

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vliv modifikace struktury elicitinů infestinu a kryptogeinu na proces S-nitrosylace u modelového systému *Solanum* spp.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Lucie Berčíková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tereza Tichá, Ph.D.
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Tereze Tiché, Ph.D. za pomoc, odborné vedení, trpělivost, cenné rady, poskytnutí potřebné literatury a čas věnovaný při zpracování teoretické a experimentální části práce.

Dále chci poděkovat celému kolektivu Katedry biochemie za příjemné prostředí a pomoc při vypracování mé experimentální práce, doc. RNDr. Barboře Mieslerové, Ph.D. za kultivaci patogenu a následnou inokulaci rostlin.

V neposlední řadě velké poděkování patří také mé rodině, která mě podporovala a dodávala sílu během celého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Lucie Berčíková
Název práce	Vliv modifikace struktury elicitinů infestinu a kryptogeinu na proces S-nitrosylace u modelového systému <i>Solanum</i> spp.
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Tereza Tichá, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Elicitiny jsou malé extracelulární proteiny sekretované patogenními organismy rodů *Phytophthora* a *Pythium*, které během interakce s hostitelskou buňkou aktivují obranné reakce rostlin související s produkcí oxidu dusnatého (NO). V rostlinných obranných mechanismech se významně uplatňuje S-nitrosylace cysteinových thiolů, posttranslační modifikace proteinů představující hlavní signální dráhu NO. Na enzymové regulaci hladiny S-nitrosylovaných proteinů se u rostlin podílí S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) a thioredoxinreduktasa (TrxR).

Tato diplomová práce se zabývá studiem možného vlivu elicitinů kryptogeinu a infestinu a jejich mutantů v poloze 13 a 84 na proces S-nitrosylace u čtyř genotypů *Solanum* spp. vedoucí k možným změnám rezistence vůči patogenu *Pseudoidium neolycopersici*. Cílem práce bylo zjistit, jak aplikace elicitinů a jejich mutantů ovlivní hladiny proteinových S-nitrosothiolů, aktivity enzymů GSNOR a TrxR v listech neinfikovaných vzorků a také během patogeneze *P. neolycopersici*. Vlivem studovaných elicitinů došlo k nárůstu proteinových S-nitrosothiolů u neinfikovaných vzorků u všech testovaných genotypů *Solanum* spp. Změny o různé intenzitě byly zaznamenány v aktivitách enzymů GSNOR a TrxR v závislosti na typu elicitinu a studovaném genotypu.

Klíčová slova	Elicitiny, infestin, kryptogein, patogeneze, <i>Pseudoidium neolycopersici</i> , reaktivní formy dusíku, S-nitrosoglutathionreduktasa, S-nitrosothioly, S-nitrosylace, <i>Solanum</i> spp, thioredoxinreduktasa
Počet stran	82
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Lucie Berčíková
Title	Effect of structural modification of elicitors infestin and cryptogein in proces S-nitrosylation in a model system <i>Solanum</i> spp.
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Tereza Tichá, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

Elicitins are extracellular elicitors secreted by pathogenic organisms of genus *Phytophthora* and *Pythium*. Elicitins activate defense responses associated with biosynthesis of nitric oxide (NO) during the plant-pathogen interaction. S-nitrosylation of cysteine residues in proteins, posttranslational modification representing the major NO signaling pathway, plays an important role in the plant defense mechanisms. Two denitrosylation enzymes, S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) and thioredoxine reductase (TrxR), are involved in the regulation of S-nitrosylated proteins levels.

The aim of the diploma thesis was to study the influence of elicitors and their mutants on the level of protein S-nitrosothiols in leaves of four *Solanum* spp. genotypes and during pathogenesis of tomato powdery mildew. The activities of two enzymes involved in denitrosylation processes, GSNOR and TrxR, were analyzed. The studied elicitors caused increased levels of protein S-nitrosothiols in all studied *Solanum* spp. genotypes. Different modulation of GSNOR and TrxR activities depending on the type of elicitor and the studied genotype was detected.

Keywords	Elicitins, infestin, cryptogein, pathogenesis, <i>Pseudoidium neolycopersici</i> , reactive nitrogen species, S-nitrosogluthathione reductase, S-nitrosothiols, S-nitrosylation, <i>Solanum</i> spp, thioredoxin reductase
Number of pages	82
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	ELICITINY	2
2.1.1	Klasifikace elicitorů	2
2.2	Elicitiny	4
2.2.1	Rozdělení elicitinů	5
2.2.2	Kryptogein	7
2.2.3	Infestin	8
2.3	Oxid dusnatý	9
2.3.1	Biosyntéza NO	11
2.3.1.1	Enzymové zdroje biosyntézy NO u rostlin	11
2.3.1.2	Neenzymové zdroje biosyntézy NO u rostlin	14
2.4	Posttranslační modifikace proteinů zprostředkované RNS	15
2.4.1	Nitrace	15
2.4.2	S-nitrosylace	15
2.5	Regulace hladiny S-nitrosothiolů	16
2.5.1	Glutathion	17
2.5.2	S-nitrosoglutathionreduktasa	17
2.5.3	Thioredoxinreduktasa	20
2.5.4	Úloha NO a S-nitrosylace v obranných mechanismech rostlin při patogenesi	23
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Materiál a přístroje	27
3.1.1	Chemikálie	27
3.1.2	Přístroje a vybavení	27
3.2	Biologický materiál	28
3.2.1	Rostlinný materiál	28
3.2.2	Elicitiny	29
3.2.3	Patogen	29
3.3	Experimentální metody	29
3.3.1	Elicitace listů a následná inokulace patogenem	29
3.3.2	Extrakce	30
3.3.3	Stanovení koncentrace celkových proteinů Bradfordovou metodou	31
3.3.4	Stanovení koncentrace proteinových S-nitrosothiolů Savillovou metodou	31
3.3.5	Měření aktivity enzymu S-nitrosoglutathionureduktasy (GSNOR)	32
3.3.5.1	Příprava S-nitrosoglutathionu (GSNO)	32
3.3.6	Měření aktivity enzymu thioredoxinreduktasy (TrxR)	33
3.3.7	Biotin-switch	34
3.3.8	SDS-PAGE	37
3.3.9	Western blot	38
3.3.10	Statistické vyhodnocení dat	39
4	VÝSLEDKY	40
4.1	Vliv elicitinů na S-nitrosylaci	40
4.1.1	Porovnání hladiny proteinových S-nitrosothiolů u jednotlivých genotypů <i>Solanum</i> spp.	40
4.1.2	Stanovení hladiny proteinových S-nitrosothiolů po elicitaci	41

4.2	Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch	44
4.3	Vliv elicitinů na denitrosylaci	50
4.3.1	Zavedení protokolu pro stanovení aktivity thioredoxinreduktasy u rostlin	50
4.3.2	Aktivita thioredoxinreduktasy a S-nitrosoglutathionreduktasy	51
4.3.3	Stanovení aktivity thioredoxinreduktasy po elicitaci	52
4.3.4	Stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy po elicitaci	55
5	DISKUSE	58
6	ZÁVĚR	64
7	LITERATURA	65
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	72

CÍLE PRÁCE

V teoretické části diplomové práce bylo cílem vypracovat literární rešerši zaměřenou na charakterizaci elicitinů se zaměřením na infestin a kryptogein. Byly zpracovány aktuální poznatky o úloze NO a S-nitrosylace v obranném mechanismu rostlin v průběhu patogenese včetně charakterizace úlohy dvou klíčových enzymů, S-nitrosoglutathionreduktasy a thioredoxinreduktasy, ovlivňující hladinu S-nitrosylovaných proteinů.

Cílem v experimentální části bylo:

- Studium vlivu elicitinů a jejich mutantů na S-nitrosylaci v průběhu patogenese *Pseudoidium neolycopersici*.
 - Stanovení hladiny proteinových S-nitrosothiolů Savillovou metodou.
 - Detekce S-nitrosylovaných proteinů značených metodou biotin-switch.
- Studium vlivu elicitinů a jejich mutantů na denitrosylaci v průběhu patogenese *Pseudoidium neolycopersici*.
 - Zavedení protokolu pro měření aktivity enzymu thioredoxinreduktasy u rostlin.
 - Stanovení aktivity enzymu thioredoxinreduktasy.
 - Stanovení aktivity enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy.

1 ÚVOD

Elicitory jsou významné signální molekuly, které v rámci interakce rostlina-patogen spouští různé kaskády obranných reakcí rostlin. Zvláštní skupinou proteinových elicitorů jsou tzv. elicitiny produkované patogenními organismy zástupců oomycet rodů *Phytophthora* a *Pythium*, které nejsou schopné si samy vytvářet steroly potřebné pro růst a sporulaci. Nejvýznamnějšími zástupci jsou kryptogein a infestin. Elicitiny s vysoce konzervovanou strukturou složenou z 98 aminokyselin obsahují hydrofobní dutinu umožňující přenášet steroly z hostitelské buňky. Zároveň po rozpoznání elicitinu rostlinným receptorem dochází k aktivaci kaskády signálních drah vedoucích k obranným reakcím, které mají mimo jiné za následek zvýšenou biosyntézu oxidu dusnatého (NO). U rostlin představuje S-nitrosylace nejdůležitější molekulární mechanismus v rámci buněčné signalizace NO.

S-nitrosylace je posttranslačně probíhající kovalentní modifikace umožňující navázání nitroso skupiny (-NO) na thiolovou skupinu (-SH) cysteinu cílových proteinů. V jejím důsledku dochází k ovlivnění aktivity, lokalizace či stability cílového proteinu. Během patogenese podléhá regulaci prostřednictvím S-nitrosylace řada významných proteinů zapojených v obranných mechanismech rostlin, například NADPH-oxidasa, askorbátperoxidasa, prometakaspasa 9 nebo proteiny zapojené v signálních drahách kyseliny salicylové. Hladina S-nitrosylovaných proteinů je ovlivněna nejen faktory mající vliv na přítomnost donoru NO, ale i mechanismy podílejícími se na jejich degradaci. Denitrosylace proteinů může probíhat nepřímo díky interakci -NO skupiny s redukováným glutathionem (GSH) za vzniku S-nitrosoglutathionu (GSNO), který je redukován enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR). Další možnou cestou je přímá degradace prostřednictvím aktivity enzymu thioredoxinreduktasy (TrxR).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Elicitory

Původně byl termín elicitor používán pouze pro označení látek stimulující vznik fytoalexinů (Keen, 1975). Nyní se jako elicitory označují všechny sloučeniny schopné spouštět různé kaskády obranných reakcí rostlin, a to nejen produkcí fytoalexinů, ale i reaktivních forem kyslíku (ROS) a reaktivních forem dusíku (RNS) (Osman *et al.*, 2001).

2.1.1 Klasifikace elicitorů

Elicitory lze obecně klasifikovat podle několika kritérií (Tab. 1). Podle biologického původu můžeme elicitory rozdělit do dvou skupin, a to na biotické a abiotické. Abiotické elicitory jsou látky nebiologického původu, a to například těžké kovy, inhibitory některých metabolických kroků, některá antibiotika, fungicidy či UV záření. Mezi biotické elicitory řadíme látky biologického původu. První biotický elicitor byl objeven v roce 1975 (Keen, 1975) při studiu vlivu patogenu *Phytophthora megasperma*, způsobujícího kořenovou plíseň, na produkci fytoalexinů v sóji (*Glycine max cv. Harosoy*). Od té doby počet nově objasněných molekulárních struktur elicitorů stále stoupá.

Z hlediska vzniku rozdělujeme elicitory na endogenní a exogenní. Exogenními elicitory nazýváme látky produkované a uvolňované patogenem, které interagují s receptory hostitelské rostliny, například některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy (Procházka *et al.*, 1998). Naopak endogenní elicitory produkuje sama rostlina až při napadení patogenem. Patří sem například oligomery chitinu, oligoglukany a glukoproteiny, které se uvolňují působením lytických enzymů při štěpení rostlinné buněčné stěny (Procházka *et al.*, 1998; Akimoto *et al.*, 1999; Angelova *et al.*, 2006).

Z chemického hlediska se jedná o velmi rozmanitou skupinu látek, kde se vyskytují polysacharidy, oligosacharidy, polypeptidy, proteiny, glykoproteiny, lipidy atd. Obecně se proto dělí pouze podle proteinové a neproteinové povahy (Radman *et al.*, 2003).

Dále lze elicitory dělit podle interakce s hostitelskou buňkou na nespecifické a specifické. Nespecifické elicitory se vyskytují u celé řady patogenů. Příkladem jsou

polysacharidy buněčných stěn, některé nízkomolekulární látky jako mastné kyseliny, steroly atd. Mezi specifické elicitory se řadí látky tvořeny konkrétním patogenem. Většinou jde o produkty *Avr* genů, které bývají rozpoznávány receptory jen určité skupiny hostitelů (Hahn, 1996).

Tab. 1 Klasifikace elicatorů (upraveno podle Radman *et al.*, 2003).

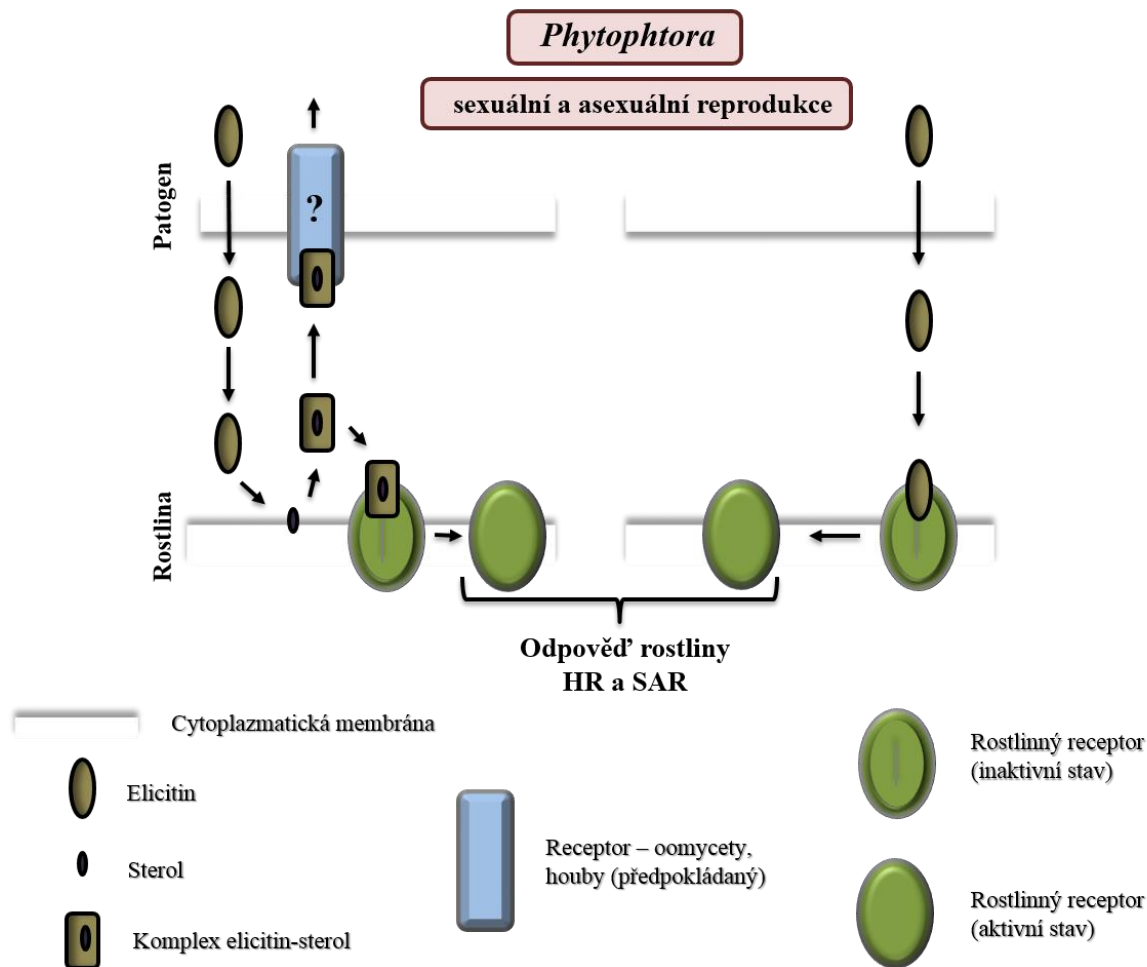
Elicitory						
Fyzikální elicitory	Poranění					P
Chemické elicitory	Abiotické		Ionty kovů, oxalát			Pc
	Biotické	Komplexní složení	Spory hub, buněčná membrána kvasinek, buněčná membrána mycelií			Pc F
		Konkrétní složky	Sacharidy	Polysacharidy	Alginát	Pc F B
					LBG	F
					Pektin	Pc, F
					Chitosan	Pc
					Guarová guma	Pc
			Oligosacharidy	Manuronát	F	
				Guluronát	F	
				Manan	F	
				Galakturonidy	Pc	
			Proteiny	Peptidy	Glutathion	Pc
				Proteiny	Elicitiny Oligandrin Celulosa	Pc
			Lipidy		Lipopolysacharidy	Pc
			Glykoproteiny		Nejsou zjištěny	Pc
Těkavé látky		C ₆ - C ₁₀	Pc			

Zkratky: P: rostliny, Pc: rostlinná buněčná kultura, B: bakteriální buněčná kultura, F: houbová bakteriální kultura

2.2 Elicitiny

Zvláštní skupinou malých extracelulárních elicitorů jsou tzv. elicitiny. Jedná se o strukturně podobné proteiny vylučované patogenními organismy zástupců oomycet rodů *Phytophthora* a *Pythium* (Kamoun *et al.*, 1994; Huet *et al.*, 1995; Bonnet *et al.*, 1996). Zmíněné organismy nedokáží sami syntetizovat steroly či látky lipidního charakteru potřebné pro jejich růst a sporulaci a využívají proto externí zdroje sterolů. Díky elicitinům, které obsahují hydrofobní dutinu umožňující specifickou vazbu pro steroly, jsou schopny přenášet steroly z hostitelského organismu do patogenního organismu a spouštět aktivní fázi sexuální a asexuální reprodukce patogenu (Bonnet *et al.*, 1996; Mikes *et al.*, 1998). Vytvořený komplex sterol-elicitin se také váže na receptor hostitelského organismu a spouští obranný mechanismus rostliny. Aktivace obranných reakcí je spojována mimo jiné se zvýšenou produkcí oxidu dusnatého (NO) a tvorbou RNS (Osman *et al.*, 2001). Dvojitá role komplexu sterol-elicitin je znázorněná na Obr. 1.

Elicitiny o velikosti přibližně 10 kDa jsou obvykle složeny z 98 aminokyselin s vysoce konzervovanou strukturou (> 60%) (Huet *et al.*, 1995) a je pro ně charakteristické i zastoupení jednotlivých aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Aminokyseliny serin a threonin se vyskytují až z 30 % ve struktuře proteinu, naopak tryptofan, histidin a arginin zcela chybí (Ponchet *et al.*, 1999). Ve všech strukturách elicitinů se nachází jeden antiparalelní β -list a pět α -helixů, které jsou propojeny třemi intramolekulárními disulfidovými můstky mezi šesti cysteiny lokalizovanými v konzervovaných pozicích (Plešková *et al.*, 2011).



Obr. 1 Úloha elicitinů při transportu sterolů a aktivaci obranných reakcí rostlin. Elicitiny produkované patogenním organismem jsou schopny vychytávat steroly potřebné pro sexuální a asexuální reprodukci patogenu. Komplex elicitin-sterol, stejně tak volný elicitin, se váže na rostlinný receptor a spouští obranné reakce (upraveno podle Blein *et al.*, 2002).

2.2.1 Rozdělení elicitinů

Na základě hodnot izoelektrického bodu (pI) lze elicitiny klasifikovat na α -elicitiny (kyselé, pI <5) nebo β -elicitiny (bazické, pI >7,5). Kyselé elicitiny produkuje řada patogenů, v případě bazických pouze některé. Obě skupiny se dále liší i rozdílnou nekrotickou aktivitou (Leberre *et al.*, 1994).

Dle primární struktury dělíme elicitiny do pěti tříd (Tab. 2). Do třídy I se řadí proteiny o molekulové hmotnosti 10 kDa, tvořené 98 aminokyselinami. Ve struktuře vždy obsahují 6 cysteinů, 3 methioniny, 2 fenylalaniny a 3 glyciny. Elicitiny z této skupiny jsou rozděleny na α -elicitiny a β -elicitiny (Nespoulous *et al.*, 1992). Další třída I'

(též označována jako třída Py) obsahuje většinu elicitinů produkovaných patogeny rodu *Pythium*. Tento typ elicitinů se mírně liší od elicitinů třídy I. Polypeptidový řetězec je tvořen 98-101 aminokyselinami. Charakteristickým rysem je přítomnost asparaginových glykosylačních míst (Kamoun *et al.*, 1997). Třída II obsahuje silně kyselé proteiny tzv. hyperkyselé elicitiny (HAE). Elicitiny z této třídy se skládají ze 103-104 aminokyselin, které vlastní krátký hydrofilní C-konec. Do poslední třídy III spadají malé proteiny o velikosti 165-170 aminokyselin. Příkladem jsou elicitiny sekretované patogenem *Phytophthora cryptogea* (Ponchet *et al.*, 1999; Kawamura *et al.*, 2009).

Tab. 2 Rozdělení elicitinů podle izoelektrického bodu (pI) (upraveno podle Ponchet *et al.*, 1999).

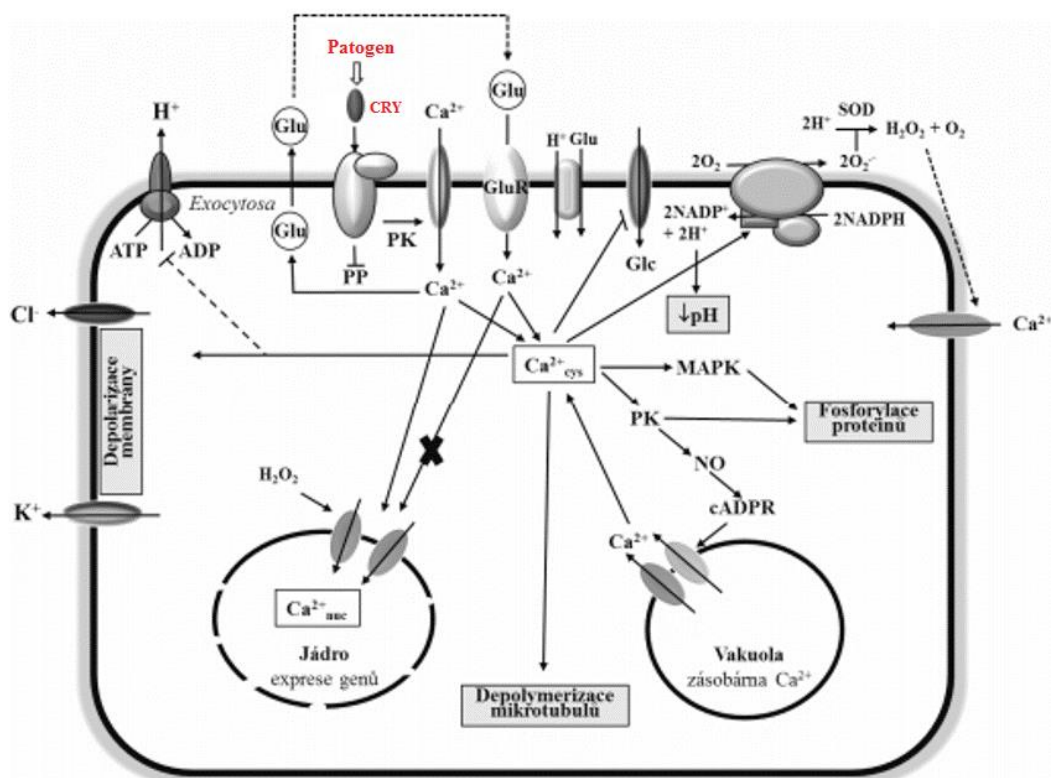
Třída	Rozsah pI	Domény	Elicitiny
I α	4-5	myristyl helix-smyčka-helix	cactorein, cinnamomin, citrophthorin, INF1, megaspermin, parasiticein
I β	7,5-8,5	proteinkinasa C fosfo-místo myristyl helix-smyčka-helix	kryptogein, dreschlerin, megaspermin
I'	4,6	N-glykosylace myristyl helix-smyčka-helix	oedochilin
II	3,5	kaseinkinasa fosfo-místo myristyl helix-smyčka-helix	cinnamomin-ha1, cinnamomin-ha2, krytogein-ha1, kryptogein-ha2
III	3,5-4,0	N-glykosylace cAMP fosfo-místo proteinkinasa C fosfo-místo kaseinkinasa fosfo-místo leucinový zip myristyl helix-smyčka-helix	infestin 2A infestin 2B

2.2.2 Kryptogein

Kryptogein (CRY), globulární hydrofilní protein o molekulové hmotnosti 10,323 kDa, je řazen mezi bazické β -elicitiny (pI 8,5). CRY je produkován patogenní oomycetou *Phytophthora cryptogea* po interakci s tabákem (*Nicotiana tabacum*). Po napadení dochází k odumírání buněk v místě poranění, ale zároveň CRY způsobí zvýšenou rezistenci vůči patogenům v ostatních částech rostliny (Ricci *et al.*, 1989; Mikes *et al.*, 1998).

Sekundární struktura CRY je složena z šesti α -helixů, jednoho β -listu a jedné ω -smyčky (Boissy *et al.*, 1996; Gooley *et al.*, 1998). ω -smyčka je velice flexibilní a vysoce konzervovaná. Je umístěná v proteinové dutině, do které se váží steroly. Struktura kryptogein-sterolového komplexu má malou konformační změnu v ω -smyčkové oblasti po navázání sterolu na elicitin (Boissy *et al.*, 1999).

