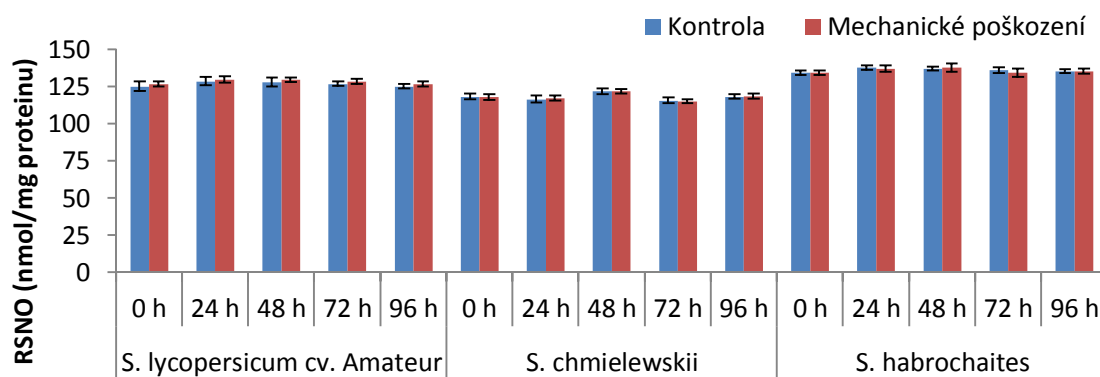


Obr. 20 Imunochemická detekce GSNOR v listech tří genotypů *Solanum* spp. po inokulaci *P. infestans* 0, 24, 48, 72, 96 hpi. (a) detekované bandy pomocí primární polyklonální protilátky anti-SIGSNOR (1:1000), sekundární protilátka značená HRP (1:10000), detekce chemiluminiscence. Do jamky bylo naneseno $20 \mu\text{g}$ celkových proteinů. (b) denzitometrické vyhodnocení detekovaných bandů v programu VisionWorks®LS Analysis.

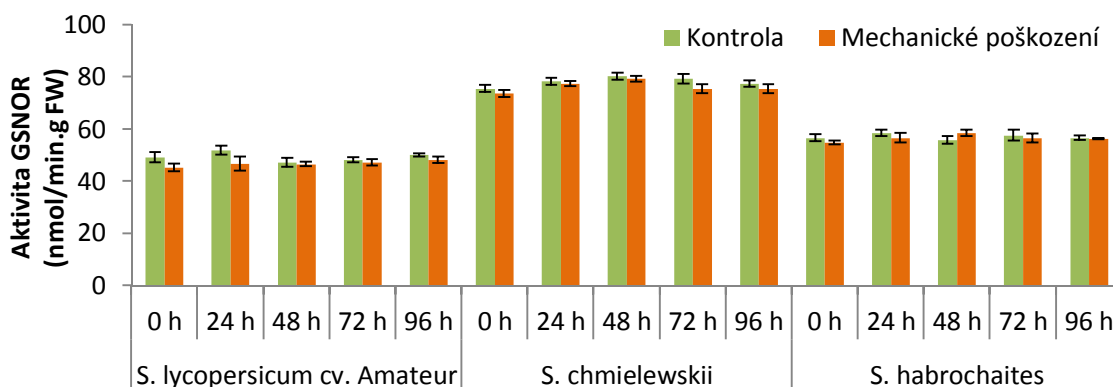
4.6 Vliv mechanického poškození abaxiální strany listu na hladinu proteinových RSNO a aktivitu GSNOR

Při infiltraci patogenu do abaxiální strany listu je nezbytné jemné mechanické poškození pomocí plastové špičky, aby bylo dosaženo maximálního průniku patogenu dovnitř pletiva. Jelikož se jedná o působení stresového faktoru, který by mohl potenciálně ovlivnit měření, bylo na místě stanovit obsah proteinových RSNO i aktivitu GSNOR i v mechanicky poškozených listech. Vzorky byly sbírány paralelně se vzorky inokulovanými a kontrolními v časech 0, 24, 48, 72 a 96 h. Z Obr. 21 je zřejmé, že velice nepatrné mechanické narušení listu nemělo významný vliv na obsah proteinových RSNO i aktivitu GSNOR. Rozdíly se pohybovaly v rozmezí $\pm 5\%$.