Rostlinná buňka rozpoznává CRY (resp. komplex elicitinu se sterolem) přes specifické receptory v plazmatické membráně. Schéma spuštění signální kaskády způsobené CRY je znázorněné na Obr. 2. Po navázání na receptor dochází ke spuštění kaskády signální drah vedoucí k syntéze NO a ROS, fosforylaci proteinů, aktivaci MAP kinas, inhibici proteinkinasy, inhibici transportu glukosy, inhibici H^+ -ATPasové pumpy, alkalizaci extracelulární tekutiny, depolarizaci membrány a depolarizaci mikrotubulů (Blein *et al.*, 1991; Garcia-Brugger *et al.*, 2006).



Obr. 2 Model signální kaskády indukované kryptogeinem. Interakce kryptogeinu (CRY) s receptorem, ale i vazba glutamátu na ionotropní glutamový receptor (GluR), způsobí zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Zvýšená hladina Ca^{2+} iontů má za následek depolarizaci plazmatické membrány, depolarizaci mikrotubulů, aktivaci enzymů NADPH oxidasy a MAP kinasy, inaktivaci H^+ -ATPasové pumpy. Aktivace NADPH oxidasy vede ke zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a oxidu dusnatého (NO). NO a ROS indukují uvolnění Ca^{2+} iontů do cytosolu a následně v jádře dochází k regulaci exprese genů kódujících Ca^{2+} -dependentní proteiny (převzato z Moricová *et al.*, 2014).

2.2.3 Infestin

Infestin (INF) je hlavní elicitin produkovaný patogenem *Phytophthora infestans* způsobující plíseň tabáku (*Nicotiana tabacum*) a rajčat (*Solanum* spp.). Řadí se mezi α -elicitiny (pI 4,7) náležící do třídy I s molekulovou hmotností 10,325 kDa. Jako většina elicitinů obsahuje zakonzervovaný motiv ve své struktuře. Hydrofobní dutinu schopnou vázat ergosterol vytváří 15 aminokyselinových residuí (Ponchet *et al.*, 1999). INF, stejně jako CRY, vyvolává hypersenzitivní odpověď u tabáku (Kamoun *et al.*, 1998; Kanzaki *et al.*, 2003) a také i u některých druhů rajčat, avšak s rozdílnou koncentrací elicitinu potřebnou pro vyvolání obranné reakce (Kamoun *et al.*, 1997). Na Obr. 3 jsou porovnány aminokyselinové sekvence infestinu (INF) a kryptogeinu (CRY).

	10	20	30	40	50
INF	TTCTTSQQTV	AYVALVSI LS	DTSEFNQCSTD	SGYSMLTATS	LPTTEQYKLM
CRY	TACTASQQTA	AYKTLVSI LS	DASFNQCSTD	SGYSMLTATS	LPTTEQYKLM
	60	70	80	90	100
INF	CASTACKT MI	NKIVSLNAPD	CELTVP TSGL	VLVN VYSYANG	FSSK CASL
CRY	CASTACNT MI	KKIVTLNPPN	CDLTV PTSGL	VLVN VYSYANG	FSNK CSSL

Obr. 3 Porovnání aminokyselinových sekvencí infestinu (INF) a kryptogeinu (CRY). Zvýrazněná residua aminokyselin lemující dutinu CRY jsou konzervována i v sekvenci INF (upraveno podle Lascombe *et al.*, 2002).

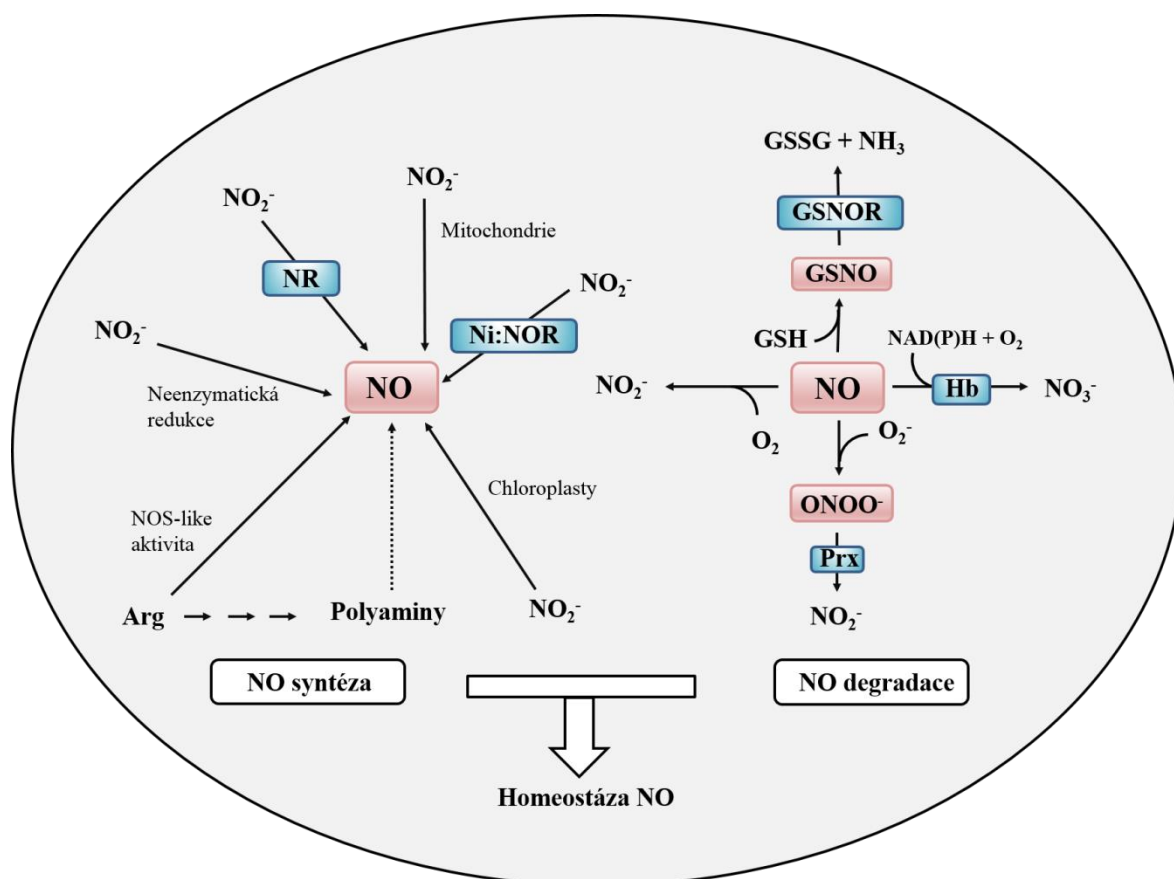
2.3 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je malá molekula účastnící se řady fyziologických a patofyziologických procesů u rostlin i živočichů. Jedná se o reaktivní radikál s krátkým poločasem rozpadu v řádu několika sekund. Díky lipofilní povaze je umožněna jeho volná prostupnost přes buněčnou membránu a následně může reagovat s různými makromolekulami (Thomas *et al.*, 2001).

Přestože byla první zmínka o výskytu NO objevena již v roce 1975 v rostlinách sóji ošetřených herbicidy (Klepper, 1975), intenzivní studie o vlivu NO byly prováděny především v živočišných systémech. V roce 1992 časopis *Science* označil NO jako „molekulu roku“ a v roce 1998 byla udělena Nobelova cena vědcům Robertu Furchgottovi, Louisi Ignarrovi a Feridu Muradovi za objev a charakterizaci úlohy NO v kardiovaskulárním systému.

Rozmach intenzivního zájmu o studium úlohy NO u rostlin nastal po zjištění, že se NO významně podílí v rostlinné imunitě u bramboru (*Solanum tuberosum*) (Noritake *et al.*, 1996) a u *Arabidopsis* (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998). V současné době je známo, že NO funguje jako tzv. univerzální posel podílející se na regulaci klíčení, zavírání průduchů, růstu kořenů, stárnutí listů, kvetení, dozrávání plodů, gravitropismu, při stresových podmínkách na obranné odpovědi a také v mechanismech rezistence na různé formy biotických i abiotických stresových faktorů (Tuteja *et al.*, 2004; Wendehenne *et al.*, 2005; Martínez-Ruiz a Lamas, 2007).

Ačkoliv NO má významné účinky v biologických systémech, nadbytek NO je pro buňky toxický a vede k apoptóze nebo nekrotické buněčné smrti (Brown, 2007). Proto jsou důležité mechanismy, které kontrolují příslušnou koncentraci NO v různých fyziologických nebo stresových situacích. Endogenní hladiny NO jsou udržovány rovnováhou rychlostí syntézy a degradace, což je znázorněno na Obr. 4.



Obr. 4 Schéma možných cest vzniku a degradace NO v rostlinách kontrolujících jeho homeostázu. Zkratky: Arg: L-arginin; GSH: redukovaný glutathion; GSSG: oxidovaný glutathion; GSNO: S-nitrosoglutathion; GSNOR: S-nitrosoglutathionreduktasa; Hb: nesymbiotický hemoglobin; Ni: NOR: nitrit:NO reduktasa; NR: nitrátreduktasa; ONOO⁻, peroxydusitan; Prx: peroxiredoxin (upraveno podle Salgado *et al.*, 2013).

2.3.1 Biosyntéza NO

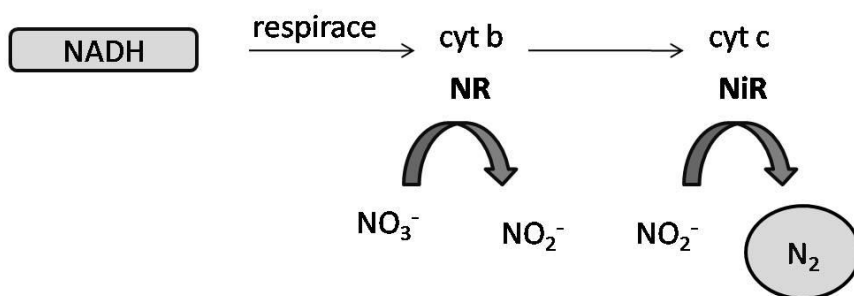
V živočišných buňkách probíhá biosyntéza NO aktivitou enzymu NO-synthasy (NOS, EC 1.14.13.39) katalyzující přeměnu L-argininu za vzniku NO a L-citrulinu a účasti kalcmodulinu (CaM), hemu, FAD, FMN a tetrahydrobiopterinu (BH₄) (Förstermann a Sessa, 2012). V živočišných buňkách byly nalezeny tři odlišné isoformy NOS: endoteliální NOS (eNOS), neuronální NOS (nNOS) a inducibilní NOS (iNOS) (Kone *et al.*, 2003; Kavya *et al.*, 2006). U rostlin nebyl doposud identifikován gen kódující strukturně analogický enzym s živočišnou NOS. Avšak existuje řada publikací poukazující na detekci aktivity enzymu podobnému NOS (označení jako NOS-like) u *Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2003; Guo a Crawford, 2005), v peroxisomech hrachu (Barroso *et al.*, 1999) nebo u rajčete (Piterková *et al.*, 2009).

Klíčové poznatky v problematice rostlinné NOS přinesla studie Foresi *et al.*, 2010, kde byla popsána existence NOS u nejmenší volně žijící jednobuněčné eukaryotní zelené řasy *Ostreococcus tauri* (OtNOS). OtNOS aktivita vykazuje *in vitro* podobné vlastnosti jako živočišná NOS. Porovnáním aminokyselinové sekvence byla zjištěna 45% podobnost s lidskou iNOS a 44% s lidskou eNOS (Foresi *et al.*, 2010). *In vivo* bylo prokázáno, že OtNOS je schopný nejen využívat BH₄ jako kofaktor, ale i tetrahydrofolát (Foresi *et al.*, 2015), což bylo již dříve zjištěno pro bakteriální NOS (Yamasaki *et al.*, 1999).

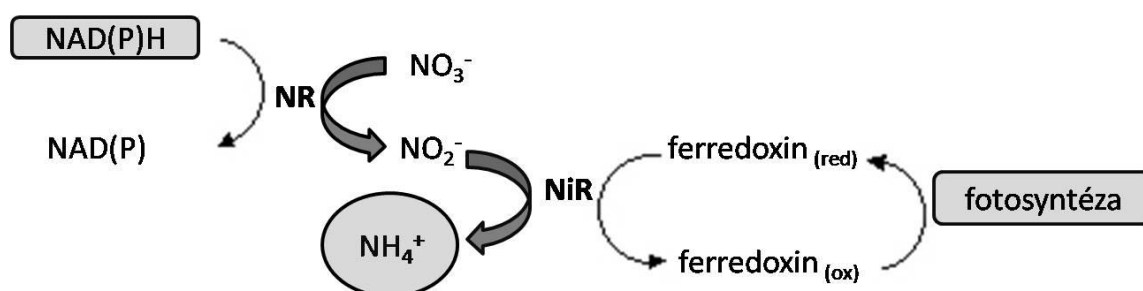
2.3.1.1 Enzymové zdroje biosyntézy NO u rostlin

Rostlinná biosyntéza NO může probíhat enzymatickou i neenzymatickou cestou. Prvním jednoznačně prokázaným a hlavním zdrojem produkce NO je enzym nitrátreduktasa (NR, EC 1.7.1.1) (Yamasaki *et al.*, 1999). NR primárně katalyzuje NAD(P)H-dependentní dvouelektronovou redukci dusičnanů na dusitany. Dále má NR tzv. Ni-NR aktivitu, kdy je schopná redukovat dusitany na NO v reakci závislé na NADH. Za normálních podmínek Ni-NR aktivita představuje pouze 1 % z celkové aktivity NR. Avšak určité podmínky, jako je vysoký obsah dusitanů, nízká koncentrace kyslíku a přítomnost světla, zvyšují Ni-NR aktivitu (Rockel *et al.*, 2002). Asimilační a disimilační role enzymu NR je popsána na Obr. 5.

Disimilace nitrátu



Asimilace nitrátu



Obr. 5 Schéma disimilační a asimilační role enzymu nitrátoreduktasy (NR). Hlavní úloha NR spočívá v redukci dusičnanů na dusitany. Má dvojí roli: asimilační a disimilační. Disimilace slouží k reoxidaci NADH v respiračním řetězci. Dusičnan je zde terminálním akceptorem namísto kyslíku a je pevně vázán na membránu k cytochromu b. Asimilační NR se vyskytuje především v chloroplastech. Redukuje dusičnan na dusitan dále až na amoniak. Redukčním činidlem je NADH či NADPH pocházející z cytosolu. Zdrojem redukčních ekvivalentů je ferredoxin, a proto redukce dusičnanů v rostlinách probíhá pouze za světelných podmínek (upraveno podle Fancy *et al.*, 2016).

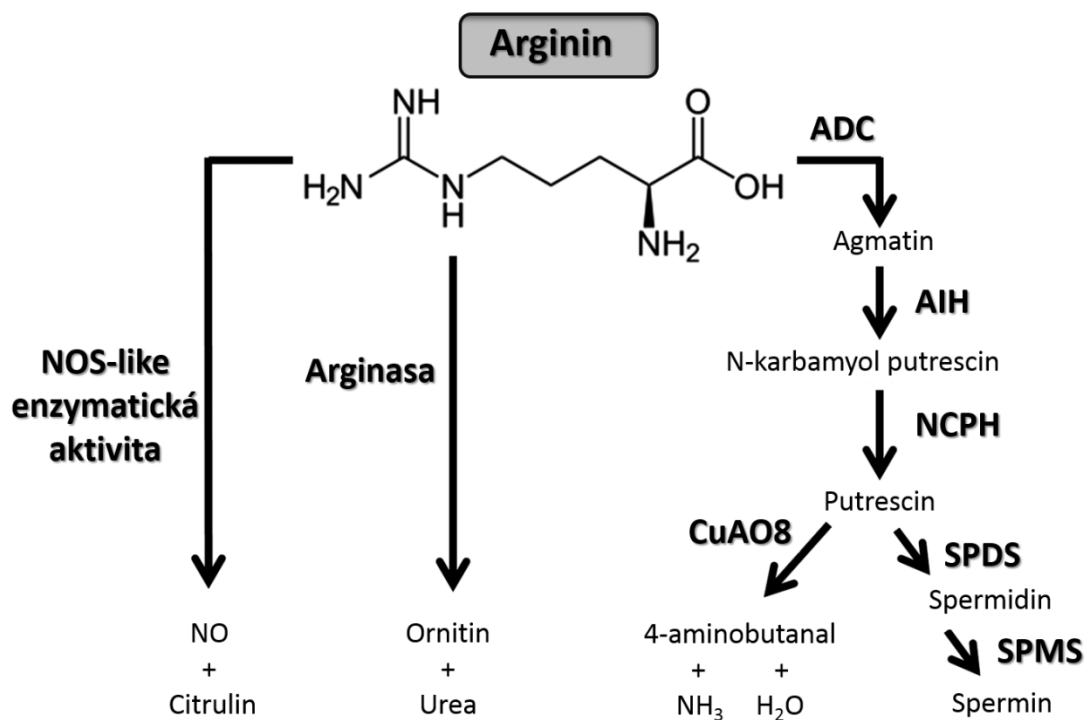
Další enzym produkující NO je nitrit:NO reduktasa (Ni:NOR, EC 1.7.2.1), představující specifický enzym lokalizovaný v plazmatické membráně buněk kořene tabáku. Donorem elektronu u Ni:NOR zprostředkované redukce dusitanu je cytochrom c, nikoliv NAD(P)H (Stöhr a Stremlau, 2005).

Enzym xanthinoxidasa (XOD, EC 1.17.3.2) katalyzuje oxidaci hypoxanthinu na kyselinu močovou za současného vzniku NADH nebo superoxidového radikálu (O_2^-) (Harrison, 2002). XOD aktivita byla také zjištěna v peroxisomech listů hrachu (Barroso *et al.*, 1999), nicméně role XOD v produkci NO u rostlin je stále předmětem výzkumu (Astier *et al.*, 2018).

Další cesta vzniku NO je indukce polyaminy (Yamasaki a Cohen 2006). Polyaminy patří mezi alifatické nízkomolekulární sloučeniny s více než jednou aminoskupinu. Vyskytují se

u většiny organismů. U rostlin jsou všudypřítomné a mezi nejvýznamnější zástupce řadíme putrescin, spermin a spermidin. Zvýšená hladina polyaminů sperminu a spermidinu indukuje biosyntézu NO, avšak skutečný reakční mechanismus dosud není objasněn. Produkce NO vyvolaná polyaminy se podílí na rozvoji kořenů, embryogenezi, obraně vůči stresu způsobeným kadmiiem nebo suchem (Tun *et al.*, 2006; Groppa, *et al.*, 2008; Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2009).

U enzymů katabolismu polyaminů, jako jsou diaminoxidasy (CuAO, EC 1.4.3.22) a polyaminoxidasy (PAO, EC 1.5.3.13), se uvádí, že se neznámým mechanismem nepřímo účastní syntézy NO (Tun *et al.*, 2006; Wimalasekera *et al.*, 2011). Indukce biosyntézy NO u semenáčků *Arabidopsis* po přidavku sperminu a spermidinu byla poprvé popsána v práci Tun *et al.*, 2006. Možné zapojení aminoxidasy (CuAO1) v produkci NO bylo testováno ve studii Wimalasekera *et al.*, 2011 u mutantů *Arabidopsis cuaol-1* a *cuaol-2* s defektním genem pro CuAO1. Během klíčení byla u těchto mutantů popsána nižší produkce NO po exogenním přidavku polyaminů, snížená citlivost vůči exogennímu přidavku kyseliny abscisové (ABA) a také inhibice růstu kořenů. Dále byla detekována nižší produkce peroxidu vodíku (H₂O₂) v rámci odpovědi na přidavek ABA (Wimalasekera *et al.*, 2011). Samotné enzymy PAO a CuAO1 se však produkce NO přímo neúčastní, ale vzniklý H₂O₂ se může podílet jako signální molekula v otevření Ca²⁺ kanálů (Pei *et al.*, 2000, Kwak *et al.*, 2003). Je známo, že Ca²⁺ jsou důležitým mediátorem v signálních dráhách NO (Besson-Bard *et al.*, 2009). Možnost biosyntézy NO přes dosud neobjasněnou dráhu zahrnující polyaminy tak zůstává stále předmětem diskuze (Bellin *et al.*, 2013).



Obr. 6 Schéma znázorňující možné metabolické dráhy přeměny argininu u *Arabidopsis*. L-Arginin je substrátem pro enzym s NOS-like aktivitou, arginasa a také výchozí látkou pro biosyntézu polyaminů u *Arabidopsis* (upraveno podle Gross *et al.*, 2017).

2.3.1.2 Neenzymové zdroje biosyntézy NO u rostlin

Ke vzniku NO u rostlin se kromě enzymových cest významně podílí cesty neenzymové, a to za specifických podmínek. V apoplastu vlivem kyselého pH dochází k samovolné redukci dusičnanů na dusitany za vzniku NO (Stöhr a Uhlrich, 2002). Při fyziologických hodnotách pH může probíhat redukce dusitanů kyselinou askorbovou za vzniku kyseliny dehydroaskorbové a NO v aleuronové vrstvě obílek ječmene (Stöhr a Ullrich, 2002). Vlivem světla dochází za katalýzy karotenoidů v membránách chloroplastů k redukci NO₂ na NO (del Río *et al.*, 2004).

2.4 Posttranslační modifikace proteinů zprostředkované RNS

Signální dráhy NO probíhají zejména prostřednictvím posttranslačních modifikací (PTM), které ovlivňují stabilitu a aktivitu mnoha proteinů, dále lokalizaci či interakci s jinými proteiny, což ovlivňuje řadu buněčných funkcí a signalizační kaskády (Corpas *et al.*, 2011). Za nejvýznamnější PTM proteinů zprostředkované RNS charakterizované *in vivo* patří nitrace tyrosinu, S-nitrosylace cysteinových thiolů a nitrosace iontů přechodných kovů (Freschi *et al.*, 2013).

2.4.1 Nitrace

Nitrace tyrosinu spočívá v navázání NO_2^+ skupiny ke specifickým tyrosinovým residuům v proteinech za vzniku 3-nitrotyrosinu. NO_2^+ pochází z oxidu dusičitého (NO_2), což je silné oxidační činidlo vzniklé reakcí NO a O_2 nebo peroxydusitanu (ONOO^-). Ke zvýšené produkci nitrovaného tyrosinu dochází vlivem abiotických i biotických stresových faktorů, a proto se jeho detekce považuje za marker nitrosačního stresu (Corpas *et al.*, 2009). Například u buněčné kultury tabáku BY-2 došlo ke zvýšení hladiny nitrovaných proteinů po aplikaci elicitinů (Saito *et al.*, 2006). Za fyziologických podmínek lze detekovat určitou hladinu nitrovaného tyrosinu i u nestresovaných rostlin, což poukazuje na zapojení nitrovaných proteinů v regulaci některých metabolických drah (Chaki *et al.*, 2009).

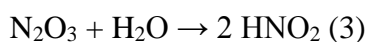
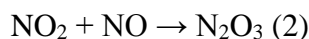
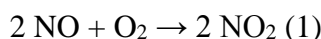
2.4.2 S-nitrosylace

S-nitrosylace je posttranslační kovalentní modifikace umožňující navázání nitroso (-NO) skupiny na thiolovou skupinu (-SH) cysteinového residua cílových proteinů (R) za vzniku S-nitrosothiolů (R-SNO), a tím výrazně ovlivňuje aktivitu, lokalizaci nebo stabilitu proteinu (Corpas *et al.*, 2008). Podobně jako fosforylace, S-nitrosylace je reverzibilní a místně specifická, avšak probíhá bez enzymové katalýzy. Vedle S-nitrosylovaných proteinů vznikají S-nitrosylací také nízkomolekulární S-nitrosothioly. Díky tomu, že nízkomolekulární S-nitrosothioly jsou ve srovnání s NO stabilnější látky s delším poločasem rozpadu, slouží *in vivo* především jako zásobní a transportní formy NO. Nejvýznamnějším zástupcem je S-nitrosoglutathion (GSNO) vznikající v aerobním prostředí reakcí NO

s redukováným glutathionem (GSH) (Martínez-Ruiz *et al.*, 2004). GSH je hlavní buněčný antioxidant hrající klíčovou roli v široké škále buněčných procesů (Noctor *et al.*, 2012), včetně reakcí rostlin na abiotické stresy a v obraně hostitele vůči napadení patogenem (Dubreuil-Maurizi a Poinssot, 2012).

První mechanismus vzniku proteinových RSNO byl popsán ve studii Stamler *et al.*, 1992 u sérového albuminu, který je hlavní transportní formou NO v krvi. Do dnešní doby byla objevena řada mechanismů vedoucích k tvorbě RSNO. Který z mechanismů však převládá *in vivo*, není doposud zcela jasné.

První mechanismus S-nitrosylace navrhli ve studii Kharitonov *et al.* (1995):



Limitující kroky rychlosti S-nitrosylace představují reakce (1) dvou molekul oxidu dusnatého (NO) s molekulou kyslíku (O₂), a reakce (2) oxidu dusičitého (NO₂) s NO za tvorby nitrosačního činidla.

K tvorbě RSNO *in vivo* může také docházet reakčním mechanismem navrhnutým dle Gow *et al.* (2004). NO reaguje s thioley za vzniku radikálového meziprojektu, u kterého v přítomnosti akceptoru elektronů dochází k přeměně na RSNO.

Jiný možný mechanismus představuje reakce thiolů s peroxydusitanem (ONOO⁻), produktu reakce NO s O₂⁻. K tvorbě RSNO *in vivo* také dále přispívá i přímá reakce nitrosoniového kationtu (NO⁺) s thioley (Lancaster, 2008).

2.5 Regulace hladiny S-nitrosothiolů

Vazba S-NO je silně polarizovaná a není tedy příliš stabilní. Nízkomolekulární RSNO mají poločas rozpadu v biologických systémech v řádu několika sekund až minut (Mayer *et al.*, 1995, Singh *et al.*, 1996). Stabilitu RSNO v roztocích ovlivňuje řada faktorů, jako například

teplota, pH, světlo, kationty přechodných kovů či přítomnost kyslíku atd. (Stamler a Toone, 2002). Rozklad vazby S-NO může probíhat jako monomerní štěpení, a to buď homolytické nebo heterolytické. Heterolytické štěpení dává vznik nitrosoniovému kationtu (NO^+) nebo nitroxylovému aniontu (NO^-). Avšak za fyziologicky významnější je považováno homolytické štěpení, kde se produkuje NO a oxidovaný glutathion (GSSG).

I přesto byla identifikována malá skupina nezvykle stabilních RSNO, do které řadíme například kreatinkinasu, α -tubulin, β -tubulin, CRMP-2 nebo GAPDH. Jedná se o tzv. S-nitrosoproteiny a jejich zvýšená stabilita je pravděpodobně důsledek konformační změny, která snižuje dostupnost rozpouštědla (Paige *et al.*, 2008).

Na regulaci celkové hladiny S-nitrosothiolů se u rostlin podílí denitrosylační mechanismy, a to neenzymatické prostřednictvím redukovaného glutathionu (GSH) a dva významné enzymové mechanismy zprostředkované aktivitou S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) a thioredoxinreduktasy (TrxR) (Holmgren, 2000).

2.5.1 Glutathion

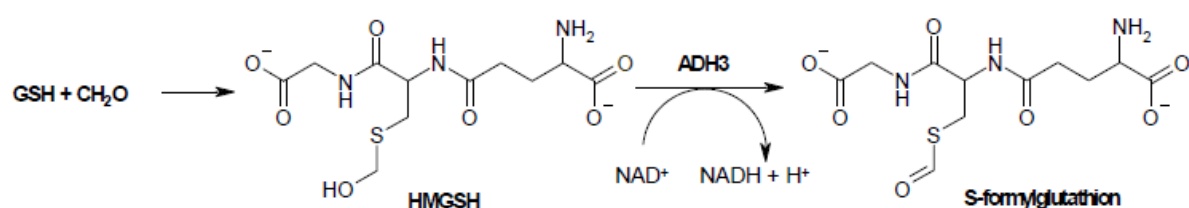
Redukovaný glutathion (GSH) je antioxidační činidlo hrající klíčovou roli v řadě buněčných procesů včetně obrany vůči patogenu a odpovědi rostliny na abiotické stresové faktory (Noctor *et al.*, 2012; Dubreuil-Maurizi a Poinssot, 2012). Celkovou hladinu GSH v rostlinných buňkách ovlivňuje také koncentrace NO (Kovacs *et al.*, 2015). Jako denitrosylační činidlo je GSH schopen neenzymatickou cestou kontrolovat hladinu S-nitrosylovaných proteinů za vzniku S-nitrosoglutathionu (GSNO). Uvolněný GSNO dále slouží jako nitrosylační činidlo pro stejný protein, případně pro jiný cílový protein (Kovacs *et al.*, 2015).

2.5.2 S-nitrosoglutathionreduktasa

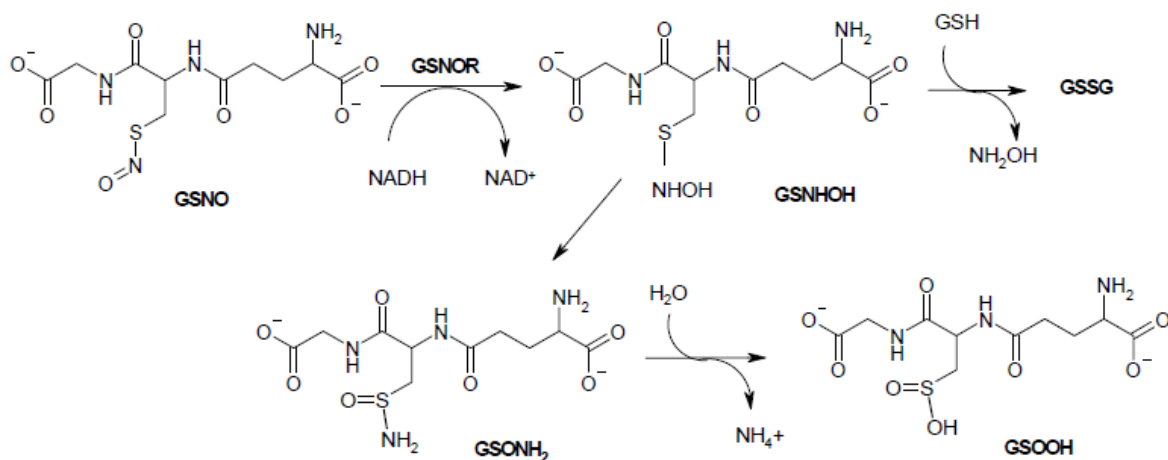
S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR, EC 1.1.1.284) patří do rodiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3, EC 1.1.1.1) (Martínez *et al.*, 1996). Dříve byl enzym označován jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH, EC 1.2.1.1) (Koivusalo *et al.*, 1989). Později po odhalení reakčního mechanismu, kdy

substrátem reakce není předpokládán GSH, ale S-(hydroxymethyl)glutathion (HMGSH), byl enzym přejmenován jako S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284). GSNOR katalyzuje NAD^+ -dependentní oxidaci HMGSH na S-formylglutathion. HMGSH vzniká spontánní adiční reakcí GSH a formaldehydu (Obr. 7 (A)). V současné vědecké literatuře se nejčastěji používá pro tento enzym označení S-nitrosogluthationreduktasa vzhledem k většímu fyziologickému významu reduktasové reakce, kdy za přítomnosti kofaktoru NADH dochází k redukci GSNO na GSSG a amoniak (Obr. 7 (B)).

(A)

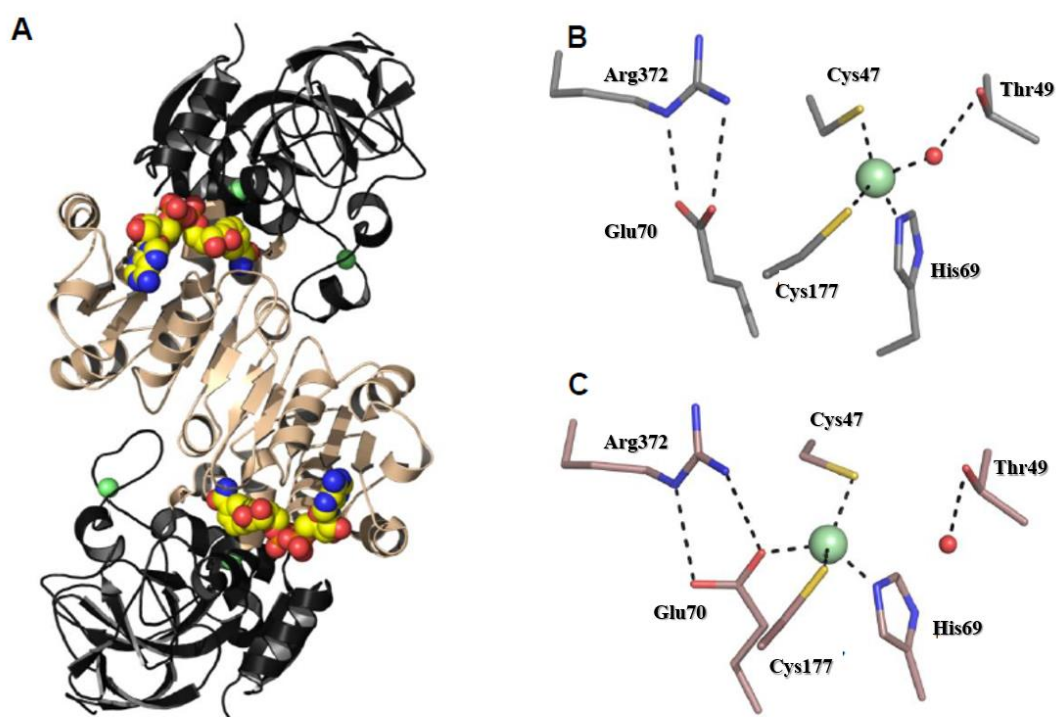


(B)



Obr. 7 Schéma mechanismů reakcí katalyzovaných alkoholdehydrogenasou 3, resp. S-nitrosogluthationreduktasou (GSNOR). (A) Dehydrogenasová aktivita GSNOR spočívá v NAD^+ -dependentní oxidaci S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGSH), který vzniká adiční reakcí formaldehydu (CH_2O) a glutathionu (GSH), na S-formylglutathion. (B) Reduktasová aktivita GSNOR se uplatňuje při NADH -dependentní redukci S-nitrosogluthationu (GSNO) na nestabilní meziprodukt N-hydroxysulfonamid (GSNHOH). GSNHOH spontánně přechází na glutathionsulfonamid (GSONH₂), který se v kyselém prostředí hydrolyzuje na glutathionsulfonovou kyselinu (GSO₂H) a amoniak. Lokální nadbytek GSH vede k nukleofilnímu ataku GSNHOH za uvolnění hydroxylaminu (NH_2OH) a oxidovaného glutathionu (GSSG) (převzato z Kubienová *et al.*, 2013).

Stejně jako ostatní enzymy z rodiny ADH, GSNOR je homodimerní protein obsahující dva atomy zinku. Každý monomer se dále skládá z malé vazebné nekatalytické domény a velké katalytické domény. Nekatalytická doména obsahuje vazebné místo pro koenzym, zatímco do katalytické domény se vážou oba zinečnaté ionty. Jeden atom zinku se zapojuje do katalýzy, druhý atom má pouze strukturní funkci (Obr. 8). Lokalizace aktivního místa monomerů je ve štěrbině mezi katalytickou doménou a vazebnou doménou pro koenzym (Kubienová *et al.*, 2013).



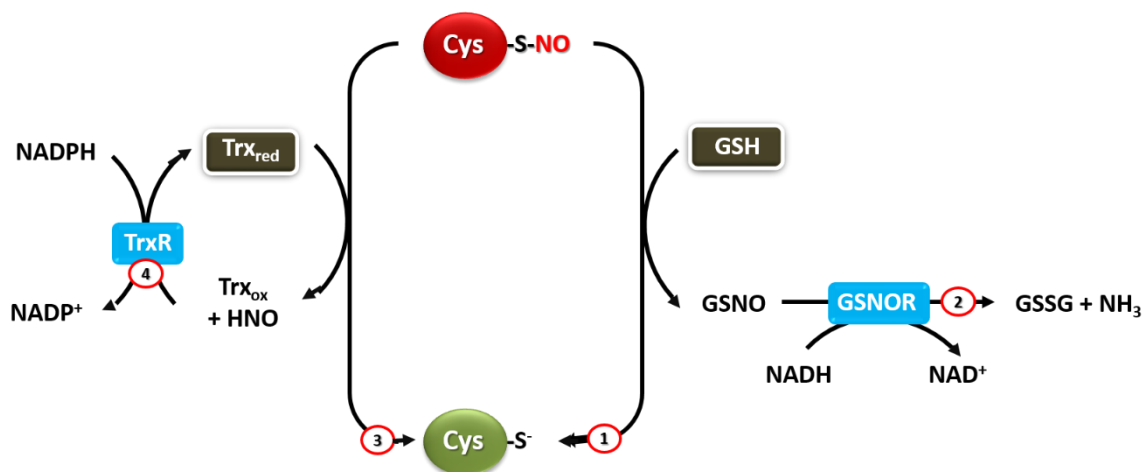
Obr. 8 Krystalová struktura rostlinné GSNOR ze *Solanum lycopersicum* (SIGSNOR). (A) Struktura SIGSNOR v přítomnosti koenzymu NAD⁺. Katalytická doména je znázorněna černě, vazebná doména pro koenzym světle hnědě. Atomy jsou znázorněny jako barevné kuličky: koenzym NAD⁺ (žlutě – atomy uhlíku, modře – atomy dusíku, červeně – atomy kyslíku) a atomy zinku (zeleně). (B) Rezidua ve struktuře apoenzymu vázající se na katalytický zinek. (C) rezidua vázající zinek se strukturní funkcí. Červené kuličky znázorňují molekulu vody (převzato z Kubienová *et al.*, 2013).

Mutace genu kódujícího GSNOR1 ukázaly, že má tento enzym významný vliv na fyziologii rostliny, a to na rozvětvení stonku a trichomů, prodloužení hypokotylu, produkci semen, vývoj květů a kořenů (Lee *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2015). Některé z těchto fenotypových projevů byly dříve popsány u auxinových mutantů (Shi *et al.*, 2015), což naznačuje možnost regulace signalizace auxinu pomocí S-nitrosylace, resp. denitrosylace. Interakce mezi NO a auxiny během vývoje rostliny byly popsány, ale přesné molekulární mechanismy nejsou dosud známy (Shi *et al.*, 2015). GSNOR má významnou roli v rostlinné imunitě. U mutantu *Arabidopsis* s vyřazeným genem kódujícím GSNOR1 docházelo také k hromadění intracelulárního GSNO a ke zvýšeným hladinám S-nitrosylovaných proteinů (Feechan *et al.*, 2005).

2.5.3 Thioredoxinreduktasa

Dalším enzymem podílejícím se na odbourávání RSNO je thioredoxinreduktasa (TrxR, EC 1.8.1.9). TrxR katalyzuje redukci oxidovaných thioredoxinů za využití elektronů z NADPH. Thioredoxiny (Trx) jsou malé všudypřítomné proteiny (10-12 kDa) s konzervovaným katalytickým místem obsahujícím dva cysteiny (-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-).

TrxR spolu s Trx a NADPH vytváří tzv. thioredoxinový systém (Trx/TrxR), který je zapojený do řady důležitých buněčných procesů a má klíčovou roli v ochraně před oxidativním stresem (Holmgren, 2000). Detekce aktivity TrxR je užitečným markerem oxidačního a nitrosačního stresu. Na rozdíl od GSNOR, Trx/TrxR přímo interaguje s S-nitrosylovanými proteiny a katalyzuje jejich denitrosylaci (Obr. 9).



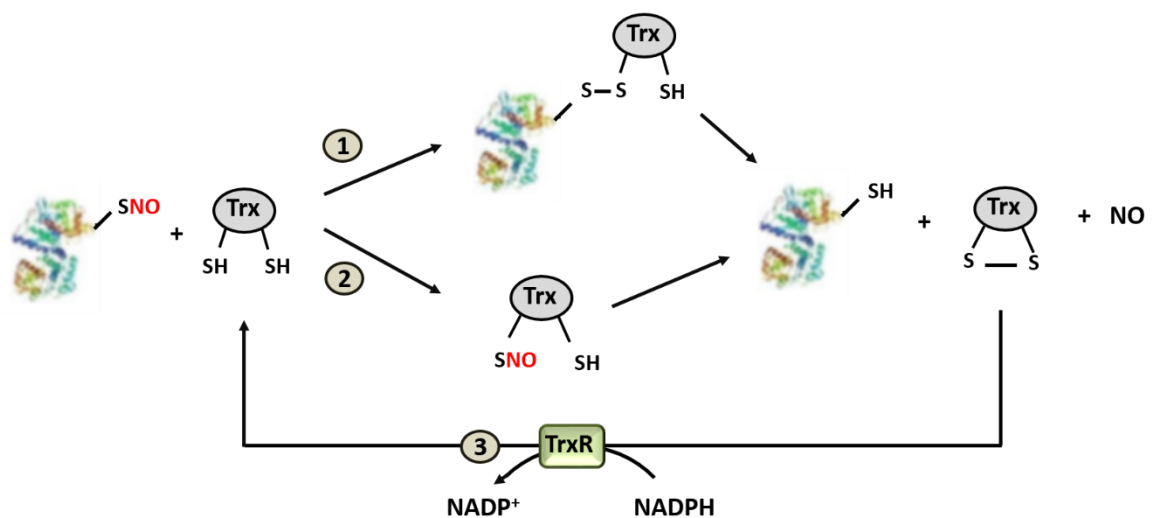
Obr. 9 Hlavní dráhy podílející se na odbourávání S-nitrosylovaných proteinů. Enzymová denitrosylace proteinů probíhá díky aktivitě S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) a thioredoxinreduktasy (TrxR) (upraveno podle Zaffagnini *et al.*, 2016).

Byly navrženy dva možné molekulární mechanismy denitrosylace pomocí Trx/TrxR. V prvním mechanismu cystein nacházející se v aktivním místě redukováného Trx nukleofilně atakuje nitrosylovaný cystein cílového proteinu za tvorby disulfidového meziproductu a NO^- . Vzniklý meziproduct se následně působením cysteinu dalšího Trx redukuje a je uvolněn oxidovaný Trx (Benhar *et al.*, 2008). V druhém mechanismu, tzv. transnitrosylačním, vede výše zmíněný prvotní atak ke vzniku nitrosylovaného Trx a redukováného proteinu. Následně dochází k uvolnění NO^- a k tvorbě disulfidové vazby u Trx (Stoyanovsky *et al.*, 2005). Oba mechanismy jsou znázorněny na Obr 10.

V živočišných buňkách bylo popsáno, že systém Trx1/TrxR fyziologických podmínek redukuje kaspasu-3. Přídavek GSH *in vitro* nevyvolává redukcí S-nitrosylované formy kaspasy-3, avšak Trx tuto reakci ovlivňuje (Mitchell a Marletta, 2005). Inhibice Trx1 nebo enzymu TrxR zvýšila S-nitrosylaci kaspasy-3 v lidských B lymfocytech (Benhar *et al.*, 2008).

U rostlin bylo zjištěno, že během patogeneze dochází ke zvýšení koncentrace GSNO, který vyvolává S-nitrosylaci NPR1, což vede k jeho oligomerizaci v cytosolu. Naproti tomu infekce patogenem vyvolává indukci TrxR typu h5, která denitrosyluje protein a usnadňuje uvolňování aktivních monomerů NPR1 (Tada *et al.*, 2008). Bylo prokázáno, že TrxRh5 selektivně katalyzuje denitrosylaci NPR1 prostřednictvím transnitrosylačního mechanismu jednoho aktivního Cys (Kneeshaw *et al.*, 2014). Zaffagnini *et al.* (2013)

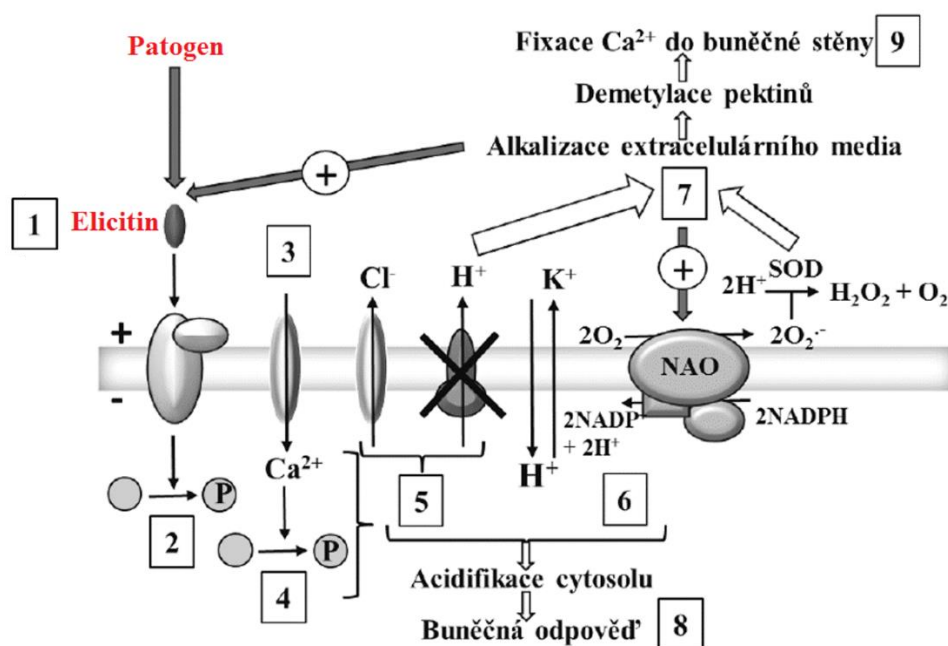
popsali, že aplikace exogenního GSH způsobila obnovu aktivity cytoplasmatického enzymu glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy (GAPDH, EC 1.2.1.12), který je reverzibilně inhibován S-nitrosylací Cys149. Dále bylo studováno zapojení TrxRh5 v denitrosylaci GAPDH, avšak bylo zjištěno, že TrxRh5 nezprostředkovává denitrosylaci tohoto proteinu (Zaffagnini *et al.*, 2013). Denitrosylační procesy Trxh5 a GSNOR jsou u rostlin pravděpodobně specifické a selektivní mechanismy (Kneeshaw *et al.*, 2014).



Obr. 10 Schématické znázornění dvou molekulárních mechanismů denitrosylace proteinů pomocí thioredoxinreduktasy (TrxR). (1) První mechanismus dává vznik disulfidovému meziprojektu a NO⁻. Meziprojekt může být následně štěpen vlivem ataku cysteinu dalšího Trx na oxidovaný Trx a redukovaný protein. (2) Druhý možný mechanismus spočívá v redukcí proteinu a vytvoření nitrosylovaného Trx. Následně dochází k tvorbě disulfidové vazby Trx a k uvolnění NO⁻. (3) Štěpení disulfidové vazby zprostředkovává enzym TrxR přímo za spotřeby NADPH (upraveno podle Begara-Morales a Loake, 2016).

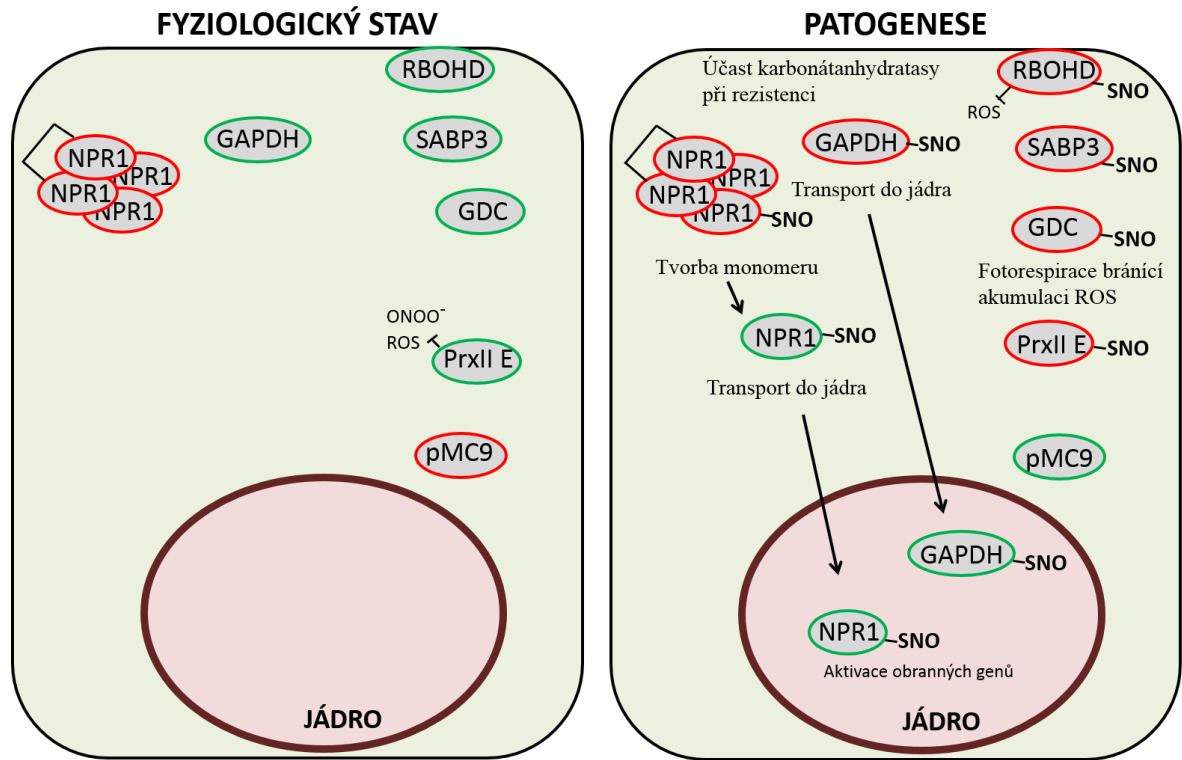
2.5.4 Úloha NO a S-nitrosylace v obranných mechanismech rostlin při patogenesi

NO kromě své fyziologické role, zprostředkovává u rostlin obranné reakce po napadení patogenem (Obr. 11). Po navázání elicitoru na receptor dojde k toku iontů přes plasmatickou membránu (Ca^{2+} , Cl^- , K^+), což mimo jiné vede k blokaci H^+ -ATPasy a zesílení aktivity NADPH-oxidasy. Aktivace NADPH-oxidasy způsobí zvýšenou produkci ROS a následně i NO. Zvýšená hladina NO v buňce ovlivňuje signalizační procesy. Nepřímá aktivace probíhá prostřednictvím druhých posílů jako je například kyselina fosfatidová (PA) nebo cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). NO se podílí na přímé regulaci aktivity MAP kinas nebo také způsobí jejich interakci s jinými proteiny, které jsou modifikovány právě NO (Wawer *et al.*, 2010).