(a)



(b)



Obr. 21 Stanovení obsahu proteinových S-nitrosothiolů a GSNOR aktivity po mechanickém poškození abaxiální strany listu před samotnou infiltrací patogenu u tří genotypů *Solanum* spp. (a) obsah S-nitrosothiolů byl stanoven v přečištěných extraktech kolorimetricky při 540 nm Savillovou metodou. (b) reduktasová aktivita enzymu GSNOR byla měřena Warburgovým optickým testem při 340 nm. Koenzym $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NADH, substrát $0,4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSNO.

5 Závěr

- Rozrůstající se zelenožluté skvrny, charakteristické symptomy napadení *P. infestans*, byly nalezeny u *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. chmielewskii*, kdy nejvyšší rozsah nekrózy byl pozorován 96 hpi.
- Genotyp *S. habrochaites* nevykazoval příliš výrazné symptomy napadení, ale byl pozorován nejvýraznější rozsah nekrózy již 48 hpi a s narůstajícím časem se velikost léze dále nerozšiřovala.
- Inokulace patogenem způsobila lokální nárůst hladiny proteinových RSNO u všech studovaných genotypů, a to zejména v čase 72 hpi. Naopak, došlo k poklesu aktivity GSNOR, klíčového enzymu katabolismu GSNO, který jako donor NO může ovlivňovat hladinu ostatních RSNO.
- Mechanické poškození abaxiální strany listu nemělo významný vliv na obsah proteinových RSNO a ani na změny aktivity GSNOR.
- Detekce i purifikace proteinových S-nitrosothiolů značených metodou biotin-switch potvrdila zvýšenou S-nitrosylaci rovněž 72 hpi a s nejvyšší intenzitou u *S. lycopersicum* cv. Amateur.

6 Literatura

- Abat J. K., Deswal R. (2009): Differential modulation of S-nitrosoproteome of *Brassica juncea* by low temperature: change in S-nitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity. *Proteomics* **9**, 4368–4380.
- Abat J. K., Mattoo A. K., Deswal R. (2008): S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylaseoxygenase activity targeted for inhibition. *FEBS J* **275**, 2862–2872.
- Anderson L. E., Ringenberg M. R., Carol A. A. (2004): Cytosolic glyceraldehyde -3-P dehydrogenase and the B subunit of the chloroplast enzyme are present in the pea leaf nucleus. *Protoplasma* **223**, 33–43.
- Arcott L. D., Veine D. M., Williams C. H. (2000): Mixed disulfide with glutathione as an intermediate in the reaction catalyzed by glutathione reductase from yeast and as a major form of the enzyme in the cell. *Biochemistry* **39**, 4711–4721.
- Astier J., Kulik A., Koen E., Besson-Bard A., Bourque S., Jeandroz S., Lamotte O., Wendehenne D. (2012): Protein S-nitrosylation: what's going on in plants? *Free Radical Biology and Medicine* **53**, 1101–1110.
- Belenghi B., Romero-Puertas M. C., Vercammen D., Brackener A., Inze' D., Delledonne M., Van Breusegem F. (2007): Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 1352–1358.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Brookes P. S., Shiva S., Patel R. P., Darley-Usmar V. M. (2002): Measurement of mitochondrial respiratory thresholds and the control of respiration by nitric oxide. *Methods in Enzymology* **359**, 305–319.
- Brown G. C., Borutaite V. (2002): Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell dech. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 1440.
- Burza A. M., Pekala I., Sikora J., Siedlecki P., Malagocki P., Bucholc M., Koper L., Zielenkiewicz P., Dadlez M., Dobrowolska G. (2006): Nicotiana tabacum osmotic stress-activated kinase is regulated by phosphorylation on Ser-154 and Ser-158 in the kinase activation loop. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 34299–34311.
- Camerini S., Polci M. L., Restuccia U., Usuelli V., Malgaroli A., Bachi A. (2007): A novel approach to identify proteins modified by nitric oxide: the HIS-TAG switch method. *Journal of Proteome Research* **6**, 3224–3231.
- Cai H., Harrison D. G. (2000): Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research* **87**, 840–844.
- 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.
- Cecconi D., Orzetti S., Vandelle E., Rinalducci S., Zolla L., Delledonne M. (2009): Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* **30**, 2460–2468.
- Clarke D., Durner J., Navarre D. A. (2000): Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **13**, 1380–1384.
- Clementi E., Brown G. C., Feelisch M., Moncada S. (1998): Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 7631–7636.
- Corpas F. J., Alché J. D., Barroso J. B. (2013): Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in Plant Science* **126**, 1–3.
- Corpas F. J., Barroso J. B. (2014): Functional implications of peroxisomal nitric oxide (NO) in plants. *Frontiers in Plant Science, Plant Cell Biology* **5**, 1–3.
- Cooney R. V., Harwood P. J., Custer L. J., Franke A. A. (1994): Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives* **102**, 460–462.