Obr. 11 Signální dráhy vyvolané působením elicitoru. Elicitin produkovaný patogenem je rostlinnými buňkami rozpoznán prostřednictvím receptoru lokalizovaným v plasmatické membráně (1). Následná vazba vyvolává řadu buněčných změn: aktivaci efektorových proteinů fosforylací (2)(4), aktivaci vápníkových kanálků (3), aktivaci chloridových kanálků s inhibicí H^+ -ATPasy (5) či aktivaci membránově vázané NADPH-oxidasy (NAO) (6) vedoucí k acidifikaci cytosolu a dalším buněčným odpovědím (8). Alkalizace extracelulárního média (7) má za následek zesílení aktivity NADPH-oxidasy, zvýšenou produkci ROS a zvýšené zabudovávání Ca^{2+} iontů do buněčné stěny (9) (převzato z Moricová *et al.*, 2014).

Nejlépe charakterizovaný signální mechanismus, kterým NO působí u rostlin během patogenese, je S-nitrosylace cysteinových residuí cílových regulačních proteinů účastnících se obranné reakce (Obr. 12) (Leitner *et al.*, 2009).



Obr. 12 Role S-nitrosylace v imunitní odpovědi rostlin a patogenem-indukované buněčné smrti. S-nitrosylace aktivuje (zeleně) nebo inhibuje (červeně) aktivitu klíčových regulačních proteinů obranné reakce. Při fyziologických podmínkách S-nitrosylace inhibuje prometakaspu 9 (pMC9), cysteinovou proteasu účastnící se hypersenzitivní odpovědi (HR) a buněčné smrti. Zvýšená produkce indukovaného oxidu dusnatého (NO) během obrany vůči patogenu způsobí S-nitrosylaci monomeru NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis-Related Protein 1), glyceraldehdyfosfát-3-dehydrogenasy (GAPDH), proteinu SABP3 (Salicylic Acid Binding Protein 3), peroxiredoxinu II E (PrxII E), NADPH-oxidasy (resp. RBOHD) a glycindekarboxylasy (GDC). Transkripční koaktivátor NPR1 se může vyskytovat v oligomerní nebo monomerní formě, kdy pouze monomerní forma NPR1 může vstupovat do jádra a aktivovat expresi obranných genů. Podobně jako u NPR1, S-nitrosylace GAPDH umožňuje vstup do jádra a následnou aktivaci exprese obranných genů. S-nitrosylace SABP3 znemožní navázání kyseliny salicylové (SA) na protein, a inhibuje tak karbonátanhydratasovou aktivitu, která je potřebná pro ustavení rezistence. S-nitrosylovaný peroxiredoxin II E není schopen detoxifikovat akumulovaný peroxidusitan (ONOO⁻), což vede ke spuštění programované buněčné smrti (upraveno podle Bellin *et al.*, 2013).

NO ovlivňuje aktivitu NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis-Related Protein 1), významného proteinu rostlinné imunity (Obr. 12). Jedná se o transkripční koaktivátor, který se může vyskytovat v oligomerní nebo monomerní formě. Pouze monomerní forma může vstupovat do jádra a spouštět expresi obranných genů a genů hrajících roli v signalizaci SA (Tada *et al.* 2008). Za fyziologických podmínek se NPR1 v cytoplasmě vyskytuje v oligomerní formě, kde intermolekulární disulfidové můstky spojují jednotlivé monomery. Během obranné reakce dochází k redukci disulfidických můstků a odštěpení monomerů NPR1, které aktivují expresi obranných genů (Fu a Dong, 2013).

Mechanismem S-nitrosylace je ovlivňována také aktivita SABP3 (Salicylic acid-binding protein 3). SABP3 po navázání kyseliny salicylové (SA) vykazuje karbonátnhydratasovou aktivitu potřebnou pro ustanovení resistance (Obr. 12). S-nitrosylace residua Cys280 zabrání navázání SA na protein, a tím inhibuje jeho katalytický účinek (Wang *et al.*, 2009).

GAPDH je důležitým glykolytickým enzymem katalyzující přeměnu glyceraldehyd-3-fosfátu na 1,3-bisfosfoglycerát za přítomnosti NAD^+ a anorganického fosfátu. V rostlinách existuje více isoform GAPDH lokalizovaných v jádře, cytosolu nebo plastidech (Anderson *et al.*, 2004). Bylo prokázáno, že rostlinná GAPDH může být S-nitrosylována *in vitro* a *in vivo*. U *Arabidopsis* je aktivita cytosolární GAPDH snížena díky S-nitrosylaci dvou cysteinů v katalytickém místě Cys149 a Cys155 (Zaffagnini *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že stejně jako u NPR1, S-nitrosylace Cys149 v katalytickém místě inhibuje aktivitu cytosolární GAPDH a podporuje její translokaci do jádra, kde spouští expresi obranných genů (Obr. 12) (Wawer *et al.*, 2010).

Metakaspasy 9 (pMC9), proteasy s cysteinem v aktivním místě štěpící specificky peptidovou vazbu za aspartátem, jsou známé především svou nezastupitelnou funkcí v apoptóze. Navázání NO na cysteinové residuum v aktivním místě metakaspasy vede k inhibici apoptotické aktivity. Za fyziologických podmínek byla u *Arabidopsis* popsána inhibice autoproteolytické aktivity prometakaspasy 9 (AtMC9) prostřednictvím S-nitrosylace Cys147. Inhibice enzymové aktivity byla pozorována pouze u inaktivního zymogenu, zatímco AtMC9 ve své aktivní formě nebyl S-nitrosylací ovlivněn (Belenghi *et al.*, 2007).

Enzym NADPH-oxidasa (EC 1.6.3.1), u rostlin označován také jako RBOHD (Respiratory Burst Oxidase Homology D), je lokalizovaný v plasmatické membráně

a slouží jako významný producent ROS (Torres *et al.*, 2005). S-nitrosylace Cys890 během obranné reakce snížila aktivitu NADPH oxidasy (resp. AtRBOHD), a tedy i produkci ROS a následně zpomalila pozdní fázi hypersenzitivní odpovědi (HR) (Obr. 12) (Yun *et al.*, 2012).

Peroxiredoxiny (Prx, EC 1.11.1.15) patří do skupiny významných antioxidačních enzymů schopných detoxifikovat širokou škálu substrátů odvozených od ROS. U rostlin byly podle počtu a polohy konzervovaných Cys charakterizovány 4 hlavní třídy: 2-Cys Prx, 1-Cys Prx, Prx Q a typy Prx II, které se nachází v cytosolu, mitochondriích, chloroplastech a v jádře (Rouhier a Jacquot, 2005; Iglesias-Baena *et al.*, 2010; Dietz, 2011). Peroxiredoxin II E (PrxII E), lokalizovaný ve stromatu chloroplastů, za normálních podmínek redukuje H_2O_2 a $ONOO^-$. Během patogeneze dochází k S-nitrosylaci Cys121 v aktivním místě, což inhibuje schopnost odbourávání toxického $ONOO^-$. Dochází k jeho akumulaci v buňce, což následně způsobuje indukci programované buněčné smrti (Romero-Puertas *et al.*, 2007). S-nitrosylace PrxII E byla zjištěna během HR u *Arabidopsis* po infekci avirulentním bakteriálním patogenem *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Romero-Puertas *et al.*, 2007). Po aplikaci GSNO do buněčné kultury *Arabidopsis* došlo k S-nitrosylaci cytosolární formy PrxII B a mitochondriální PrxII F (Lindermayr *et al.*, 2005).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Acros Organics (USA): redukovaný glutathion; Triton X-100.

AppliChem (Německo): AEBSF – inhibitor proteas; dodecylsírán sodný; hovězí sérový albumin frakce V.

Bio-Rad (USA): bromfenolová modř; Coomassie Brilliant Blue R-250; marker molekulové hmotnosti Precision Plus DualXtraStandards.

Lachema (Česká republika): dithiotreitol; kyselina chlorovodíková.

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

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

Sigma-Aldrich (Německo): akrylamid; askorbát; auranofin; bisakrylamid; dimethylsulfoxid; ethylendiamintetraoctová kyselina; glycerol; glycin; *N,N*-dimethylformamidfenylmethansulfonyl fluorid; *N, N'*- tetramethylendiamin; *n*-butanol; nikotinamindinukleotid redukovaný; nikotinamindinukleotidfosfát redukovaný; nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem; seleno-L-cystin, octová kyselina; persíran amonný; Ponceau S; primární monoklonální myši anti-biotin protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase; S-methylmethanthiosulfonát; Tween 20.

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

3.1.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA); blotovací systém Mini PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio-Rad, USA); centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); dokumentační zařízení

Gel-Doc (Bio-Rad, USA); exikátor (Kavalierglass, Česká republika); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka IKA (Labortechnik, Německo); kolonky NAP-5 (GE Healthcare, USA); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA); nitroceluloseová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA); vakuová vývěva D-lab (Edwards, USA); vortex (Stuart, UK); vyhřívací box do 100 °C (AescuLab, Taiwan); zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (Bio-Rad, USA).

3.2 Biologický materiál

3.2.1 Rostlinný materiál

Pro studium vlivu modifikace struktury elicitinů infestinu a kryptogeinu na proces S-nitrosylace byly vybrány 4 genotypy rajčete *Solanum* spp.: *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*, které se liší rezistencí vůči biotrofnímu patogenu padlí rajčatovému (*Pseudoidium neolyopersici*) (Tab. 3).

Semena jednotlivých genotypů rajčete byla vyseta do perlitu. Semenáčky s vyvinutými děložními listy (10 denní) byly přesazeny do květináčů se zahradní zeminou a pěstovány ve skleníku při teplotě 18-20 °C s fotoperiodou 12/12 h (den/noc). Pro experimenty byly použity 8 týdenní rostliny.

Tab. 3 Rezistence studovaných genotypů rajčete *Solanum* spp. vůči patogenu padlí rajčatovému (*Pseudoidium neolyopersici*).

Genotyp	Náchylnost vůči patogenu
<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur	Citlivý
<i>S. lycopersicum</i> cv. Micro-Tom	Citlivý až středně rezistentní
<i>S. chmielewskii</i>	Středně rezistentní
<i>S. habrochaites</i>	Rezistentní

3.2.2 Elicitiny

V experimentech byly použity elicitory infestin, kryptogein, mutanti infestinu V84F a V13K/A14T a mutanti kryptogeinu K13V a V84F. Elicitiny a jejich mutanti byly připraveny jako rekombinantní proteiny a byly poskytnuty Ústavem biochemie PřF MUNI v Brně z výzkumné skupiny vedené doc. Mgr. Janem Lochmanem, Ph.D.

3.2.3 Patogen

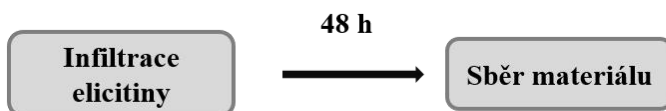
Padlí rajčatové (*Pseudoidium neolycopersici*) používané v experimentech bylo poskytnuto doc. RNDr. Barborou Mieslerovou, Ph.D. z Katedry botaniky PřF UP. Patogen byl pěstován na 2-3 měsíce starých rostlinách genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur ve fytotronu při teplotě 18-20 °C a fotoperiodě 12/12 h (den/noc). Ve 14denních intervalech byl patogen přeinkulován na nové neinfikované rostliny.

3.3 Experimentální metody

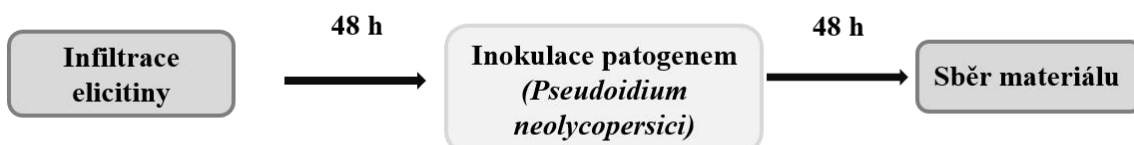
3.3.1 Elicitace listů a následná inokulace patogenem

Elicitace byla prováděna pomocí metody nasávání elicitinu přes povrch listu. Z každé rostliny byla odebrána od spodu čtvrtá řada listů (Obr. 13 (A)). Pomocí injekční jehly byly provedeny jemné vpichy vždy do stejných míst listu (Obr. 13 (B)). Listy byly vloženy do kádinek s 20 ml roztoku elicitinu o koncentraci 500 nmol·l⁻¹ nebo s 20 ml destilované vody v případě kontrolních vzorků. Nasávání probíhalo v exikátoru pod vakuem po dobu 15 min. Následně byly řapíky listů obaleny do vlhké vaty a listy byly přeneseny na vodou navlhčený filtrační papír do Petriho misek (Obr. 13 (C)). Po dobu 48 h byly misky uloženy ve fytotronu při teplotě 18-20 °C s fotoperiodou 12/12 h (den/noc). Polovina listů, označená jako neinfikované vzorky, byla zamrazena v tekutém dusíku a uchována při -80 °C pro následující experimenty (Obr. 13). Druhá polovina listů byla infikována patogenem *Pseudoidium neolycopersici* metodou listového otisku a uložena ve fytotronu po dobu dalších 48 h. Poté byly infikované vzorky zamrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -80 °C pro následující experimenty (Obr. 13).

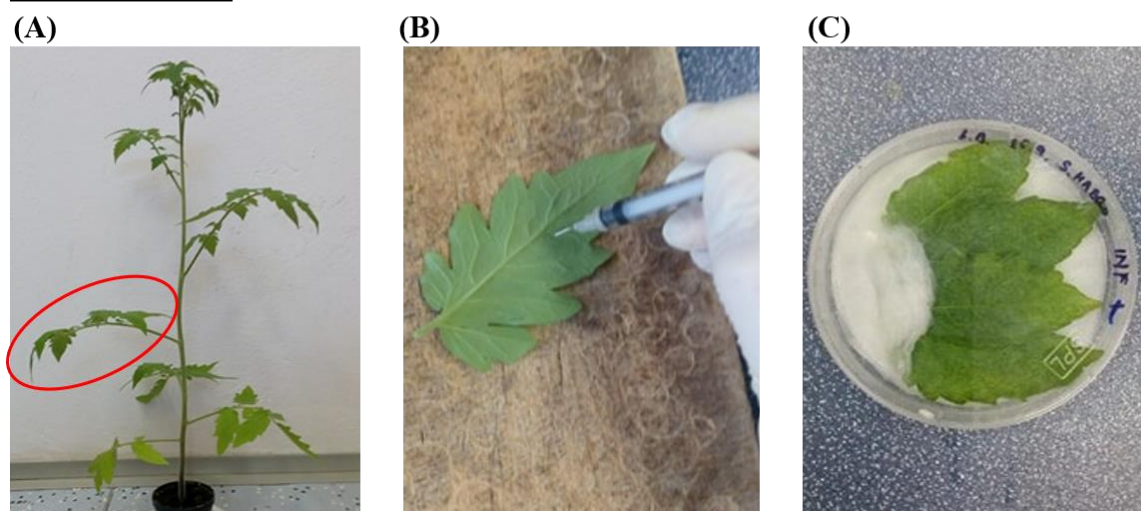
I. Neinfikované vzorky



II. Infikované vzorky



Infiltrace elicitinů



Obr. 13 Schéma experimentu. V rámci elicítace listů metodou nasávání elicitinů přes povrch listu byly pro experimenty odebrány z každé rostliny listy ze čtvrté řady (A), do kterých byly provedeny jemné vpichy (B). Po následném nasátí elicitinů byly řapíky listů obaleny ve vlhké vatě a listy byly přeneseny na filtrační papír do Petriho misek (C).

3.3.2 Extrakce

Rostlinný materiál byl homogenizován v tekutém dusíku na jemný prášek a poté byl extrahován v poměru 1:2 (0,5 g rostlinného materiálu: 1 ml pufru) v extrakčním pufru (50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5; 0,2 % Triton X-100; 1 mmol·l⁻¹ EDTA; 1 mmol·l⁻¹ AEBSF). Po 20 min inkubace vzorků v misce s ledem byly vzorky s extraktem centrifugovány 30 min při 16 000 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl přečištěn gelovou filtrací na kolonce NAP-5. Kolonka byla nejprve ekvilibrována 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8 (3x 2,5 ml pufru).

Po ekvilibraci bylo na kolonku naneseno 500 μl supernatantu a po aplikaci 2 ml elučního pufru (20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8) byl zachycen 1 ml eluátu. Následně byla kolonka promyta 25 ml deionizované vody.

3.3.3 Stanovení koncentrace celkových proteinů Bradfordovou metodou

Pro stanovení koncentrace celkových proteinů ve vzorku byla použita Bradfordova metoda. Principem metody je interakce proteinů v kyselém prostředí s barvivem Coomasie Brilliant Blue G-250 za vzniku stabilního komplexu, který lze následně spektrofotometricky stanovit při 595 nm (Bradford, 1976).

Měření obsahu proteinů bylo prováděno v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Do jednotlivých jamek bylo postupně aplikováno 45 μl deionizované vody, 5 μl extraktu nebo standardu hovězího sérového albuminu (BSA) o příslušné koncentraci. Následně bylo přidáno 200 μl Bradfordova činidla. Po 10 min inkubaci při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 595 nm.

Kalibračních standardy BSA měly hodnoty koncentrací 0,025; 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 a 1,4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Složení zásobního roztoku Bradfordova činidla:

0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Coomasie Brilliant Blue G250; 0,25 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ methanol; 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselina fosforečná. Pracovní roztok byl připraven naředěním 1:4 deionizovanou vodou.

3.3.4 Stanovení koncentrace proteinových S-nitrosothiolů Savillovou metodou

Pro stanovení proteinových S-nitrosothiolů (RSNO) byla použita Savillova metoda. Principem metody je kvantifikace uvolněného NO^+ při rozkladu RSNO v přítomnosti Hg^{2+} soli. Vznikající dusitan reaguje se sulfanilamidem za tvorby diazoniové soli, která kopuluje s NED činidlem za vzniku azobarviva. Výsledný produkt je možné spektrofotometricky detekovat při 540 nm (Saville, 1958).

Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 195 μl činidla Griess B, v případě blanku 195 μl činidla Griess A. Po přidavku 5 μl přečištěného rostlinného extraktu na kolonce NAP-5 následovala 5 min inkubace. Poté bylo přidáno 100 μl činidla NED a po další 5 min inkubaci byla měřena absorbance při 540 nm.

Kalibrační standardy GSNO měly hodnoty koncentrací 1; 5; 10; 50; 100; 150; 200 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO v 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl.

Použité roztoky:

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

3.3.5 Měření aktivity enzymu S-nitrosoglutathionureduktasy (GSNOR)

Spektrofotometrické měření reduktasové aktivity GSNOR je založeno na principu Warburgova optického testu, kdy se sleduje oxidace NADH při 340 nm.

Do jamek mikrotitrační destičky byla napipetována reakční směs: 225 μl reakčního pufru (20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8), 15 μl extraktu a 30 μl 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADH. Pro spuštění reakce bylo přidáno 30 μl 4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSNO jako substrátu. V případě blanku bylo místo substrátu přidáno 30 μl deionizované vody. Měření poklesu absorbance při 340 nm probíhalo v intervalu 10 s po dobu 10 min. Roztoky NADH a GSNO byly vždy připravovány čerstvě před měřením a uchovány ve tmě, aby nedocházelo k jejich degradaci.

3.3.5.1 Příprava S-nitrosoglutathionu (GSNO)

Příprava S-nitrosoglutathionu byla prováděna podle metodiky uvedené ve studii Moore a Mani (2002).

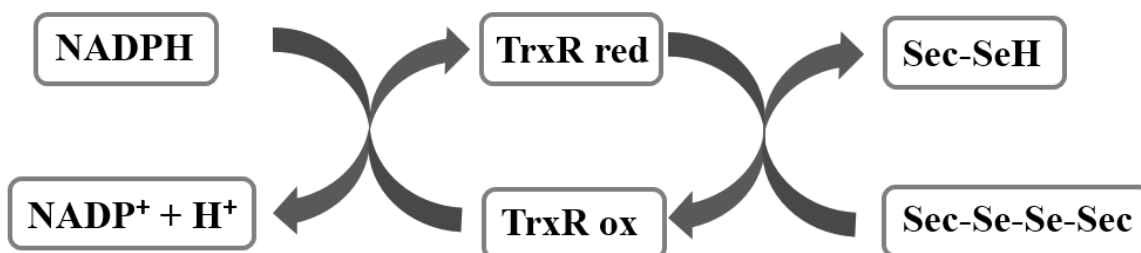
Ve 3 ml 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl, vychlazené na ledové lázni, bylo rozpuštěno 614 mg GSH a za stálého míchání bylo do roztoku přidáno 138 mg NaNO_2 . Vzniklá sraženina byla po 40 min míchání na ledové lázni odsáta na Büchnerově nálevce a promyta 2x 10 ml vychlazenou deionizovanou H_2O , 2x 5 ml vychlazeným acetonem a 2x 10 ml vychlazeným diethyletherem. Poté byla vzniklá sraženina zabalena do alobalu kvůli své fotolabilitě

a ponechána přes noc v exsikátoru. Následující den byl vysušený GSNO přenesen do plastové mikrozkušavky a uchován při - 28 °C.

3.3.6 Měření aktivity enzymu thioredoxinreduktasy (TrxR)

Pro měření aktivity byla použita metoda přímého stanovení TrxR podle publikace Cunniff *et al.*, 2013. Princip měření změn absorbance při 340 nm spočívá ve sledování oxidace NADPH při redukci selenocystinu enzymem TrxR (Obr. 14).

Do jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 175 μl reakčního pufru (50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5), 25 μl extraktu, 40 μl 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADPH. Pro spuštění reakce bylo přidáno 80 μl 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ selenocystinu nebo 80 μl deionizované vody v případě blanku. Následovalo měření poklesu absorbance při 340 nm v intervalu 30 s po dobu 20 min. Roztoky NADPH a selenocystinu byly vždy připravovány čerstvě před měřením a uchovány ve tmě.



Obr. 14 Redukce selenocystinu katalyzovaná enzymem thioredoxinreduktasou (TrxR) (upraveno podle Cunniff *et al.*, 2013).

3.3.7 Biotin-switch

Princip metody biotin-switch (BST) je založen na reverzibilním značení S-nitrosylovaných cysteinů značkou nesoucí navázanou molekulu biotinu (biotin-HPDP) (Jaffrey a Snyder, 2001). BST se skládá ze tří kroků (Obr. 15). Prvním krok zahrnuje blokaci volných thiolových skupin proteinu působením methylačního činidla S-methylmethanthiosulfonátu (MMTS) specifického pro thioly. Druhý krok zahrnuje redukci S-nitrosothiolů (-SNO) askorbátem na thioly (-SH). Poté dochází ke značení volných thiolů biotinem-HPDP.

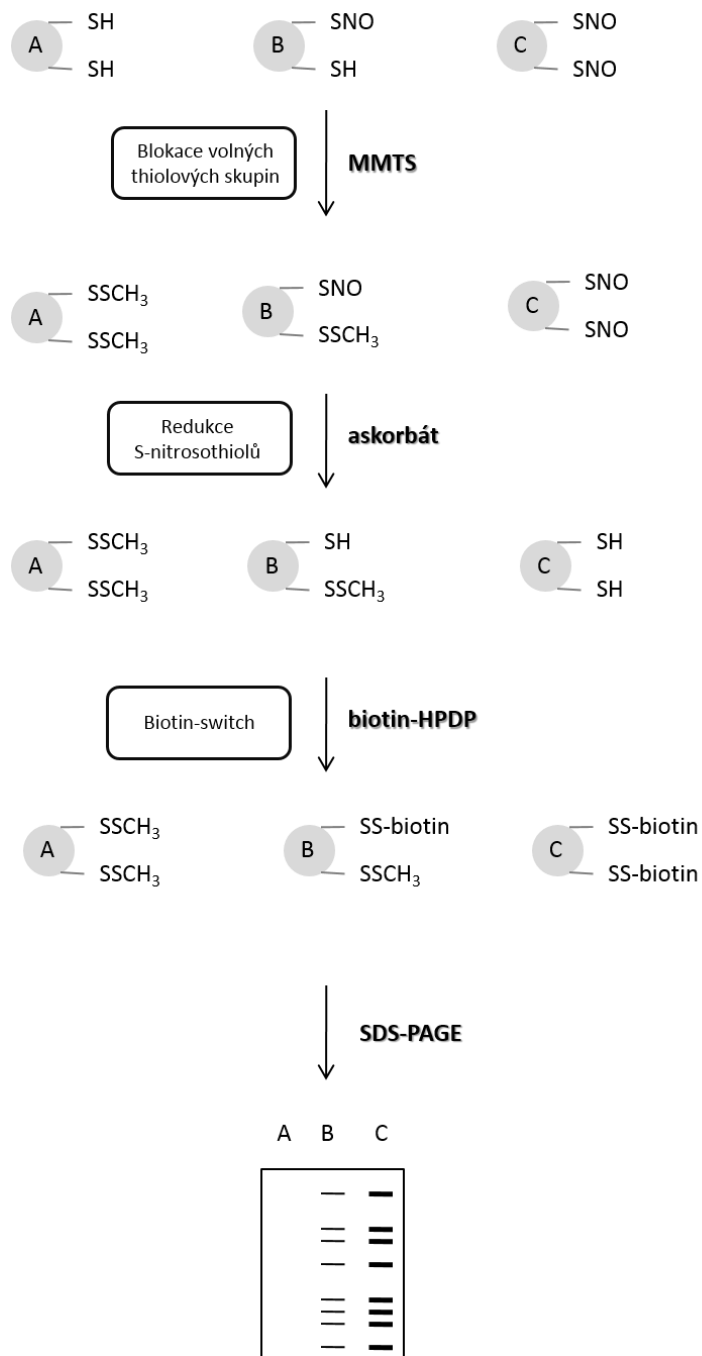
Rostlinný materiál (1 g) byl homogenizován v tekutém dusíku a smíchán s 2 ml extrakčním pufrem HENT (poměr 1:2). Následně byly vzorky inkubovány 10 min na ledu. Poté byla provedena centrifugace extraktu po dobu 30 min při 16000x g a teplotě 4 °C. Supernatant byl přenesen do nových mikrozkušavek a byla určena koncentrace proteinů ve vzorku pomocí Bradfordovy metody (3.3.4). Pro značení metodou BST bylo použito 0,5 mg celkových proteinů.