- Daekyung K., Kenichi Y., Tatsuva O. (2006): Nitric oxide synthase-like enzyme mediated nitric oxide generation by harmful red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Journal of Plankton Research* **28**, 613-620.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R. A., Lamb C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Dicks A. P., Williams D. L. (1996): Generation of nitric oxide from S-nitrosothiols using protein-bound Cu²⁺ sources. *Chemistry & Biology* **8**, 655-659.
- Dietz K. J. (2011): Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & Redox Signaling* **15**, 1129-1159
- Dixon D. P., Laphorn A., Edwards R. (2002): Plant glutathione transferases. *Genome Biology* **3**, 3000-3004.
- Dong X. (2004): NPR1 all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 547-552.
- Doulias P. T., Greene J. L., Greco T. M., Tenopoulou M., Seeholzer S. H., Dunbrack R. L., Ischiropoulos H. (2010): Structural profiling of endogenous S-nitrosocysteine residues reveals unique features that accommodate diverse mechanisms for protein S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16958-16963.
- 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 Sciences of the United States of America USA* **95**, 10328-10333.
- Espunya M. C., De Michele R., Gómez-Cadenas A., Martínez M. C. (2012): S-Nitrosoglutathione is a component of wound- and salicylic acid-induced systemic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3219-3227.
- Fares A., Rossignol M., Peltier J. B. (2011): Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **416**, 331-336.
- Feechan A., Kwon E., Yun B. W., Wang Y., Pallas J. A., Loake G. J. (2005): A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8054-8059.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina L. (2010) Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* **22**, 3816-3830.
- Forrester M. T., Thompson J. W., Foster M. W., Nogueira L., Moseley M. A., Stamler J. S. (2009): Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture. *Nature Biotechnology* **27**, 557-559.
- Freschi L. (2013): Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives *Frontiers in Plant Science* **398**, 1-22.
- Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A. (2003): S-nitrosylation signaling in cell biology. *Molecular Intervention* **3**, 253-263.
- Gow A. J., Buerk D. G., Ischiropoulos H. (1997) A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2841-2845.
- Gow A. J., Farkouh C. R., Munson D. A., Posencheg M. A., Ischiropoulos H. (2004): Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American journal of physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**, 262-268.
- Groß F., Durner J., Gaupels F. (2013): Nitric oxide, antioxidant and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science* **4**, 419.
- Haendeler J., Hoffmann J., Tischler V., Berk B. C., Zeiher A. M., Dimmeler S. (2002): Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nature Cell Biology* **276**, 39872-39878.
- Hao G., Derakhshan B., Shi L., Campagne F., Gross S. S. (2006): SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine S-nitrosylation sites in complex protein mixtures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1012-1017.
- Harlow E., Lane D. (1988): *Antibodies: A Laboratory Manual*. CSHL Press, NY, USA, 53-135.
- Herold S., Röck G. (2003): Reactions of deoxy-, oxy-, and methemoglobin with nitrogen monoxide. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 6623-6634.

- Hoffmann V., Schimrigk S., Islamova S., Hellwig K., Lukas C., Brune N., Pohlau D., Przuntek H., Muller T. (2003): Efficacy and safety of repeated intrathecal triamcinolone acetonide application in progressive multiple sclerosis patients. *Journal of the Neurological Sciences* **211**, 81-84.
- Hill B. G., Dranka B. P., Bailey S. M., Lancaster J. R. Jr., Darley-Usmar V. M. (2010): What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 19699-19704.
- Hogg N. (2000): Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radical Biology and Medicine* **28**, 1478-1486.
- Holtgreffe S., Gohlke J., Starmann J., Druce S., Klocke S., Altmann B., Wojtera J., Lindermayr C., Scheibe R. (2008): Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiologia Plantarum* **133**, 211-228.
- Huang B., Chen C. (2006): An ascorbate-dependent artifact that interferes with the interpretation of the biotin switch assay. *Free Radical Biology and Medicine* **41**, 562-567.
- Chaki M., Fernández-Ocaña A. M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F. J., Luque F., Gómez-Rodríguez M., 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 and Cell Physiology* **50**, 265-279.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A. M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M. V., Pedrajas J. R., Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F. J., Barroso J. B. (2011): Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1803-1813.
- Chen K., Pittman R. N., Popel A. S. (2008): Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective. *Antioxidants & Redox Signaling* **10**, 1185-1198.
- Chen Y. Y., Huang Y. F., Khoo K. H., Meng T. C. (2007): Mass spectrometry-based analyses for identifying and characterizing S-nitrosylation of protein tyrosine phosphatases. *Methods* **42**, 243-249.
- Ischiropoulos H. (2003): Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**, 776-783.
- Jaffrey S. R., Snyder S. H. (2001): The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated. *Proteins Science's STKE: signal transduction knowledge environment* **86**, p11.
- Kallakunta V. M., Staruch A., Mutus B. (2010): Sinapinic acid can replace ascorbate in the biotin switch assay. *Biochimica et Biophysica Acta* **1800**, 23-30.
- Kato H., Takemoto D., Kawakita K. (2013): Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in potato plant. *Physiologia Plantarum* **148**, 371-386.
- Kettenhofen N. J., Broniowska K. A., Keszler A., Zhang Y., Hogg N. (2008) Proteomic methods for analysis of S-nitrosation. *Journal of Chromatography nad Bio Analytics Technologies Biomedicine Life Sciences*. **851**, 152-159.
- Kharitonov V. G., Sundquist A. R., Sharma V. S. (1995): Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 28158-28164.
- Kim Y. M., Talanian R. V., Billiar T. R. (1997): Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 31138-31148.
- Klessig D. F., Durner J., Noad R., Navarre D. A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J. M., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E., Silva H. (2000): Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8849-8855.
- Klotz L. O., Schroeder P., Sies H. (2002): Peroxynitrite signaling: Receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 737-743.
- Kovacs I., Lindermayr Ch. (2013): Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science* **137**, eCollection 2013.

- Kowaltowski A. J., Vercesi A. E., Castilho R. F. (1997): Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca^{2+} : correlation with mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta* **15**, 395-402.
- Kubienová, L., Kopečný, D., Tylichová, M., Briozzo, P., Skopalová, J., Šebela, M., Navrátil, M., Tâche, R., Luhová, L., Barroso, J. B., Petřivalský, M. (2013a): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosogluthione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889–902.
- Kubienová, L., Sedlářová, M., Vítečková-Wunchová A., Piterková, J., Luhová, L., Mieslerová, B., Lebeda, A., Navrátil, M., Petřivalský, M. (2013b): Effect of extreme temperatures on powdery mildew development and Hsp70 induction in tomato and wild *Solanum* spp. *Plant Protection Science* **49**, S41–S54.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lancaster J. R. (2008): Protein cysteine thiol nitrosation: maker or marker of reactive nitrogen species-induced nonerythroid cellular signaling? *Nitric Oxid: Biology and Chemistry* **19**, 68-72.
- Landino L. M., Koumas M. T., Mason C. E., Alston J. A. (2006). Ascorbic acid reduction of microtubule protein disulfides and its relevance to protein S-nitrosylation assays. *Biochemical Biophysical Research Communication* **340**, 347–352.
- Leshem Y. Y., Wills R., Veng-Va Ku V. (1998): Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide ($\text{NO}\cdot$) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 825-286.
- Lindermayr C., Durner J. (2009): S-nitrosylation in plants: pattern and function. *Journal of Proteomics* **73**, 1–9.
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J. (2005): Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**, 921-930.
- Lindermayr C., Sell S., Muller B., Leister D., Durner J. (2010): Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell* **22**, 2894–2907.
- 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.
- Luiking YC, Engelen MP, DEutz NE (2010): Regulation of nitric oxide productin in health and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **13**, 97-104.
- Maldonado-Alconada A. M., Echevarría-Zomeño S., Lindermayr C., Redondo-López I., Durner J., Jorrín-Novo J. V. (2011): Proteomic analysis of *Arabidopsis* protein S-nitrosylation in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 1493-1514.
- Mann M., Jensen O. N. (2003): Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology* **21**, 255-261.
- Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2007): Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovascular Research*. **75**, 220-228.
- Mitchell D. A., Morton S. U., Fernhoff N. B., Marletta M. A. (2007): Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 11609-11614.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. (2011): ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* **16**, 300-309.
- Mličková K., Luhová L., Lebeda A., Mieslerová B., Peč P. (2004): Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 753-761.
- Moncada S., Bolanos J. P. (2006): Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry* **97**, 1676–1689.
- 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.
- Navarre D. A., Wendehenne D., Durner J., Noad R., Klessig D. F. (2000): Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiology* **122**, 573-582.

- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1237.
- Noble D. R., Williams D. Lyn H. (2000): Structure-reactivity studies of the Cu²⁺-catalyzed decomposition of four S-nitrosothiols based around the S-nitrosocysteine/S-nitrosogluthathione Structures. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **4**, 392-398.
- Paige J. S., Xu G., Stancevic B., Jaffrey S. R. (2008): Nitrosothiol reactivity profiling identifies S-nitrosylated proteins with unexpected stability. *Chemistry. & Biology* **15**, 1307-1316.
- Park J. K. J., Kostka P. (1997): Fluorometric Detection of Biological S-Nitrosothiols. *Analytical Biochemistry* **249**, 61-66.
- Perazzolli M., Dominici P., Romero-Puertas M. C., Zago E., Zeier J., Sonoda M., Lamb C., Delledonne M. (2004): Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**, 2785-2794.
- Pinder A. G., Rogers S. C., Khalatbari A., Ingram T. E., James P. E. (2009): The measurement of nitric oxide and its metabolites in biological samples by ozone-based chemiluminescence. *Methods in Molecular Biology* **476**, 10-27.
- Piterková J., Hofman J., Mieslerová B., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A., Petřivalský M. (2011): Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp.- *Oidium neolycopersici* interactions. *Environmental and Experimental Botany* **74**, 37-44.
- Piterková J., Luhová L., Hofman J., Turečková V., Novák O., Petřivalský M., Fellner M (2012): Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany* **110**, 767-776.
- Piterková, J., Luhová, L., Mieslerová, B., Lebeda, A., Petřivalský, M. (2013): Nitric oxide and reactive oxygen species regulate the accumulation of heat shock proteins in tomato leaves in response to heat shock and pathogen infection. *Plant Science* **207**, 57-65.
- Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008): Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chemické listy* **102**, 410-416.
- Piterková J., Petřivalský M., Luhová L., Mieslerová B., Sedlářová M., Lebeda A. (2009): Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Molecular Plant Pathology* **10**, 501-513.
- Prasanth K. R., Huang Y. W., Liou M. R., Wang R. Y., Hu C. C., Tsai C. H., Meng M., Lin N. S., Hsu Y. H. (2011): Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase negatively regulates the replication of Bamboo mosaic virus and its associated satellite RNA. *Journal of Virology* **85**, 8829-8840.
- Rafikova O., Rafikov R., Nudler E. (2002): Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 5916-5918.
- 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.
- Romero-Puertas M. C., Laxa M., Matte A., Zaninotto F., Finkemeier I., Jones A. M., Perazzolli M., Vandelle E., Dietz K. J., Delledonne M. (2007): S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**, 4120-4130.
- Rouhier N. (2010): Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytologist* **186**, 365-372.
- Rustérucci Ch., Espunya M. C., Díaz M., Chabannes M., Martínez M. C. (2007): S-Nitrosogluthathione reductase affords protection against pathogens in Arabidopsis, both locally and systemically. *Plant Physiology* **143**, 1282-1292.
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002): Arabidopsis glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosogluthathione reductase. *FEBS Letters* **515**, 20-24.
- Saville B. (1958): A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* **83**, 670-672.
- Shahani N., Sawa A. (2011): Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for S-nitrosylation. *Antioxidants & Redox Signaling* **14**, 1493-1504.
- Schonhoff C. M., Gaston B., Mannick J. B. (2003): Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 18265-18270.