Pro blokaci volných thiolových skupin ve vzorcích bylo použito činidlo MMTS o koncentraci 0,02 mmol·l⁻¹ a následně byl přidán 2% dodecylsírán sodný (SDS). Jako kontrola pro blokování volných -SH skupin proteinů sloužil vzorek bez přídavku MMTS. Takto upravené vzorky byly inkubovány v termobloku při teplotě 50 °C po dobu 30 min ve tmě. Po inkubaci byl přidán 1 ml ledově vychlazeného acetonu a vzorky byly ponechány precipitovat po dobu 30 min při teplotě -28 °C. Poté byly vzorky centrifugovány při 10000x g 20 min a 4 °C. Vzniklý sediment byl promyt 500 µl ledově vychlazeného acetonu a opět centrifugován 10 minut za stejných podmínek. Sediment byl poté rozsuspendován v 100 µl HENS pufru. Poté byl přidán askorbát o výsledné koncentraci 1 mmol·l⁻¹ a biotin-HPDP o výsledné koncentraci 1 mmol·l⁻¹. Po 1 h inkubace při laboratorní teplotě ve tmě následovalo přidání 500 µl ledově vychlazeného acetonu a vzorky byly ponechány precipitovat přes noc při -28 °C. Jako negativní kontrola sloužily vzorky, k nimž bylo po biotinylníaci přidáno redukční činidlo DTT o výsledné koncentraci 100 mmol·l⁻¹.

Druhý den byly vzorky centrifugovány po dobu 20 min při 10000x g a 4 °C a následně 10 min za stejných podmínek. Mezi centrifugacemi byl sediment promyt 500 µl ledově vychlazeného acetonu. Sediment byl nakonec rozsuspendován v HEN pufru na koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Následně byly vzorky analyzovány metodami SDS-PAGE (3.3.8) a Western blot (3.3.9).

Použité roztoky:

- HENT pufr: 25 mmol·l⁻¹HEPES, pH 7,7; 1 mmol·l⁻¹EDTA; 0,1 mmol·l⁻¹neocuproin; 1% Triton X-100.
- HENS pufr: 25 mmol·l⁻¹HEPES, pH 7,7; 1 mmol·l⁻¹EDTA; 0,1 mmol·l⁻¹neocuproin; 1% SDS.
- HEN pufr: 25 mmol·l⁻¹HEPES, pH 7,7; 1 mmol·l⁻¹EDTA; 0,1 mmol·l⁻¹neocuproin.



Obr. 15 Schéma postupu značení S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch (BST). Jsou znázorněny tři proteiny (A, B, C) lišící se stupněm S-nitrosylace. BST se skládá se ze tří kroků. V prvním kroku dochází k blokaci volných thiolových residuí pomocí S-methylmethanthiosulfonátu (MMTS). V druhém kroku askorbát redukuje S-nitrosothioly za vzniku volných thiolových skupin. Ve třetí části BST jsou volné thioly značeny biotinem-HPDP. Takto upravené vzorky je následně možné analyzovat metodou SDS-PAGE za neredukujících podmínek a detekovat metodou Western blot s využitím anti-biotin protilátky (upraveno podle Forrester *et al.*, 2009).

3.3.8 SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti detergentu dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) slouží k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti.

Vzorky připravené metodou biotin-switch (3.3.7) byly smíchány v poměru 1:3 s 4x koncentrovaným Laemmliho vzorkovacím pufrům za neredukujících podmínek, tj. pufr byl připraven bez obsahu redukčních látek DTT či β -merkapt ethanolu. Z důvodu lability vazby proteinu značeného biotinem-HPDP nebyla provedena inkubace v termobloku před nanášením vzorku na gel. Do jamek v připraveném gelu (Tab. 4) bylo aplikováno 25 μ l vzorku a 3 μ l standardu molekulové hmotnosti.

Elektroforetická separace proteinů probíhala v 12% 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, v dělicím gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V.

Použité roztoky:

- 4x koncentrovaný Laemmliho vzorkovací pufr: 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 6,8; 16% SDS; 80% glycerol; 0,8% bromfenolová modř
- Standard molekulové hmotnosti Precision Plus Protein Dual Xtra Standards
- Elektrodotový pufr: 0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl; 0,192 mol·l⁻¹ glycin; 0,1% SDS

Tab. 4 Složení zaostřovacího a dělicího polyakrylamidového gelu pro přípravu 2 gelů pro skla s mezníky 1,5 mm.

Gel (%)	H ₂ O (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	0,01	0,1
12% (dělicí)	6,8	8	5	0,2	0,02	0,2

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

Pro dělicí gel byl použit 1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8.

† Přídavkem 10% APS byla zahájena polymerace.

3.3.9 Western blot

Metoda Western blot slouží ke kvalitativní nebo semikvantitativní detekci proteinů ve vzorku. Separované proteiny jsou působením elektrického proudu přenášeny z polyakrylamidového gelu na povrch membrány (nitrocelulosoové nebo PVDF s definovanou velikostí pórů) a následně detekovány specifickou protilátkou.

Transfer separovaných proteinů na nitrocelulosoovou membránu byl realizován pomocí blottingu v tankovém uspořádání po dobu 2 h. Před samotným přenosem byl veškerý blotovací materiál včetně gelu ponechán 20 min inkubovat v blotovacím pufru. Blotovací kazeta byla od spodní části (anoda) skládána v následujícím pořadí: blotovací porézní houbička, 2x blotovací papír, membrána, gel, 2x blotovací papír a blotovací porézní houbička. Úspěšnost transferu proteinů byla zjištěna viditelným přenosem barevného standardu markeru molekulové hmotnosti z gelu na membránu a také následným barvením membrány pomocí vodou vymývatelného červeného diazobarviva Ponceau S. Během imunochemické detekce byla membrána nejprve inkubována v blokovacím roztoku po dobu 2 h. Poté byla membrána přenesena do roztoku primární monoklonální anti-biotin protilátky konjugované s alkalickou fosfatase zředěné v poměru 1:2000 s blokovacím roztokem. Inkubace probíhala za stálého třepání přes noc při teplotě 4 °C. Druhý den byla membrána 4x po dobu 10 min promyta roztokem TTBS. Pro vizualizaci bandů byl použit barvicí roztok chromogenního substrátu NBT-BCIP. Reakce byla zastavena přidávkem destilované vody. Membrána s detekovanými bandy byla usušena a vyfocena. Intenzita bandů byla vyhodnocena v programu ImageJ 1.33 software (National Institute of Health, USA).

Použité roztoky a protilátky:

- Blotovací pufr: 0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl; 0,192 mol·l⁻¹ glycin; 20% methanol, pH 8,3
- Blokovací roztok: 5% BSA v TTBS pufru
- Barvicí roztok Ponceau S: 0,2% Ponceau S; 10% kyselina octová
- Primární protilátka: primární monoklonální myší anti-biotin protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase zředěná blokovacím roztokem v poměru 1:2000

- Pracovní pufr pro imunodetekci (TTBS): 20mM Tris; 500mM NaCl; 0,1% Tween-20; pH 7,5

3.3.10 Statistické vyhodnocení dat

Jednocestná analýza variance (One-Way ANOVA) a nepárový *t*-test byly provedeny v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

4 VÝSLEDKY

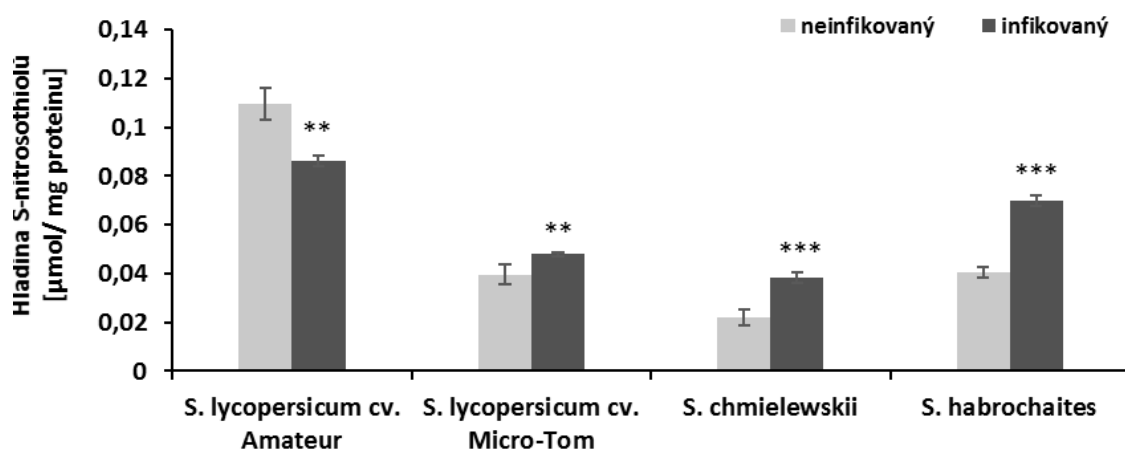
4.1 Vliv elicitinů na S-nitrosylaci

4.1.1 Porovnání hladiny proteinových S-nitrosothiolů u jednotlivých genotypů *Solanum* spp.

Prvním cílem v experimentální části předložené diplomové práce bylo porovnat hladinu proteinových S-nitrosothiolů (RSNO) v listech neinfikovaných a infikovaných rostlin studovaných genotypů *Solanum* spp. s využitím Savillovy metody (Obr. 16).

U neinfikovaných vzorků byla detekována srovnatelná hladina proteinových RSNO u genotypů *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a *S. chmielewskii*. V případě genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur byla zaznamenána 2,5 krát vyšší hladina RSNO. U genotypu *S. chmielewskii* byla stanovena o polovinu nižší hladina RSNO ve srovnání s výše uvedenými genotypy (Obr. 16).

V případě infikovaných vzorků byla zjištěna rozdílná hladina RSNO u jednotlivých genotypů. Podobný trend byl shledán u středně rezistentních genotypů *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a *S. chmielewskii*, a také i u rezistentního *S. habrochaites*, kdy ve všech případech došlo po infekci *P. neolycopersici* k významnému nárůstu RSNO. Naopak, u náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur došlo ke snížení hladiny RSNO.



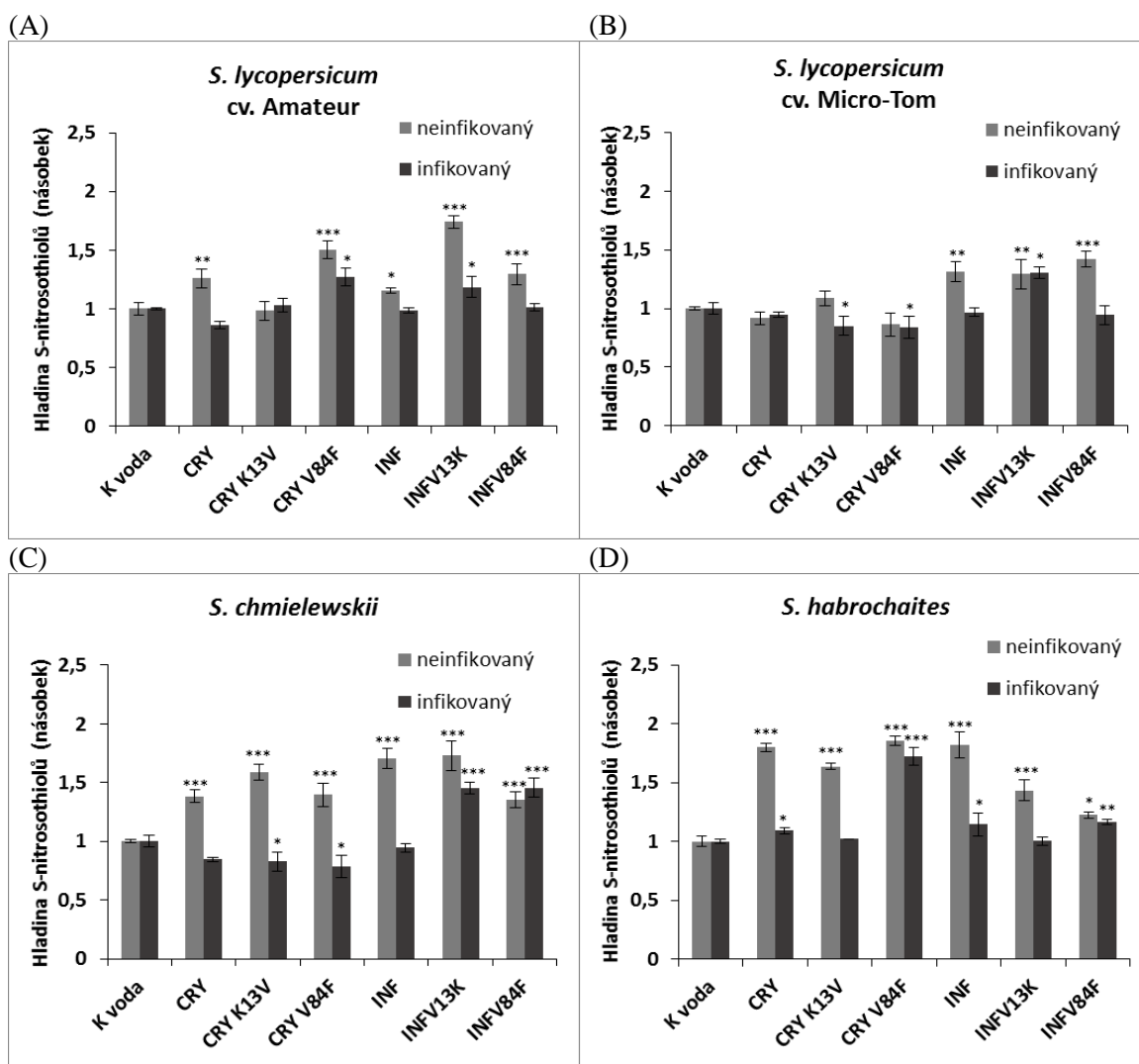
Obr. 16 Stanovení hladiny proteinových S-nitrosothiolů v neinfikovaných a infikovaných listech studovaných genotypů *Solanum* spp. Nepárový *t*-test ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.1.2 Stanovení hladiny proteinových S-nitrosothiolů po elicitaci

Vliv elicitinů a jejich mutantů na hladinu proteinových RSNO v listech neinfikovaných a infikovaných rostlin byl zkoumán u všech genotypů *Solanum* spp. (Obr. 17, Tab 5).

Elicitace genotypů *S. lycopersicum* cv. Amateur (Obr. 17 (A)), *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom (Obr 17 (B)) *S. chmielewskii* (Obr. 17 (C)) a *S. habrochaites* (Obr. 17 (D)) indukovala nárůst RSNO u neinfikovaných vzorků. Nejvýrazněji se zvýšení hladiny RSNO projevilo u rezistentního genotypu *S. habrochaites* a středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii*. Nejmenší změna hladiny RSNO byla detekována u genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, kdy v případě aplikace elicitinů CRY a CRY V84F došlo k mírnému snížení koncentrace RSNO ve srovnání s kontrolou.

Při studiu vlivu elicitinů v průběhu patogeneze byl zjištěn pokles, ale také i nárůst hladiny RSNO o různé intenzitě v závislosti na studovaném genotypu *Solanum* spp. a typu elicitinu. Jednotlivé změny nebyly výrazné při srovnání s infikovanou kontrolou infiltrovanou pouze vodou, oproti neinfikovaným vzorkům okomentovaným výše v textu. Nejvýznamnější vliv na zvýšení hladiny RSNO měla elicitace INF V13K a INF V84F u genotypu *S. chmielewskii* (Obr. 17 (C)) a také CRY V84F u genotypu *S. habrochaites* (Obr. 17 (D)). Naopak účinkem CRY K13V a CRY V84F došlo ke snížení hladiny RSNO u genotypů *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom (Obr. 17 (B)) a *S. chmielewskii* (Obr. 17 (C)).



Obr. 17 Změna hladiny proteinových S-nitrosothiolů (RSNO) vlivem aplikace elicitinů v listech neinfikovaných a infikovaných genotypů *Solanum* spp.. Neinfikované vzorky 48 h po aplikaci elicitinů, infikované vzorky 48 h po inokulaci patogenem *P. neolyopersici* (resp. 96 h po elicitaci). Hladina proteinových RSNO byla vypočítána v jednotkách $\mu\text{mol/mg}$ proteinu. V případě neinfikovaných vzorků byly hodnoty vztaženy k neinfikované kontrole infiltrované vodou. Hodnoty pro infikované vzorky byly vztaženy ke kontrole infiltrované vodou a infikované patogenem *P. neolyopersici*. Plné označení mutantu INF V13K uvedené v grafech je INF V13K/A14T. Statistika: Anova * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tab. 5 Orientační tabulka s porovnáním vlivu aplikace elicitinů na hladinu proteinových S-nitrosothiolů v listech neinfikovaných a infikovaných genotypů *Solanum* spp.. (A) Neinfikované vzorky 48 h po aplikaci elicitinů, (B) infikované vzorky 48 h po inokulaci patogenem *P. neolycoopersici* (resp. 96 h po elicitaci).

(A) Neinfikované vzorky

Elicitin	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur	<i>S. lycopersicum</i> cv. Micro-Tom	<i>S. chmielewskii</i>	<i>S. habrochaites</i>
Kontrola	~	~	~	~
CRY	+	+	+	++
CRY K13V	~	~	++	++
CRY V84F	++	+	+	++
INF	+	+	++	++
INFV13K/A14T	++	+	++	+
INF V84F	+	+	+	+

(B) Infikované vzorky

Elicitin	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur	<i>S. lycopersicum</i> cv. Micro-Tom	<i>S. chmielewskii</i>	<i>S. habrochaites</i>
Kontrola	~	~	~	~
CRY	+	~	+	~
CRY K13V	~	+	+	~
CRY V84F	+	+	+	++
INF	~	~	~	+
INFV13K/A14T	+	+	+	~
INF V84F	~	~	+	+

Rozdíl v hladině proteinových RSNO (násobek)

++++	+++	++	+	~	+	++	+++	++++
pod 0,3	od 0,5 do 0,3	od 0,7 do 0,5	od 0,9 do 0,7	od 0,9 do 1,1	od 1,1 do 1,5	od 1,5 do 2	od 2 do 2,5	nad 2,5

4.2 Detekce S-nitrosylovaných proteinů metodou biotin-switch

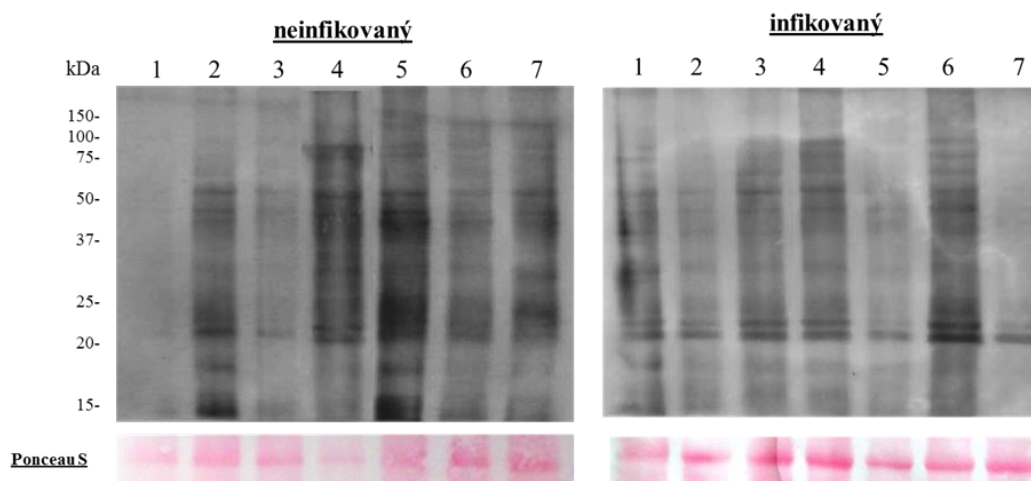
V rámci dalšího experimentu byly izolovány S-nitrosylované proteiny obsažené v listech jednotlivých elicitinů u neinfikovaných a infikovaných vzorků u všech studovaných genotypů *Solanum* spp. S-nitrosylované proteiny byly značeny metodou BST. Separace proteinů byla prováděna pomocí SDS-PAGE za neredukujících podmínek a následně byly proteiny přeneseny na nitroceluloseovou membránu. Pro detekci proteinů s navázaným biotinem-HPDP byla použita anti-biotin protilátka konjugovaná s AP (1:2000) a proteiny byly vizualizovány barvením NBT-BCIP. Na Obr. 18-21 jsou porovnány u jednotlivých genotypů detekované bandy S-nitrosylovaných proteinů a také vyhodnoceny odpovídající intenzity signálu. Na Obr. 22 je zobrazen kontrolní experiment pro metodu BST.

U všech genotypů došlo u neinfikovaných vzorků infiltrovaných elicitinu k nárůstu S-nitrosylovaných proteinů, přičemž největší intenzita byla zaznamenána u *S. chmielewskii* po elicitaci CRY, CRY K13V, CRY V84F a INF V13K/A14T (Obr. 20) a také u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur vlivem působení CRY V84F a INF (Obr. 18).

U jednotlivých genotypů byla sledována v průběhu patogeneze rozdílná intenzita a zastoupení detekovaných S-nitrosylovaných proteinů. V případě citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur byly zaznamenány nejintenzivnější bandy v oblasti molekulových hmotností 55 kDa a 22 kDa (Obr. 18). U genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom (Obr. 19) byly detekovány nejintenzivnější bandy o molekulové hmotnosti 55 kDa a 30-33 kDa. V oblasti molekulových hmotností 55 kDa, 33 kDa a 17 kDa došlo k indukci S-nitrosylace proteinů, kdy intenzita jednotlivých bandů závisela na typu elicitinu (Obr. 19). U genotypu *S. chmielewskii* (Obr. 20) a *S. habrochaites* (Obr. 21) byl výskyt S-nitrosylovaných proteinů nejintenzivnější v oblasti molekulových hmotností 55 kDa, 33 kDa, 17 kDa a 15 kDa.

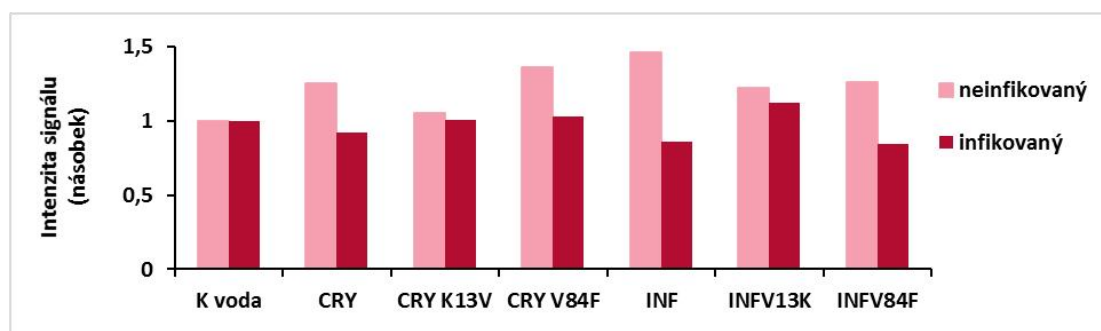
S. lycopersicum cv. *Amateur*

(A)



Zkratky: 1: K, 2: CRY, 3: CRY K13V, 4: CRY V84F, 5: INF, 6: INF V13K/A14T, 7: INF V84F

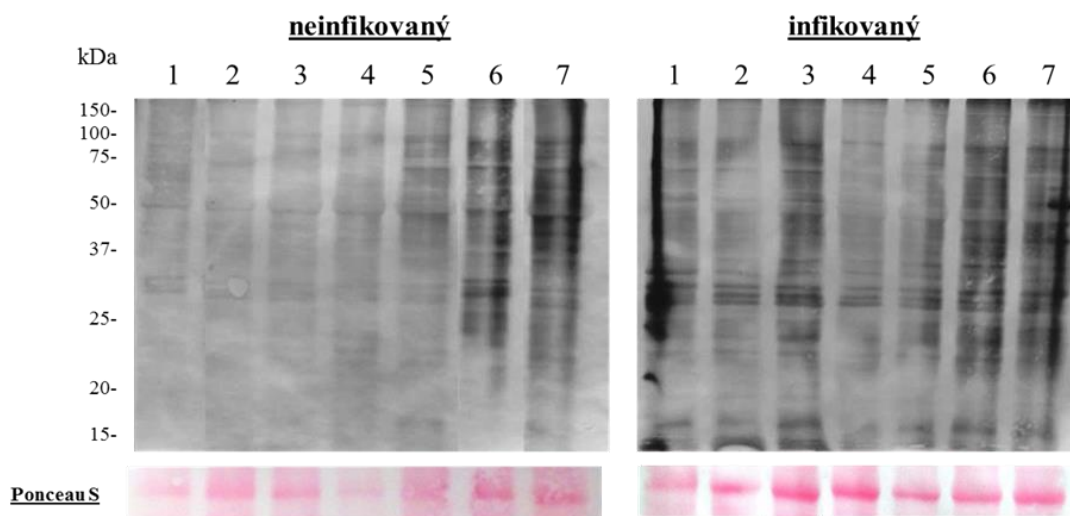
(B)



Obr. 18 Detekce S-nitrosylovaných proteinů v listech u neinfikovaných a infikovaných vzorků genotypu *S. lycopersicum* cv. *Amateur*. Neinfikované vzorky 48 h po aplikaci elicitinů, infikované vzorky 48 h po inokulaci patogenem *P. neolycopersici* (resp. 96 h po elicitaci). (A) Imunochemická detekce S-nitrosylovaných proteinů v listech pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:2000). Blokování volných thiolů pomocí 0,02 mmol·l⁻¹MMTS, S-nitrosylovaná cysteinová residua byla redukována 1 mmol·l⁻¹ k. askorbovou a značena 1 mmol·l⁻¹ biotinem-HPDP. SDS-PAGE probíhala za neredukujících podmínek. Na gel bylo naneseno 100 μg celkových proteinů. Přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu. Kontrolní barvení membrány pomocí Ponceau S. Detekce pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:2000), barvení NBT-BCIP. (B) Denzitometrické vyhodnocení hladiny S-nitrosylovaných proteinů v programu ImageJ. V případě neinfikovaných vzorků byly hodnoty vztaženy k neinfikované kontrole infiltrované vodou. Hodnoty pro infikované vzorky byly vztaženy ke kontrole infiltrované vodou a infikované patogenem *P. neolycopersici*. Plné označení mutantu INF V13K uvedené v grafu je INF V13K/A14T.

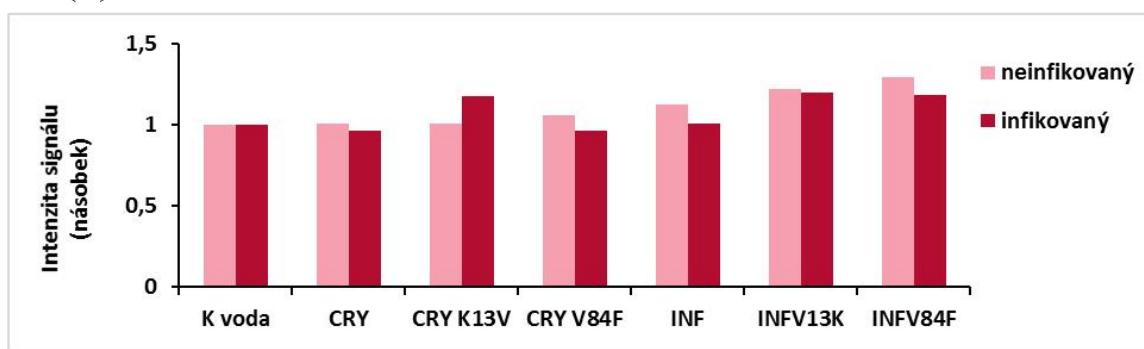
S. lycopersicum cv. Micro-Tom

(A)



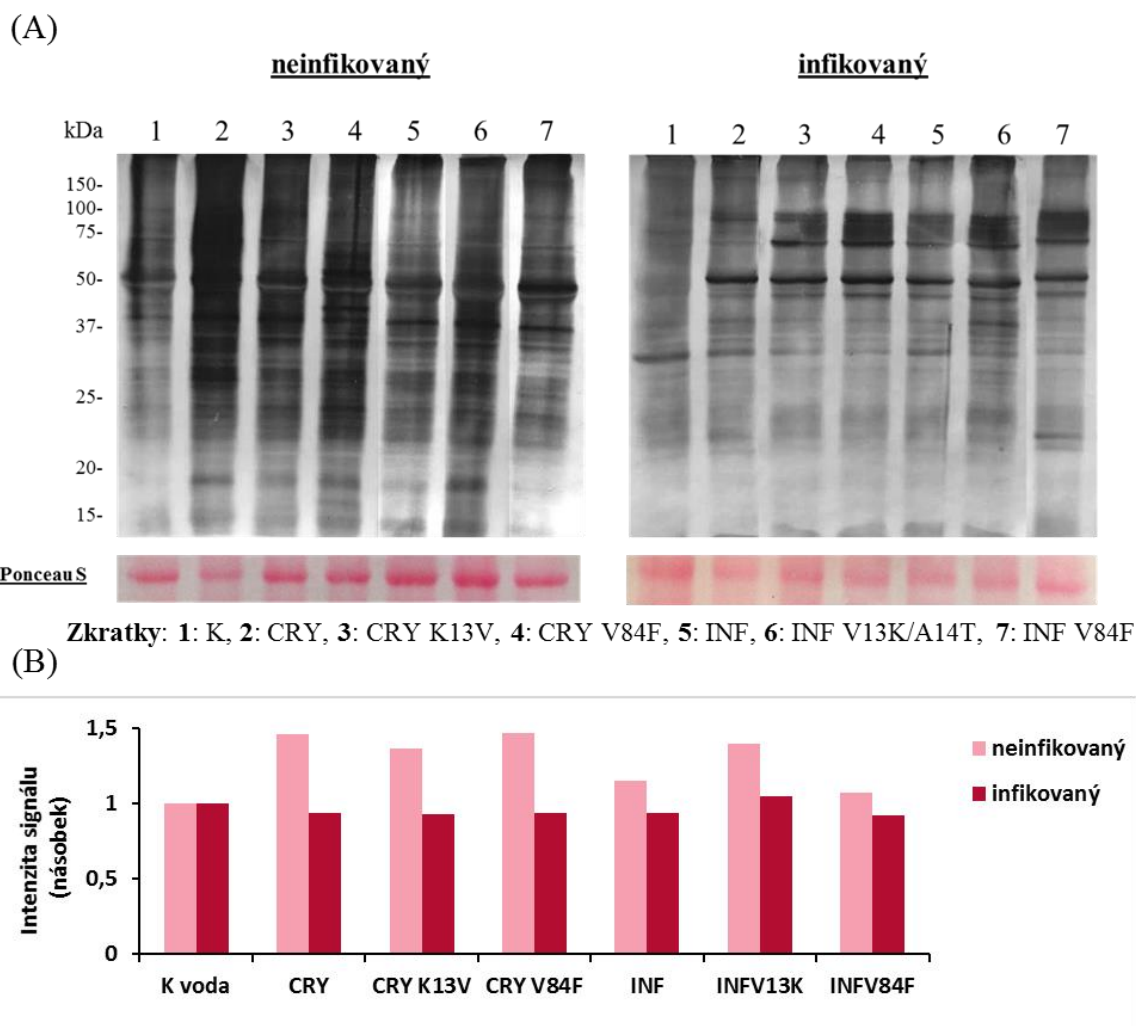
Zkratky: 1: K, 2: CRY, 3: CRY K13V, 4: CRY V84F, 5: INF, 6: INF V13K/A14T, 7: INF V84F

(B)



Obr. 19 Detekce S-nitrosylovaných proteinů v listech u neinfikovaných a infikovaných vzorků genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Neinfikované vzorky 48 h po aplikaci elicitinů, infikované vzorky 48 h po inokulaci patogenem *P. neolycoopersici* (resp. 96 h po elicitaci). (A) Imunochemická detekce S-nitrosylovaných proteinů v listech pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:2000). Blokování volných thiolů pomocí 0,02 mmol·l⁻¹MMTS, S-nitrosylovaná cysteinová residua byla redukována 1 mmol·l⁻¹ k. askorbovou a značena 1 mmol·l⁻¹ biotinem-HPDP. SDS-PAGE probíhala za neredukujících podmínek. Na gel bylo naneseno 100 μg celkových proteinů. Přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu. Kontrolní barvení membrány pomocí Ponceau S. Detekce pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:2000), barvení NBT-BCIP. (B) Denzitometrické vyhodnocení hladiny S-nitrosylovaných proteinů v programu ImageJ. V případě neinfikovaných vzorků byly hodnoty vztaženy k neinfikované kontrole infiltrované vodou. Hodnoty pro infikované vzorky byly vztaženy ke kontrole infiltrované vodou a infikované patogenem *P. neolycoopersici*. Plné označení mutantu INF V13K uvedené v grafu je INF V13K/A14T.

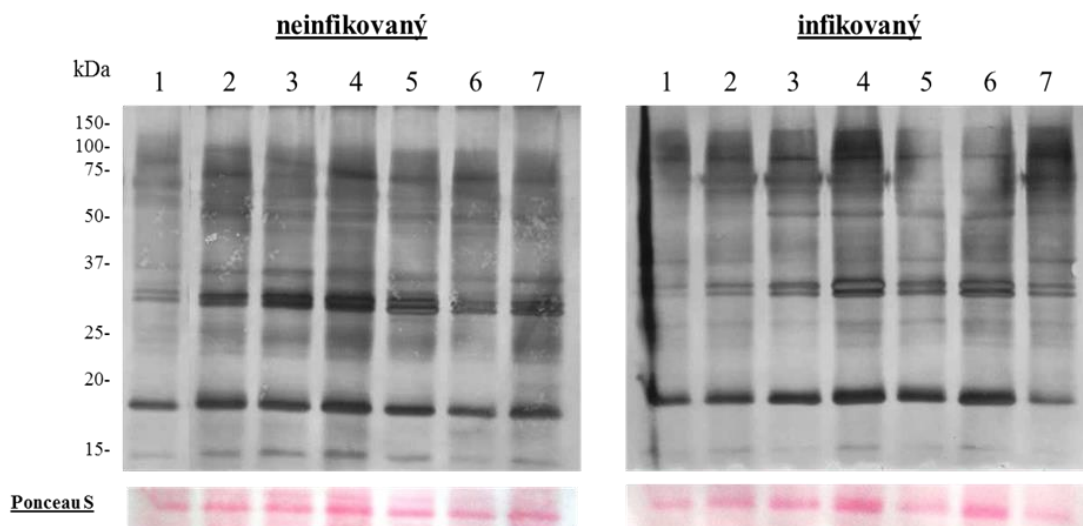
S. chmielewskii



Obr. 20 Detekce S-nitrosylovaných proteinů v listech u neinfikovaných a infikovaných vzorků genotypu *S. chmielewskii*. Neinfikované vzorky 48 h po aplikaci elicitinů, infikované vzorky 48 h po inokulaci patogenem *P. neolycopersici* (resp. 96 h po elicitaci). (A) Imunochemická detekce S-nitrosylovaných proteinů v listech pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:2000). Blokování volných thiolů pomocí 0,02 mmol·l⁻¹MMTS, S-nitrosylovaná cysteinová residua byla redukována 1 mmol·l⁻¹ k. askorbovou a značena 1 mmol·l⁻¹ biotinem-HPDP. SDS-PAGE probíhala za neredukujících podmínek. Na gel bylo naneseno 100 μg celkových proteinů. Přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu. Kontrolní barvení membrány pomocí Ponceau S. Detekce pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:2000), barvení NBT-BCIP. (B) Densitometrické vyhodnocení hladiny S-nitrosylovaných proteinů v programu ImageJ. V případě neinfikovaných vzorků byly hodnoty vztaženy k neinfikované kontrole infiltrované vodou. Hodnoty pro infikované vzorky byly vztaženy ke kontrole infiltrované vodou a infikované patogenem *P. neolycopersici*. Plně označení mutantu INF V13K uvedené v grafu je INF V13K/A14T.

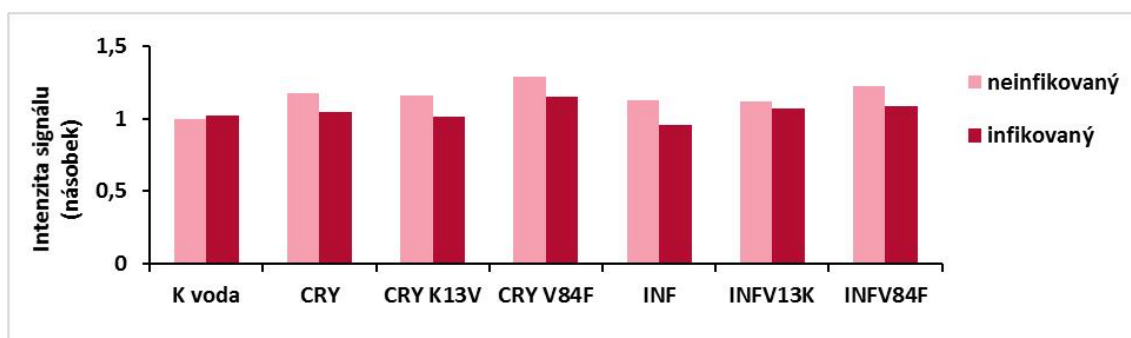
S. habrochaites

(A)

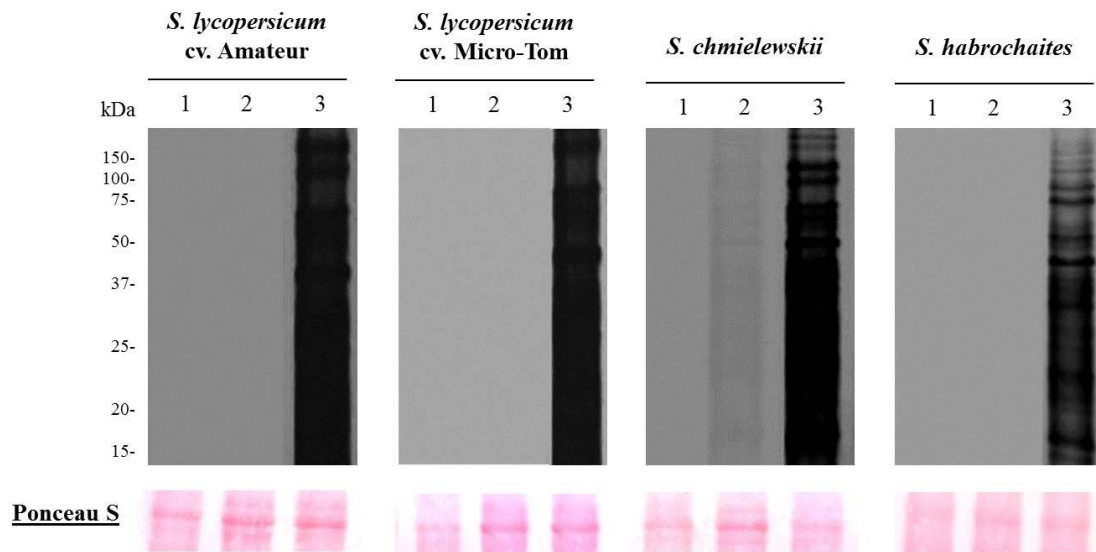


Zkratky: 1: K, 2: CRY, 3: CRY K13V, 4: CRY V84F, 5: INF, 6: INF V13K/A14T, 7: INF V84F

(B)



Obr. 21 Detekce S-nitrosylovaných proteinů v listech u neinfikovaných a infikovaných vzorků genotypu *S. habrochaites*. Neinfikované vzorky 48 h po aplikaci elicitinů, infikované vzorky 48 h po inokulaci patogenem *P. neolycopersici* (resp. 96 h po elicítaci). (A) Imunochemická detekce S-nitrosylovaných proteinů v listech pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:2000). Blokování volných thiolů pomocí 0,02 mmol·l⁻¹MMTS, S-nitrosylovaná cysteinová residua byla redukována 1 mmol·l⁻¹ k. askorbovou a značena 1 mmol·l⁻¹ biotinem-HPDP. SDS-PAGE probíhala za neredukujících podmínek. Na gel bylo nanášeno 100 μg celkových proteinů. Přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu. Kontrolní barvení membrány pomocí Ponceau S. Detekce pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:2000), barvení NBT-BCIP. (B) Denzitometrické vyhodnocení hladiny S-nitrosylovaných proteinů v programu ImageJ. V případě neinfikovaných vzorků byly hodnoty vztaženy k neinfikované kontrole infiltrované vodou. Hodnoty pro infikované vzorky byly vztaženy ke kontrole infiltrované vodou a infikované patogenem *P. neolycopersici*. Plně označení mutantu INF V13K uvedené v grafu je INF V13K/A14T.



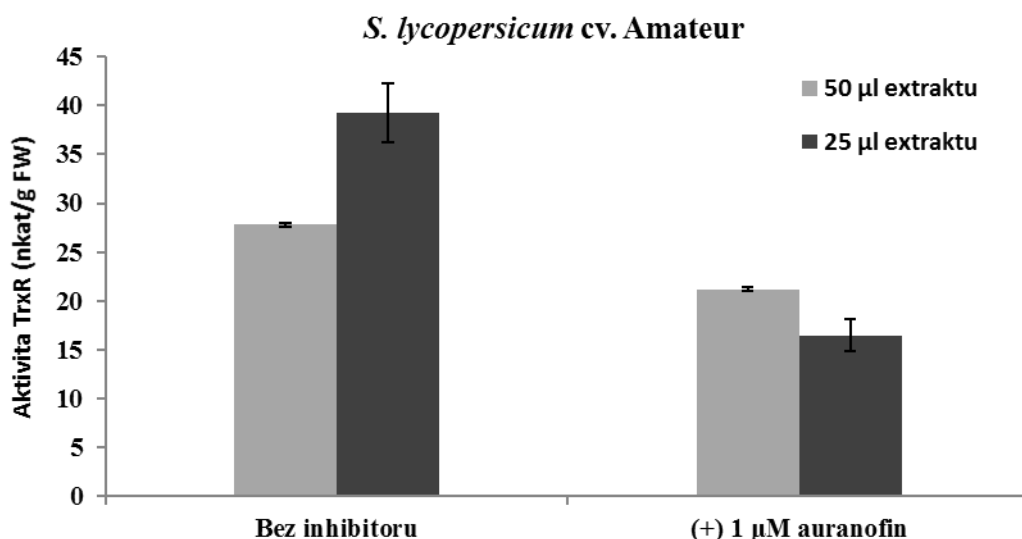
Obr. 22 Kontrolní experiment pro detekci S-nitrosylovaných proteinů v listech genotypů *Solanum* spp. u neinfikovaných vzorků infiltrovaných vodou. (1) Inkubace vzorku bez $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ k. askorbové, (2) přidavek $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ DTT po biotinylnaci vzorku pro redukci vazby thiolu s biotinem, (3) vynechání činidla $0,02 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ MMTS pro blokaci volných thiolů před samotným značením. Imunochemická detekce pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:2000). SDS-PAGE za neredukujících podmínek. Na gel naneseo $100 \mu\text{g}$ celkových proteinů. Přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu. Kontrolní barvení membrány pomocí Ponceau S. Detekce pomocí anti-biotin protilátky konjugované s AP (1:2000), barvení NBT-BCIP.

4.3 Vliv elicitinů na denitrosylaci

V rámci předložené diplomové práce byl zkoumán vliv elicitinů na proces denitrosylace u neinfikovaných a infikovaných vzorků *Solanum* spp. Byla stanovena aktivita dvou klíčových enzymů, thioredoxinreduktasy (TrxR) a S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR), a to spektrofotometricky sledováním oxidace NADPH či NADH.

4.3.1 Zavedení protokolu pro stanovení aktivity thioredoxinreduktasy u rostlin

Ve studii Cunniff *et al.* (2013) byla popsána nová metoda přímého stanovení aktivity TrxR v lyzátech živočišných buněčných linií. Pro možnost spektrofotometrického měření aktivity enzymu TrxR v extraktech listů *Solanum* spp. bylo nejprve potřeba tento protokol otestovat. Při stanovení aktivity TrxR u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur (Obr. 23) byly použity dva rozdílné objemy extraktu. V případě aplikace objemu 25 μl byla naměřena vyšší aktivita než v případě aplikace 50 μl . Přídavek 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ specifického inhibitoru TrxR, auranofinu, způsobil inhibici enzymu v obou případech. Aktivita enzymu byla v případě použití 25 μl extraktu snížena o více než 50 %.

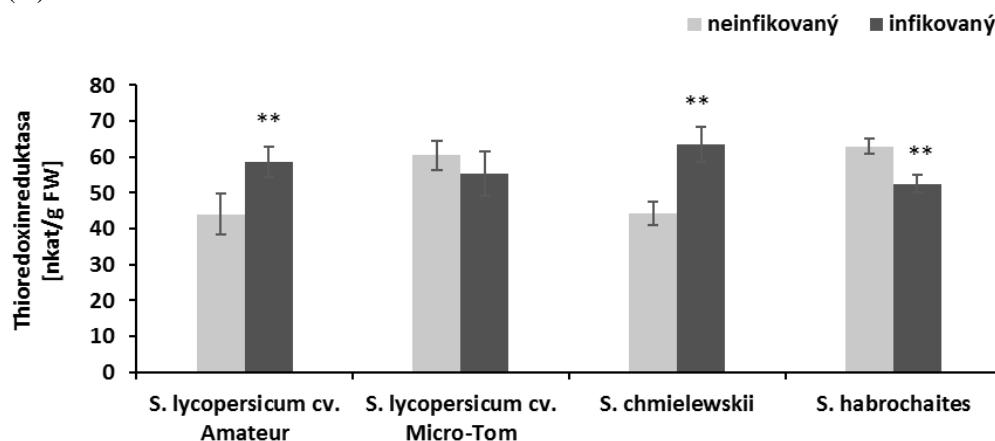


Obr. 23 Stanovení enzymové aktivity thioredoxinreduktasy (TrxR) v listech neinfikovaných kontrolních vzorků genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. Aktivita TrxR byla stanovena spektrofotometricky sledováním oxidace NADPH při vlnové délce 340 nm. Jako substrát byl do reakce přidán 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ selenocystin. Jako specifický inhibitor sloužil 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auranofin. Bylo použito 50 μl nebo 25 μl rostlinného extraktu.

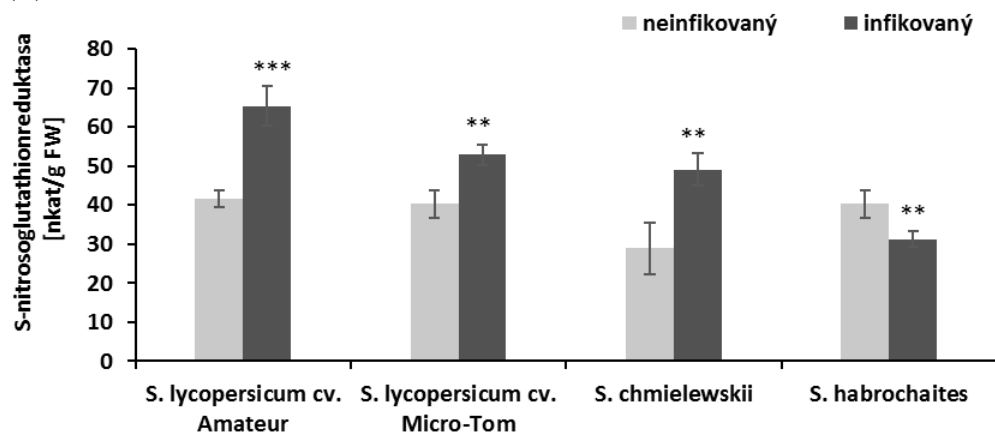
4.3.2 Aktivita thio-redoxinreduktasy a S-nitrosoglutathionreduktasy

Součástí experimentální práce bylo porovnání enzymové aktivity TrxR a GSNOR u neinfikovaných a infikovaných kontrolních listů *Solanum* spp. (Obr. 24). V případě TrxR (Obr. 24 (A)) byla detekovaná srovnatelná aktivita u *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. chmielewskii* a vlivem patogenu *P. neolyopersici* byl indukován její nárůst. U *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a *S. habrochaites* byla stanovena mírně vyšší aktivita TrxR, avšak vlivem patogenu došlo k jejímu poklesu. GSNOR aktivita byla srovnatelná u *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom i *S. habrochaites* (Obr. 24 (B)). U *S. chmielewskii* byla aktivita enzymu mírně nižší. Infekce *P. neolyopersici* ovlivnila GSNOR aktivitu u všech genotypů. U *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a *S. chmielewskii* patogen indukoval významný nárůst aktivity, přičemž u genotypu *S. habrochaites* byl zaznamenán pokles aktivity enzymu.