- Stamler J. S., Jaraki O., Osborne J., Simon D. I., Keaney J., Vita J., Singel D., Valeri C. R., Loscalzo J. (1992): Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7674-7677.
- Stöhr C., Stremmlau S. (2006): Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* **57**, 463-470.
- Swift H. R., Williams D. L. H. (1997): Decomposition of S-nitrosothiols by mercury(II) and silver salts. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **10**, 1933-1935.
- Tada Y., Spoel S. H., Pajeroska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. (2008): Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952-956.
- Tarrago L., Laugier E., Zaffagnini M., Marchand C., Le Maréchal P., Rouhier N., Lemaire S. D., Rey P. (2009): Regeneration mechanisms of *Arabidopsis thaliana* methionine sulfoxide reductases B by glutaredoxins and thioredoxins. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 18963-18971.
- Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P., Lancaster, J. R. (2001): The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **98**, 355-360.
- Tománková K., Luhová L., Petřivalský P., Peč P., Lebeda A. (2006): Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolyopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**, 22-32.
- Tun N. N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveria V., Handro W., Floh, E. I. S. and Scherer, G. F. E. (2006): Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology* **47**, 346-354.
- 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 kinase in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **19**, 429-440.
- Vanzo E., Ghirardo A., Merl-Pham J., Lindermayr C., Heller W., Hauck S. M., Durner J., Schnitzler J. P. (2014): S-nitroso-proteome in poplar leaves in response to acute ozone stress. *PLoS One* **9**, 1-14.
- Wendehenne D., Pugin A., Klessig D. F., Durner J. (2001): Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science* **4**, 177-183.
- Yamasaki H., Sakihama Y. (2000): Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* **18**, 89-92.
- Yu M., Lamattina L., Spoel S. H., Loake G. J. (2014): Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist* **202**, 1142-1156.
- Yun B. W., Feechan A., Yin M., Saidi N. B., Le Bihan T., Yu M., Moore J. W., Kang J. G., Kwon E., Spoel S. H., Pallas J. A., Loake G. J. (2011): S nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264-268.
- Zaffagnini M., Bedhomme M., Groni H., Marchand C. H., Puppo C., Gontero B., Cassier-Chauvat C., Decottignies P., Lemaire S. D. (2011): Glutathionylation in the photosynthetic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic survey. *Molecular & Cell Proteomics* **11**, 2.

7 Seznam použitých zkratk a symbolů

2D-SNO-DIGE	2D-Diferencová gelová elektroforéza
AA/BIS	Akrylamid- <i>N,N'</i> -bisakrylamid
APS	Persíran amonný
AP	Alkalická fosfatasa
AscP	Askorbátperoxidasa
AtMC3	Metakaspasa 3 u <i>Arabidopsis</i>
AtRBOHD	NADPH oxidasa u <i>Arabidopsis</i>
Biotin-HPDP	(N-(6-(biotinamido)hexyl)-3'-(2'- -pyridyldithio)propionamid)
BSA	Hovězí sérový albumin
BST	Biotin switch
CAT	Katalasa
CBB R-250	Coomassie Brilliant Blue R-250
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
CNX1	Kalnexin 1
Cy-3	Zelené barvivo indokarbocyanin
Cy-5	Červené barvivo indodikarbocyanin
DMF	N,N-dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
EF-1 α	Elongační faktor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GR	Glutathionreduktasa
GSH	Glutathion
GSNHOH	S-hydroxylaminoglutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSSG	Glutathiondisulfid
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny)- -ethansulfonová kyselina
Hpi	Hodin po inokulaci
MMTS	S-methylmethanthiosulfonát

MYB2	Transkripční faktor
NADH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NBT-BCIP	Nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem
NED	N-(1-naftyl)ethylendiamin
NEM	N-ethylmaleimid
NO ⁻	Nitroxylový anion
NO	Oxid dusnatý
NO ⁺	Nitrosoniový kation
NO·	Nenabitý radikál oxidu dusnatého
NO ₂ ·	Radikál oxidu dusičitého
NO ₂	Oxid dusičitý
NO ₃ ⁻	Dusičnanový anion, nitrát
N ₂ O	Oxid dusný
N ₂ O ₃	Oxid dusitý
N ₂ O ₄	Dimer oxidu dusičitého
NOS	NO-synthasa
NPR1	Nonexpressor of pathogenesis-related proteins 1
NtOSAK	Osmoticky stresem aktivovaná proteinkinasa u <i>Nicotiana tabacum</i>
ONOO ⁻	Peroxydusitan
O ₂ NOO ⁻	Peroxydusičnan
ONOOCO ₂ ⁻	Nitrosoperoxokarbonát
PHT1,3	Fosfátové transportéry
PrxIIIE	Peroxiredoxin IIE
RD21	Cystein-proteasa
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RS ⁻	Thiolový anion
RSH	Thiol
RSNO	S-nitrosothiol
RSSR	Disulfid
SABP3	Protein vázající kyselinu salicylovou
SAR	Systémově získaná rezistence

SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
SIGSNOR	Rekombinantní GSNOR ze <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Amateur
SNO-RAC	S-Nitrosothiols Resin-Assisted-Capture
SNOSID	S-Nitrosothiols-Site Identification
SNP	Nitroprussid sodný
TCA	Trichloroctová kyselina
TG1	Transkripční faktor 1
TIR1	Auxinový receptor
TBS	Fyziologický roztok pufovaný Tris
TEMED	<i>N, N'</i> -tetramethylendiamin
TR	Thioredoxin reduktasa
Trx	Thioredoxin