(A)



(B)



Obr. 24 Stanovení aktivity enzymů denitrosylace v listech neinfikovaných a infikovaných kontrolních vzorků *Solanum* spp.. (A) Thioredoxinreduktasa, (B) S-nitrosoglutathionreduktasa. Ne párový *t*-test ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

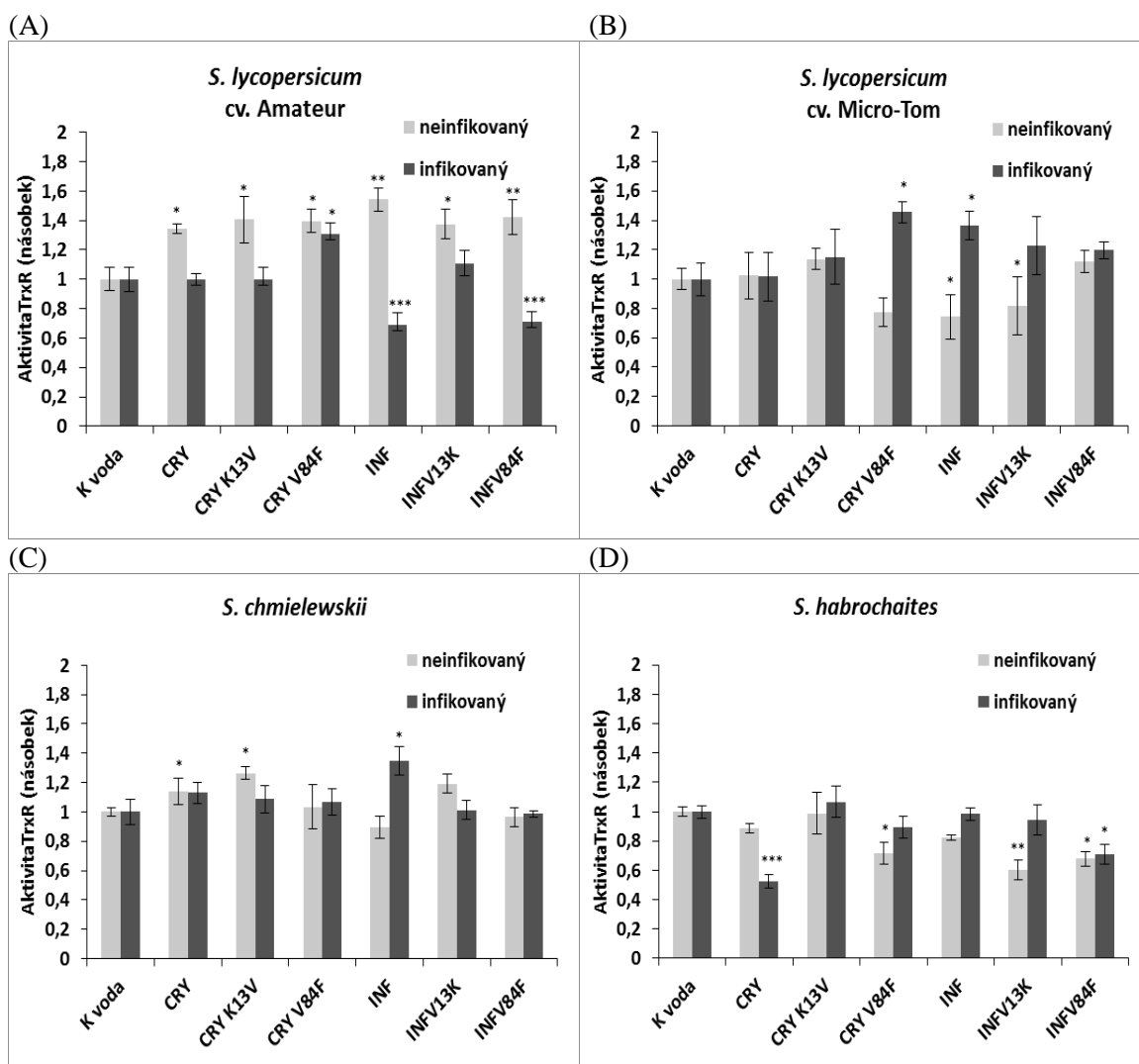
4.3.3 Stanovení aktivity thio-redoxin-reduktasy po elicitaci

Vliv elicitinů na aktivitu TrxR v listech u neinfikovaných i infikovaných rostlin byl zkoumán u všech studovaných genotypů *Solanum* spp. lišících se rezistencí k použitému patogenu *P. neolycopersici* a byla pozorována změna aktivity TrxR o různé intenzitě v závislosti na modelovém genotypu a typu elicitinu (Obr. 25, Tab 6.).

V případě genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur (Obr. 25 (A)) byl zaznamenán výraznější nárůst aktivity po aplikaci elicitinů u neinfikovaných vzorků. Po aplikaci INF byl detekován téměř dvojnásobný nárůst aktivity TrxR. Při studiu vlivu elicitinů v reakci na patogen došlo k významnému snížení aktivity TrxR vlivem INF a jeho mutantu INF V84F. Naopak po aplikaci CRY V84F se aktivita TrxR zvýšila. Působením ostatních studovaných elicitinů nedošlo k významným změnám aktivity enzymu v porovnání s infikovanou kontrolou infiltrovanou vodou.

U středně rezistentních genotypů *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom (Obr. 25 (B)) a *S. chmielewskii* (Obr. 25 (C)) nebyl shledán významný vliv elicitinů na aktivitu TrxR. Pouze aplikace elicitinů CRY V84F, INF a INF V13K/A14T vedla k významnému snížení aktivity enzymu u neinfikovaných vzorků genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. V případě genotypu *S. chmielewskii* aplikace CRY a jeho mutantní formy CRY K13V vedla k významnému zvýšení aktivity TrxR. Během patogenese indukovala aplikace INF zvýšení aktivity TrxR obou zmíněných genotypů. Mutantní forma CRY V84F způsobila významný nárůst aktivity TrxR pouze u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom (Obr. 25 (B)).

Naopak u genotypu *S. habrochaites* (Obr. 25 (D)) bylo detekováno zejména snížení aktivity TrxR vlivem elicitinů. Významné snížení aktivity TrxR bylo pozorováno po elicitaci CRY V84F, INF V13K a INFV84F u neinfikovaných listů. Nejintenzivnější změna nastala během patogenese po účinku CRY a CRY V84F, kdy vlivem CRY došlo ke snížení aktivity o 50 % ve srovnání s neinfikovanou kontrolou.



Obr. 25 Změna aktivity thioredoxinreduktasy (TrxR) vlivem aplikace elicitinů v listech neinfikovaných a infikovaných genotypů *Solanum* spp.. Neinfikované vzorky 48 h po aplikaci elicitinů, infikované vzorky 48 h po inokulaci patogenem *P. neolyopersici* (resp. 96 h po elicitaci). Vypočítaná aktivita TrxR v nkat byla vztažena na g čerstvé hmoty. V případě neinfikovaných vzorků byly hodnoty vztaženy k neinfikované kontrole infiltrované vodou. Hodnoty pro infikované vzorky byly vztaženy ke kontrole infiltrované vodou a infikované patogenem *P. neolyopersici*. Plné označení mutantu INF V13K uvedené v grafech je INF V13K/A14T. Statistika: Anova * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tab. 6 Orientační tabulka s porovnáním vlivu elicitinů na změnu aktivity TrxR v listech jednotlivých genotypů *Solanum* spp. (A) u neinfikovaných vzorků 48 h po aplikaci elicitinů, (B) u infikovaných vzorků 48 h po inokulaci s patogenem (resp. 96 h po elicitaci).

(A) Neinfikované vzorky

Elicitin	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur	<i>S. lycopersicum</i> cv. Micro-Tom	<i>S. chmielewskii</i>	<i>S. habrochaites</i>
Kontrola	~	~	~	~
CRY	+	~	+	+
CRY K13V	+	~	+	~
CRY V84F	+	++	~	++
INF	++	++	+	+
INFV13K/A14T	+	+	+	++
INF V84F	+	+	~	++

(B) Infikované vzorky

Elicitin	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur	<i>S. lycopersicum</i> cv. Micro-Tom	<i>S. chmielewskii</i>	<i>S. habrochaites</i>
Kontrola	~	~	~	~
CRY	~	~	+	+++
CRY K13V	~	+	~	~
CRY V84F	+	+	~	+
INF	++	+	+	~
INFV13K/A14T	+	+	~	~
INF V84F	++	+	~	++

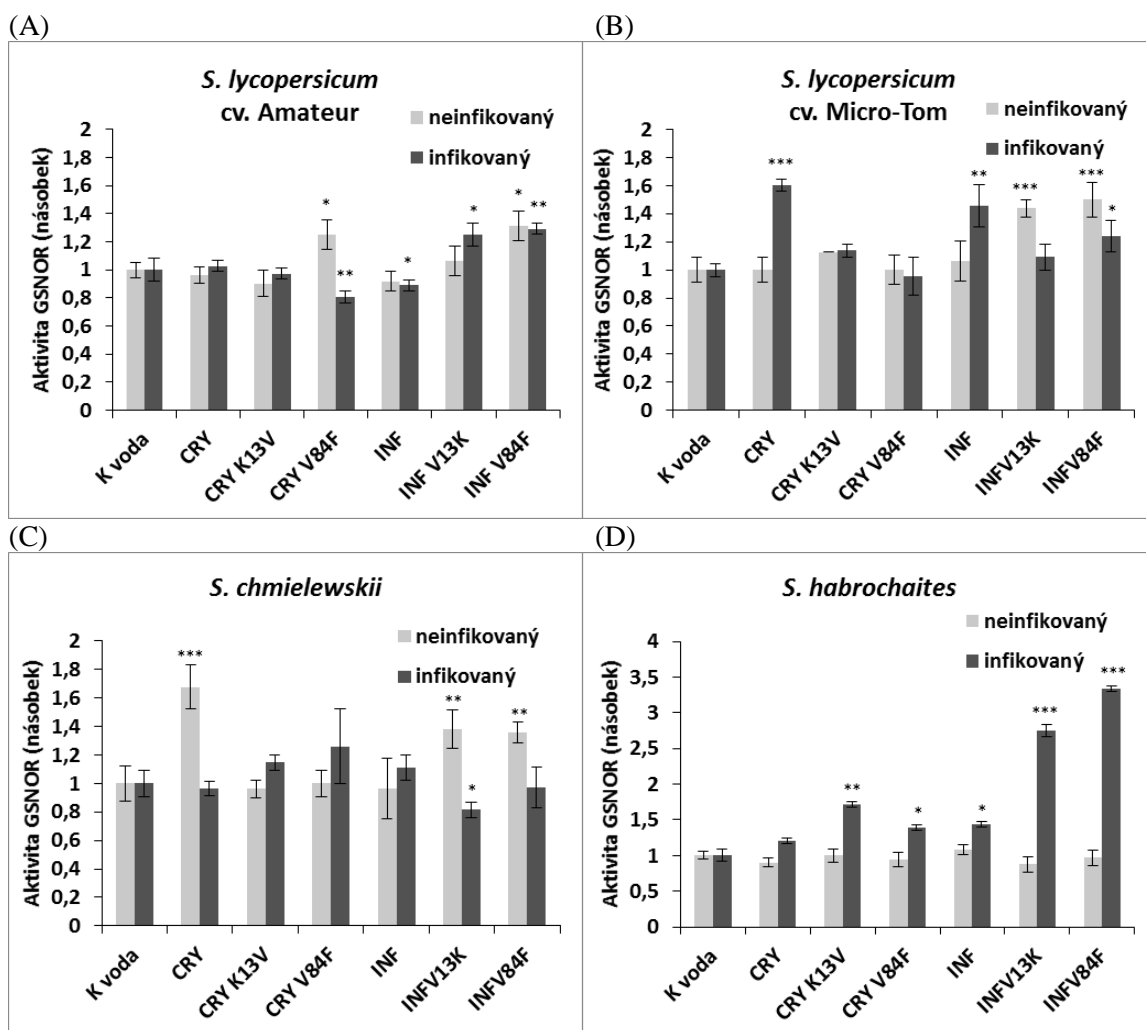
Rozdíl v aktivitě TrxR (násobek)

++++	+++	++	+	~	+	++	+++	++++
pod 0,3	od 0,5 do 0,3	od 0,7 do 0,5	od 0,9 do 0,7	od 0,9 do 1,1	od 1,1 do 1,5	od 1,5 do 2	od 2 do 2,5	nad 2,5

4.3.4 Stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy po elicitaci

Vliv elicitinů na aktivitu GSNOR v listech u neinfikovaných i infikovaných rostlin byl stanovován u všech studovaných genotypů *Solanum* spp. lišících s rozdílnou rezistencí vůči *P. neolycopersici*. K modulaci aktivity GSNOR došlo u neinfikovaných vzorků po elicitaci pouze v některých případech, a to o různé intenzitě v závislosti na modelovém genotypu a typu elicitinu (Obr. 26, Tab 7). Jednalo se o citlivý genotyp *S. lycopersicum* cv. Amateur (Obr. 26 (A)), po aplikaci CRY V84F a INF V84F, dále *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom (Obr. 26 (B)) působením obou mutantních forem INF a u *S. chmielewskii* (Obr. 26 (C)) po elicitaci CRY, INF V13K/A14T a INF V84F. U rezistentního genotypu *S. habrochaites* došlo po aplikaci elicitinů k mírnému poklesu aktivity GSNOR u CRY a INF V13K/A14T (Obr. 26 (D)).

Během patogenese byly zaznamenány změny aktivity GSNOR vlivem elicitinů. Elicítace CRY V84F a INF vedla ke snížení aktivity enzymu, naopak INF V13K/A14T a INF V84F indukovaly nárůst aktivity ve srovnání s kontrolou u *S. lycopersicum* cv. Amateur (Obr. 26 (A)). U genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom (Obr. 26 (B)) zvýšení aktivity enzymu nastalo především po aplikaci CRY a INF. V případě genotypu *S. chmielewskii* (Obr. 26 (C)) aplikace mutantu INF V13K/A14T indukovala významný pokles aktivity. Nejintenzivnější vliv elicitinů na zvýšení aktivity GSNOR během patogenese byl pozorován u genotypu *S. habrochaites* (Obr. 26 (D)). Mutantní forma CRY K13V způsobila dvojnásobný nárůst aktivity. Mutant INF V13K/A14T indukoval 2,5krát vyšší nárůst aktivity GSNOR a INF V84F dokonce trojnásobný oproti kontrole infiltrované vodou a infikované *P. neolycopersici*.



Obr. 26 Změna aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) vlivem aplikace elicitinů v listech neinfikovaných a infikovaných genotypů *Solanum* spp.. Neinfikované vzorky 48 h po aplikaci elicitinů, infikované vzorky 48 h po inokulaci patogenem *P. neolycopersici* (resp. 96 h po elicitaci). Vypočítaná aktivita GSNOR v nkat byla vztažena na g čerstvé hmoty. V případě neinfikovaných vzorků byly hodnoty vztaženy k neinfikované kontrole infiltrované vodou. Hodnoty pro infikované vzorky byly vztaženy ke kontrole infiltrované vodou a infikované patogenem *P. neolycopersici*. Plné označení mutantu INF V13K uvedené v grafech je INF V13K/A14T. Statistika: Anova * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Tab. 7 Orientační tabulka s porovnáním vlivu elicitinů na změnu aktivity GSNOR v listech jednotlivých genotypů *Solanum* spp. (A) u neinfikovaných vzorků 48 h po aplikaci elicitinů, (B) u infikovaných vzorků 48 h po inokulaci s patogenem (resp. 96 h po elicitaci).

(A) Neinfikované vzorky

Elicitin	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur	<i>S. lycopersicum</i> cv. Micro-Tom	<i>S. chmielewskii</i>	<i>S. habrochaites</i>
Kontrola	~	~	~	~
CRY	~	~	++	+
CRY K13V	+	+	~	~
CRY V84F	+	~	~	~
INF	~	~	~	~
INFV13K/A14T	~	+	+	+
INF V84F	+	+	+	~

(B) Infikované vzorky

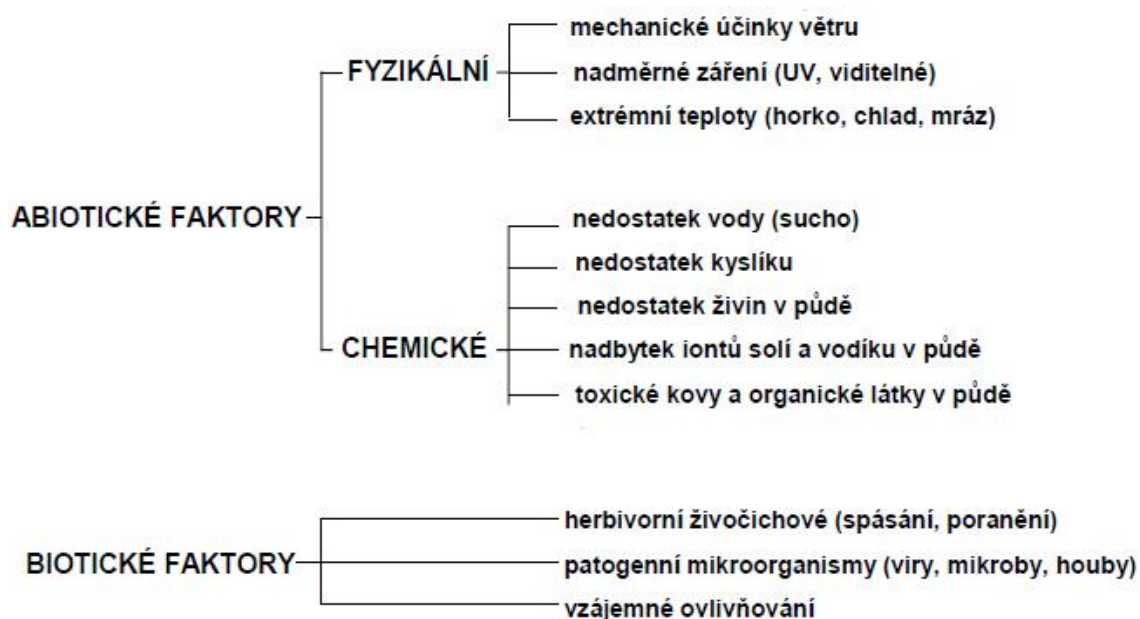
Elicitin	<i>S. lycopersicum</i> cv. Amateur	<i>S. lycopersicum</i> cv. Micro-Tom	<i>S. chmielewskii</i>	<i>S. habrochaites</i>
Kontrola	~	~	~	~
CRY	~	++	~	+
CRY K13V	~	+	+	++
CRY V84F	+	~	+	+
INF	+	+	+	+
INFV13K/A14T	+	~	+	++++
INF V84F	+	+	~	++++

Rozdíl v aktivitě GSNOR (násobek)

++++	+++	++	+	~	+	++	+++	++++
pod 0,3	od 0,5 do 0,3	od 0,7 do 0,5	od 0,9 do 0,7	od 0,9 do 1,1	od 1,1 do 1,5	od 1,5 do 2	od 2 do 2,5	nad 2,5

5 DISKUSE

Rostliny v průběhu svého života musí často reagovat na řadu různých stresových faktorů, které negativně ovlivňují jejich životní funkce a vedou až k možnému uhynutí rostliny. Obecně lze stresové faktory dělit na abiotické a biotické (Corpas *et al.*, 2011). Přehled abiotických a biotických stresových faktorů je znázorněn na Obr. 27. Snaha zamezit působení patogenu na rostlinu má význam především u zemědělsky významných plodin, u kterých vlivem patogenese dochází ke značným zemědělským a ekonomickým škodám (Lawlor a Cornic, 2002). Mechanismy odolnosti proti patogenu zahrnují avoidanci a toleranci. Avoidance je pasivní obrana zabraňující proniknutí patogenu do rostliny. Jedná se o geneticky podmíněné znaky (např. silná kutikula) vyskytující se i u rostlin, které nejsou aktuálně vystaveny stresu. Tolerance je aktivní obrana rostliny po vniknutí patogenu k plazmatické membráně buněk snažící se minimalizovat negativní dopad stresoru (Procházka *et al.*, 1998) Útok patogenu je rozpoznáván prostřednictvím elicitorů spouštějících obranné reakce rostliny (Dokládal *et al.*, 2012).



Obr. 27 Přehled abiotických a biotických stresových faktorů (upraveno podle Procházka *et al.*, 1998).

Patogenní organismy rodů *Phytophthora* a *Pythium* produkují zvláštní skupinu proteinogenních elicitorů označované jako tzv. elicitiny, které po navázání na receptor hostitelského organismu vyvolávají spuštění kaskády signálních drah obranných reakcí rostlinných buněk (Huet *et al.*, 1995, Bonnet *et al.*, 1996). Ta má mimo jiné za následek zvýšenou produkci NO a tvorbu RNS (Besson-Bard *et al.*, 2008). Bioaktivita RNS spočívá ve schopnosti kovalentně modifikovat proteiny a ovlivňovat tak jejich aktivitu. Jednou z nejvýznamnějších modifikací je S-nitrosylace proteinů (Osman *et al.*, 2001).

V předložené diplomové práci bylo v experimentální části cílem studium možného vlivu elicitinů na proces S-nitrosylace u genotypů *Solanum* spp. vedoucí ke zvýšení rezistence vůči patogenu *P. neolycopersici*. Pro studium byly zvoleny čtyři modelové genotypy: *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, lišící se rezistencí vůči tomuto patogenu. Dále byly vybrány dva elicitiny infestin (INF) a kryptogein (CRY) s rozdílným izoelektrickým bodem a také jejich mutanti. Po aplikaci CRY dochází k nárůstu hladiny NO, RSNO a S-nitrosylovaných proteinů (Astier *et al.*, 2012). Existuje také několik studií dokazujících, že u tabákových buněčných suspenzí vlivem CRY došlo k aktivaci obranné reakce zahrnující produkci ROS a RNS (Kulik *et al.*, 2015, Kieffer *et al.*, 2000). U tří studovaných genotypů *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* došlo vlivem elicitinů k významnému zvýšení hladin proteinových RSNO v listech u neinfikovaných vzorků ve srovnání s kontrolou. V případě genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom byla tato skutečnost zaznamenána pouze po aplikaci INF a jeho mutantních forem, naopak v případě aplikace CRY a mutantní formy CRY V84F došlo k mírnému snížení hladiny RSNO u neinfikovaných vzorků.

Významnou vlastností elicitinů je vylučování sterolů a mastných kyselin v hostitelských buňkách. U CRY je však afinita 27krát nižší pro mastné kyseliny v porovnání se steroly (Osman *et al.*, 2001). Jedna z používaných mutantních forem v předložené práci má v pozici 84 nahrazen valin za objemnější aminokyselinu fenylalanin. Z tohoto důvodu mutant CRY V84F není schopný zachytávat steroly, ale váže pouze mastné kyseliny (Dobeš *et al.*, 2004). Rezistence vyvolaná mutantem CRY V84F a CRY je však srovnatelná (Dokládál *et al.*, 2012). V případě získaných výsledků u genotypů *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* byla naměřena podobná hladina proteinových RSNO po aplikaci CRY i CRYV84F u neinfikovaných vzorků. U *S. lycopersicum* cv. Amateur byla hladina proteinových RSNO zvýšená pouze u CRY V84F. U infikovaných vzorků

P. neolyopersici byla hladina RSNO při porovnání CRY a CRY V84F rozdílná. U genotypů *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a *S. chmielewskii* došlo k mírnému snížení hladin RSNO vlivem CRY V84F. Naopak u genotypů *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. habrochaites* byla výrazně zvýšená působením tohoto mutantu. Z výsledků získaných z vyhodnocení signálů detekovaných S-nitrosylovaných proteinů byl zjištěn podobný trend ve změnách jejich hladiny vlivem aplikace CRY a CRY V84F u všech genotypů *Solanum* spp., a to u neinfikovaných i infikovaných vzorků.

Během patogenese je NO významnou signální molekulou, která reguluje imunitní odpovědi rostlin (Lindermayr *et al.*, 2005). Může posttranslačně modifikovat proteiny, které následně mění svoji stabilitu, lokalizaci, aktivitu nebo interakci s jinými proteiny (Corpas *et al.*, 2011). Vzhledem k výskytu za fyziologických i stresových podmínek a vlivu na řadu funkcí proteinů, lze považovat S-nitrosylaci za klíčovou posttranslační modifikaci. Jedná se o neenzymově katalyzovanou reakci umožňující reversibilní kovalentní vazbu-NO skupiny na -SH skupinu cysteinu cílového proteinu (Hoffmann *et al.*, 2003). Ve studii Astier *et al.* v roce 2012 bylo pomocí hmotnostní spektrometrie identifikováno 11 S-nitrosylovaných proteinů značených metodou BST v tabákových buňkách po indukci elicitem CRY. V předložené práci bylo zjištěno, že vlivem elicitinů dochází u všech genotypů *Solanum* spp. neinfikovaných vzorků k nárůstu hladiny S-nitrosylovaných proteinů a intenzita S-nitrosylace je závislá na typu elicitinu. Nejvýraznější nárůst S-nitrosylace proteinů ve srovnání s kontrolními vzorky byl sledován u genotypů *S. lycopersicum* cv. Amater po aplikaci CRY, CRY V84F a INF, u *S. chmielewskii* vlivem CRY, CRY K13V, CRY V84F a INFV13K/A14T. V případě infikovaných vzorků došlo nejen k nárůstu, ale také i k poklesu S-nitrosylace proteinů v závislosti na genotypu *Solanum* spp. a typu elicitinu. U všech genotypů vlivem aplikace elicitinů u neinfikovaných a infikovaných listů byl detekován nárůst intenzity u bandy, který odpovídal molekulové hmotnosti 55 kDa. S největší pravděpodobností by se mohlo jednat o velkou podjednotku enzymu ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasy/oxygenasy (Rubisco, EC 4.1.1.39), klíčového enzymu fotosyntézy. Několik studií potvrdilo, že Rubisco podléhá S-nitrosylaci (Lindermayr *et al.*, 2005; Fares *et al.*, 2011). Dále byly detekovány bandy o různé intenzitě signálu s přibližnou molekulovou hmotností 15 kDa, 17 kDa, 25 kDa a 33 kDa, kdy v případě genotypu *S. habrochaites* byl výskyt těchto bandů nejintenzivnější. Na základě informací získaných z literatury by se mohlo jednat o PR

proteiny. PR proteiny jsou antifungální proteiny, které jsou součástí přirozených obranných systémů živočichů a rostlin, schopné omezovat až inhibovat růst hub. Rostlinné PR proteiny lze klasifikovat do 5 tříd (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5) (Theis a Stahl, 2004). Molekulová hmotnost PR-1 proteinů se pohybuje v rozmezí 15-17 kDa a slouží jako markery pro studium indukované rezistence rostlin. Obsahují šest cysteinových zbytků, které zajišťují tvorbu disulfidických můstků (van Loon a van Strien, 1999). Byla prokázána antifungální aktivita proti řadě houbových patogenů – *Uromyces fabae*, *Phytophthora infestans*, *Erysiphe graminis* *Phytophthora parasitica* a *Perenospora tabaci* (Niedermaier *et al.*, 1995). Molekulová hmotnost bazických PR-2 proteinů je přibližně 33 kDa, kyselé PR-2 proteiny mají velikost okolo 36 kDa a PR-5 proteiny kolem 24-25 kDa (Tonon *et al.*, 2002). V práci Tichá, 2017 byl identifikován PR-3 protein bazická endochitinasá (EC 3.2.1.14) o velikosti 30 kDa jako cíl S-nitrosylace u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur infikovaného *P. infestans*. Bazická endochitinasá katalyzuje uvnitř buňky náhodné hydrolytické štěpení $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidických vazeb chitinu a chitodextrinů za vzniku volných oligomerů N-acetyl- β -D-glukosaminu (Theis a Stahl, 2004).

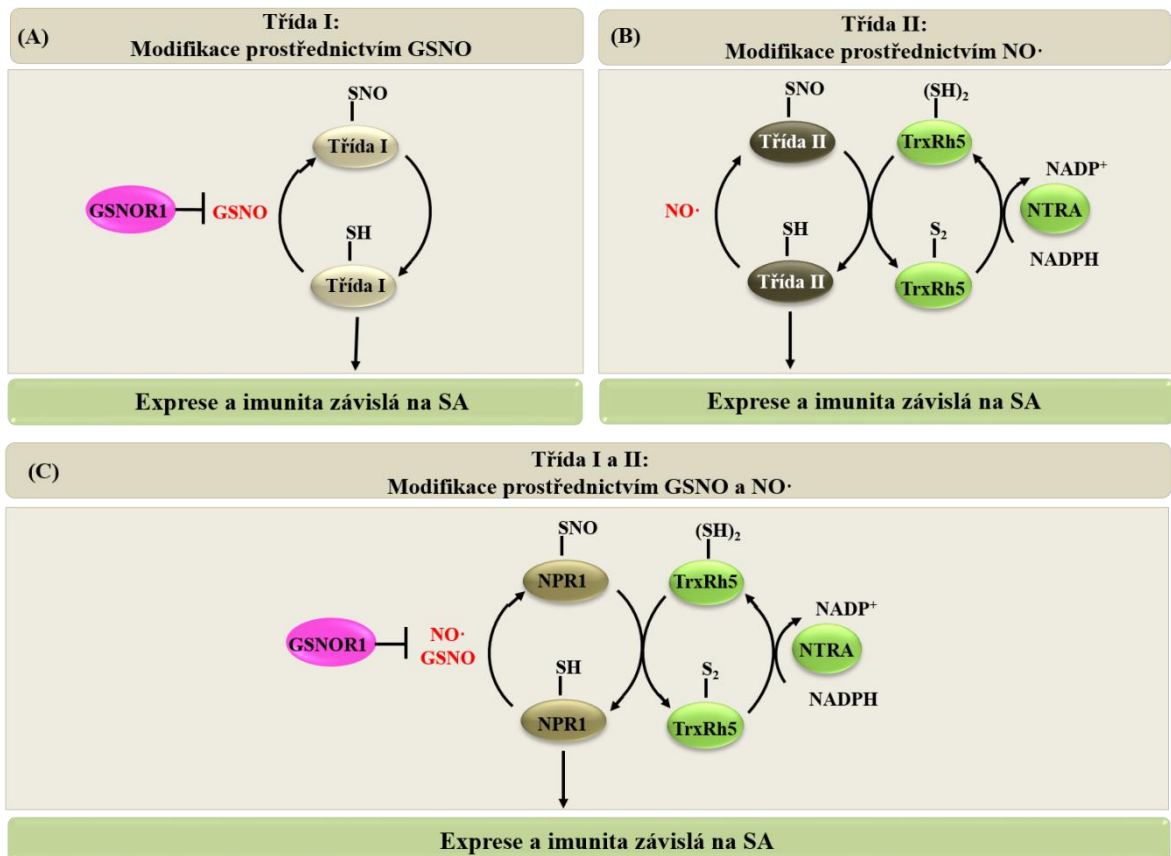
Hladina S-nitrosylovaných proteinů je regulována nejen biosyntézou NO, ale i enzymovými mechanismy (Feechan *et al.*, 2005). Mezi enzymy, které se účastní tzv. denitrosylace se řadí S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) a thioredoxinreduktasa (TrxR). Přítomnost GSNOR aktivity byla popsána například u kukuřice (Fliegmann a Sandermann, 1997), rýže (Dolferus *et al.*, 1997.), slunečnice (Chaki *et al.*, 2009) nebo rajčete (Kubienová *et al.*, 2013). Ve studii Feechan *et al.*, (2005) byla zjištěna souvislost mezi hladinou S-nitrosothiolů (RSNO) a aktivitou GSNOR. Ztráta funkce u AtGSNOR1 měla za následek zvyšování hladiny RSNO i S-nitrosylovaných proteinů u *Arabidopsis* (Feechan *et al.*, 2005). Protože NO i RSNO hrají významnou roli v regulaci imunitních odpovědí u rostlin, předpokládá se, že změny v hladinách RSNO vlivem aktivity GSNOR povedou u rostlin k modulaci obranných reakcí na patogeny (Malik *et al.*, 2011). Bylo také prokázáno, že ztráta funkce GSNOR1 zprostředkovávající denitrosylaci GSNO vede k ovlivnění funkce klíčových proteinů rostlinné imunity, a to NPR1 a SABP3, což způsobuje vyšší náchylnost vůči patogenům (Feechan *et al.*, 2005; Chaki *et al.*, 2009). Během patogenese dochází ke zvýšení koncentrace GSNO, které mohou vyvolat S-nitrosylaci NPR1 a jeho oligomerizaci v cytosolu (Kovacs *et al.*, 2015). V rámci získaných výsledků byla zjištěna přítomnost aktivity GSNOR u všech studovaných genotypů

Solanum spp. Po inokulaci patogenem *P. neolycopersici* došlo k poklesu GSNOR aktivity u rezistentního genotypu *S. habrochaites*. V případě středně rezistentních a náchylných genotypů *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, *S. chmielewskii* a *S. lycopersicum* cv. Amateur došlo k nárůstu GSNOR aktivity 48 h po inokulaci. Bylo také zjištěno, že u rezistentního genotypu *S. habrochaites* nebyl zaznamenán významný vliv elicitinů na aktivitu GSNOR. Nejintenzivnější nárůst aktivity GSNOR nastal u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur po aplikaci CRY V84F a INF V84F, u genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom po aplikaci elicitinů INF V13K/A14T, INF V84F a u genotypu *S. chmielewskii* vlivem CRY, INF V13K/A14T a INF V84F. Při studiu vlivu elicitinů v průběhu patogenese *P. neolycopersici* došlo k významným změnám aktivity GSNOR (snížení i zvýšení) v závislosti na studovaném genotypu a typu elicitinu. U genotypu *S. habrochaites* byla zaznamenána 2,5 krát vyšší GSNOR aktivita po aplikaci INF V13K a 3 krát vyšší aktivita po aplikaci INF V84F. Významné snížení aktivity enzymu bylo zjištěno u infikovaných vzorků po působení CRY V84F a INF u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. chmielewskii* po aplikaci INF V13K.

Další enzym podílející se na denitrosylaci je TrxR, který na rozdíl od GSNOR přímo reguluje hladinu S-nitrosylovaných proteinů. Několik studií potvrdilo přítomnost tohoto enzymu v rostlinných i živočišných buňkách a také poukázalo na pravděpodobnost, že denitrosyluje odlišné proteiny (Mitchell a Marletta, 2005 Benhar *et al.*, 2008, Zaffagnini *et al.*, 2013). Vlivem patogenese dochází k indukci rostlinné TrxR typu h (Tada *et al.*, 2008). V rámci výsledků předložené práce byla detekována aktivita TrxR v listech u všech studovaných genotypů *Solanum* spp. V případě patogenese *P. neolycopersici* u dvou genotypů *S. lycopersicum* cv Amateur a *S. chmielewskii* byl zaznamenán nárůst aktivity TrxR. U genotypů *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a *S. habrochaites* došlo naopak k poklesu aktivity TrxR. Při studiu možného vlivu elicitinů na aktivitu TrxR byly zaznamenány významné změny (snížení i zvýšení) v závislosti na studovaném genotypu a typu elicitinu. U citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur měla elicítace za následek zvýšení aktivity TrxR, přičemž u rezistentního genotypu *S. habrochaites* došlo vlivem elicitinů naopak ke snížení aktivity studovaného enzymu. Aktivita TrxR u infikovaných vzorků byla významně snížena po aplikaci INF a INF V84F u *S. lycopersicum* cv. Amateur a u *S. habrochaites* vlivem CRY. Změny aktivity TrxR

nebyly významné u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a *S. chmielewskii* v neinfikovaných i infikovaných listech.

Oba enzymy GSNOR a TrxR jsou schopny denitrosylace u rostlin a vzhledem k podobné subcelulární lokalizaci se nepředpokládá, že oba enzymy ovlivňují S-nitrosylaci stejných proteinů. Ve studii Kneeshaw *et al.*, 2014 bylo zjištěno, že aktivita TrxRh5 vedla k obnovení rezistence u mutantu *nox1*, avšak u mutantu *gsnor1* k němu nedocházelo. Na základě těchto výsledků byl vytvořen hypotetický model, kde enzym TrxR využívá jako substrát odlišné S-nitrosylované proteiny než enzym GSNOR v signálních drahách rostlinné imunity (Obr. 28). Tento předpoklad potvrzují i výsledky v předložené práci, kdy byla zjištěna rozdílná modulace aktivity enzymů TrxR a GSNOR.



Obr. 28 Model zapojení enzymů GSNOR a TrxR v denitrosylaci proteinů v obranných reakcích rostlin. (A) Třída I jsou proteiny S-nitrosylované prostřednictvím GSNO, jehož hladina je regulována prostřednictvím aktivity enzymu GSNOR. (B) S-nitrosylace proteinů třídy II probíhá pomocí NO· a denitrosylace enzymem TrxR. (C) Některé proteiny třídy I a třídy II mohou být regulované oběma systémy, jako například NPR1. Obě dráhy přispívají k expresi obranných genů a imunitní odpovědi závislé na kyselině salicylové (SA) (upraveno podle Kneeshaw *et al.*, 2014).

6 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium vlivu modifikace struktury elicitinů infestinu a kryptogeinu na proces S-nitrosylace u modelového systému *Solanum* spp. Z výsledků a diskuse práce vyplývají následující závěry:

- Aplikace elicitinů včetně jejich mutantů zvýšila hladinu proteinových S-nitrosothiolů a S-nitrosylovaných proteinů značených metodou biotin-switch v neinfikovaných vzorkách u všech studovaných genotypů *Solanum* spp. Pouze v případě genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom elicítace CRY a jeho mutantem CRY V84F indukovala mírné snížení hladiny S-nitrosothiolů.
- Během patogenese *P. neolycopersici* u studovaných genotypů byly zjištěny změny v hladinách S-nitrosothiolů i detekovaných S-nitrosylovaných proteinů o různé intenzitě v závislosti na typu elicitinu a druhu genotypu. Tyto výsledky potvrzují schopnost elicitinů ovlivnit obranné reakce *Solanum* spp.
- Oba enzymy GSNOR i TrxR jsou schopny denitrosylovat proteiny u modelového systému *Solanum* spp. Studované genotypy se lišily modulací aktivity těchto enzymů po aplikaci elicitinů a jejich mutantů i během patogenese, což poukazuje na možné zapojení obou enzymů v denitrosylaci odlišných S-nitrosylovaných proteinů v signálních drahách obranných odpovědí *Solanum* spp.

7 LITERATURA

- Akimoto C., Aoyagi H., Tanaka H. (1999): Endogenous elicitor-like effect of alginate on physiological activities of plant cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**, 429–436.
- 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.
- Angelova Z., Georgiev S., Roos W. (2006): Elicitation of plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, **20**, 72-83.
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Kubiś J. (2009): Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive responses to drought in cucumber. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**, 177-186.
- Astier J., Besson-Bard A., Lamotte O., Bertoldo J., Bourque A., Terenzi H., Wendehenne D. (2012): Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogeiin signalling in tobacco cells. *Biochemical Journal* **447**, 249-260.
- Astier, J., Jeandroz, S., Wendehenne, D. (2018): Nitric Oxide Synthase in plants: the surprise from algae. *Plant Science*. v tisku. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.12.008>
- Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Sandalio L.M., Valderrama R., Palma J.M., Lupianez J.A., del Río L.A. (1999): Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 36729-36733.
- Begara-Morales J.C., Loake G.J. (2016): Protein Denitrosylation in Plant Biology. In: *Gasotransmitters in Plants*. (Lamattina L., García-Mata C., eds.), Springer, 201-215.
- 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.
- Bellin D., Asai S., Delledonne M., Yoshioka H. (2013): Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 271-277.
- Benhar M., Forrester M.T., Hess D.T., Stamler J.S. (2008): Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* **320**, 1050-1054.
- Besson-Bard A., Griveau, S., Bedioui, F., Wendehenne, D. (2008): Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogeiin, an elicitor of defence responses. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3407-3414.
- Besson-Bard A., Gravot A., Richaud P., Auroy P., Duc C., Gaymard F., Taconnat L., Renou J.P., Pugin A., Wendehenne D. (2009): Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology* **149**, 1302-1315.
- Blein J.P., Thévenot P.C., Marion D., Ponchet M. (2002): From elicitors to lipid transfer proteins: a new insight in cell signaling involved in plant defense mechanisms. *Trends in plant science* **7**, 293-294.
- Boissy G., de La Fortelle E., Kahn R, Huet J.C., Bricogne G., Pernollet J.C, Brunie S. (1996): Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* **4**, 1429-1439.
- Boissy G., O'Donohue M., Gaudemer O., Perez V., Pernollet J., Brunie S. (1999): The 2.1 angstrom structure of an elicitor-ergosterol complex: a recent addition to the Sterol Carrier Protein family. *Protein Science* **8**, 1191-1199.
- Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J.P., Ricci P. (1996): Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 181-182.
- 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.
- Brown G.C. (2007): Nitric oxide and mitochondria. *Frontiers in Biosciences* **12**,1024-1033

- Corpas F.J., Carreras A., Esteban F.J., Chaki M., Valderrama R., del Río L. A., Barroso J.B. (2008): Localization of S-nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and S-nitrosoglutathione reductase activity in plants. *Methods in Enzymology* **437**, 561-574.
- Corpas F.J., Chaki M., Leterrier M., Barroso J.B. (2009): Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signaling and Behavior* **4**, 920-923.
- Corpas F.J., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J.M., Barroso J.B. (2011): Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science* **5**, 604-611.
- Cruickshank I.A.M., Perrin D.R. (1968): The isolation and partial characterization of monilicolin A, a polypeptide with phaseollin-inducing activity from *Monilinia Fructicola*. *Life Sciences* **7**, 449-458.
- Cunniff B., Snider G.W., Fredette N., Hondal R.J., Heintz N.H. (2013): A direct and continuous assay for the determination of thioredoxin reductase activity in cell lysates. *Analytical biochemistry* **443**, 34-40.
- Del Río L.A., Corpas F.J., Barroso J.B. (2004): Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**, 783-792.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Dietz K.J. (2011): Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants and Redox Signaling* **15**, 1129-1159.
- Dobeš P., Kmuníček J., Mikeš V., Damborský J. (2004): Binding of fatty acids to β -cryptogin: Quantitative structure-activity relationships and design of selective protein mutants. *Journal of Chemical Information and Modeling* **44**, 2126-2132
- Dokládál L., Obořil M., Stejskal K., Zdráhal Z., Ptáčková N., Chaloupková R., Damborský J., Kašparovský T., Jeandroz S., Žďárská M., Lochman J. (2012): Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2203-2215.
- Dolferus R., Osterman J.C., Peacock W.J., Dennis E.S. (1997): Cloning of the Arabidopsis and rice formaldehyde dehydrogenase genes: implications for the origin of plant ADH enzymes, *Genetics* **146**, 1131-1141.
- Dubreuil-Maurizi C., Poinssot B. (2012): Role of glutathione in plant signaling under biotic stress. *Plant Signaling and Behavior* **7**, 210-212.
- 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* **95**, 10328-10333.
- Fancy N.N., Bahlmann A.K., Loake G.J. (2016): Nitric oxide fiction in plant abiotic stress. *Plant, Cell and Environment* **40**, 462-472.
- 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.Q., Pallas J.A., Loake G.J. (2005): A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **102**, 8054-8059.
- Fliegmann J., Sandermann H. Jr. (1997): Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase cDNA: a novel plant gene of detoxification. *Plant Molecular Biology* **34**, 843-854.
- 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.
- Foresi N., Mayta M.L., Lodeyro A.F., Scuffi D., Correa-Aragunde N., García-Mata C., Casalongué C., Carrillo N., Lamattina L. (2015): Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide

- synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **5**, 806-821.
- Forrester M.T., Foster M.W., Benhar M., Stamler J.S. (2009): Detection of protein S-nitrosylation with biotin-switch technique. *Free Radical Biology and Medicine* **46**, 119-126.
- Förstermann U., Sessa W.C. (2012): Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* **33**, 829-837.
- Fu Z.Q., Dong X. (2013): Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review Plant Biology* **64**, 839-863.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006): Review: Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 711-724.
- Gooley P.R., Keniry M.A., Dimitrov R.A., Marsh D.E., Keizer D.W., Gayler K.R., Grant B.R. (1998): The NMR solution structure and characterization of pH dependent chemical shifts of the β -elicitin, cryptogein. *Journal of Biomolecular NMR* **12**, 523-534.
- 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 Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**, 262-268.
- Groppa M.D., Rosales E.P., Iannone M.F., Benavides M.P. (2008): Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry* **69**, 2609-2615.
- Guo F.Q., Okamoto M., Crawford N.M. (2003): Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal. *Science* **302**, 100-103.
- Guo F.Q., Crawford N.M. (2005): *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**, 3436-3450.
- Hahn M.G. (1996): Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 387-412.
- Harrison R. (2002): Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 774-797.
- Hoffmann V., Schimrigk S., Islamova S., Hellwig K., Lukas C., Brune N., Pohlau D., Przuntek H., Müller T. (2003): Efficacy and safety of repeated intrathecal triamcinolone acetonide application in progressive multiple sclerosis patients. *Journal of the Neurological Sciences* **211**, 81-84.
- Holmgren A. (2000): Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin system. *Antioxidants and Redox Signaling* **2**, 811-820.
- Huet J.C., Le Caer J.P., Nespoulous C., Pernollet J.C. (1995): The relationships between the toxicity and the primary and secondary structures of elicitor-like protein elicitors secreted by the phytopathogenic fungus *Pythium vexans*. *Molecular plant-microbe interactions* **8**, 302-310.
- Chaki M., Fernández-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.
- Iglesias-Baena I., Barranco-Medina S., Lázaro-Payo A., López-Jaramillo F.J., Sevilla F., Lázaro J.J. (2010): Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin. *Journal of Experimental Botany* **6**, 1509-1521.
- 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* **12**, PL1.
- Kamoun S., Young M., Förster H., Coffey M.D., Tyler B.M. (1994): Potential role of elicitors in the interaction between *Phytophthora* species and tobacco. *Applied and environmental microbiology*, **60**, 1593-1598.
- Kamoun S., van West P., de Jong A., de Groot K.E., Vleeshouwers V.G.A.A., Govers F. (1997): A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **10**, 13-20.

- Kamoun S, van West P, Vleeshouwers V.G.A.A., de Groot K.E, Govers F. (1998): Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell* **10**, 1413-1425.
- Kanzaki H., Saitoh H., Ito A., Fujiwara S., Kamoun S., Katoh S., Yoshioka H., Terauchi R. (2003): Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology* **4**, 383-391.
- Kavya R., Saluja R., Singh S., Dikshit M. (2006): Nitric oxide synthase regulation and diversity: Implications in Parkinson's disease. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **15**, 280-294.
- Kawamura Y., Hase S., Takenaka S., Kanayama Y., Yoshioka H., Kamoun S., Takahashi H. (2009): Jasmonic acid- and ethylene-mediated signalling pathways and induces resistance to bacterial wilt disease in tomato. *Journal of Phytopathology* **157**, 287-297.
- Keen N.T. (1975): Specific elicitors of plant phytoalexin production-determinant of race specificity in pathogens. *Science* **187**, 74-75.
- 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.
- Kieffer F., Lherminier J., Simon-Plas F., Nicole M., Paynot M., Elmayan T., Blein J.P. (2000): The fungal elicitor cryptogein induces cell wall modifications on tobacco cell suspension. *Journal of experimental botany* **51**, 1799-1811.
- Klepper L. A. (1975): Evolution of nitrogen oxide gases from herbicide treated plant tissues. *WSSA Abstracts* **184**, 70.
- Kneeshaw S., Gelineau S., Tada Y., Loake G.J., Spoel S.H. (2014): Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Molecules and Cells* **56**, 153-162.
- Koivusalo M., Baumann M., Uotila L. (1989): Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Letters* **257**, 105-109.
- Kone B.C., Kunciewicz T., Zhang W., Yu Z.Y. (2003): Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **285**, F178-F190.
- Kovacs I., Durner J., Lindermayr C. (2015): Crosstalk between nitric oxide and glutathione is required for NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1)-dependent defense signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **208**, 860-872.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tâche R., Luhová L., Barroso J.B., Petřivalský M. (2013): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosoglutathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889-902.
- Kulik A., Noirot E., Grandperret V., Bourque S., Fromentin J., Salloignon P., Truntzer C., Dobrowolska G., Simon-Plas F., Wendehenne D. (2015): Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogein signalling. *Plant, Cell and Environment* **38**, 331-348.
- Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl J.L., Bloom R.E., Bodde S., Jones J.D., Schroeder J.I. (2003): NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* **22**, 2623-2633.
- Kwon E., Feechan A., Yun B.W., Hwang B.H., Pallas J. A., Kang J.G, Loake G.J. (2012): AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*. *Planta* **3**, 887-900.
- 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 Oxide* **19**, 68-72.
- Lascombe M.B., Ponchet M., Venard P., Milat M.L., Blein J.P., Prangé T. (2002): The 1.45 Å resolution structure of the cryptogein-cholesterol complex: a close-up view of a sterol carrier protein (SCP) active site. *Biological Crystallography* **58**, 1442-1447.

- Leberre J.Y., Panabieres F., Ponchet M., Denoroy L., Bonnet P., Marais A., Ricci P. (1994): Occurrence of multiple forms of elicitors in *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**, 251-258.
- Lee U., Wie C., Fernandez B.O., Feelisch M., Vierling E. (2008): Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 786-802.
- Leitner M., Vandelle E., Gaupels F., Bellin D., Delledonne M. (2009): NO signals in the haze nitric oxide signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 451-458.
- 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.
- Malik S.M., Hussain A., Yun B.W., Spoel S.H., Loake G.J. (2011): GSNOR-mediated de-nitrosylation in the plant defence response. *Plant Science* **181**, 540-544.
- Martínez M.C., Achkor H., Persson B., Fernández M.R., Shafiqat J., Farrés J., Jörnvall H., Parés X. (1996): *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase - Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class P and liver class I alcohol dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry* **241**, 849-857.
- Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2004): S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovascular Research* **62**, 43-52.
- Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2007): Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovascular Research* **75**, 220-228.
- Mayer B., Klatt P., Werner E.R., Schmidt K. (1995): Kinetics and mechanism of tetrahydrobiopterin-induced oxidation of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 655-659.
- Mikes V., Milat M.L., Ponchet M., Panabières F., Ricci P., Blein J.P. (1998): Elicitors, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **245**, 133-139.
- Mitchell D.A., Marletta M.A. (2005): Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nature Chemical Biology* **1**, 154-158.
- 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.
- Moricová P., Luhová L., Lochman J., Kašparovský T., Petřivalský M. (2014): Elicitiny: klíčové molekuly interakcí rostlin a patogenů. *Chemické listy* **108**, 1133-1139.
- Nespoulous C., Huet J.C., Pernollet J.C. (1992): Structure-function relationships of α and β elicitors, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. *Planta* **186**, 551-557.
- Niederman T., Genetet I., Bruyere T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B., Mosinger E. (1995): Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. *Plant Physiology* **108**, 17-27.
- Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y.I., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C.H. (2012): Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell and Environment* **35**, 454-484
- Noritake T., Kawakita K., Doke N. (1996): Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology* **37**, 113-116.
- Osman H., Vauthrin S., Mikes V., Milat M.L., Panabières F., Marais A., Brunie S., Maume B., Ponchet M., Blein J.P. (2001): Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 2825-2834.
- Paige J.S., Xu G., Stancevic B., Jaffrey S.R. (2008): Nitrosothiol reactivity profiling identifies S-nitrosylated proteins with unexpected stability. *Chemistry and Biology* **15**, 1307-1316.
- Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klüsener B., Allen G.J., Grill E., Schroeder J.I. (2000): Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731-734.

- 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.
- Plešková V., Kašparovský T., Obořil M., Ptáčková N., Chaloupková R., Dokládál L., Damborský J., Lochman J. (2011): Elicitor membrane interaction is driven by a positive charge on the protein surface: Role of Lys13 residue in lipids loading and resistance induction. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**, 321-328.
- Ponchet M., Panabières F., Milat M.L., Mikes V., Montillet J.L., Suty L., Triantaphylides C., Tirillye Y., Blein J.P. (1999): Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**, 1020-1047.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998): *Fyziologie rostlin*. vydání 1., nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha, Česká republika, 488.
- Radman R., Saez T., Bucke Ch., Keshavarz T. (2003): Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **37**, 91-102.
- Ricci P., Bonnet P., Huet J.C., Sallantin M., Beauvais-Cante F., Bruneteau M., Billard V., Michel G., Pernollet J.C. (1989): Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European Journal of Biochemistry* **183**, 55-583.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W.M. (2002): Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* **53**, 103-110.
- Romero-Puertas M.C., 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., Jacquot J.P. (2005): The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* **38**, 1413-1421.
- Saito S., Yamamoto-Katou A., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K. (2006): Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiology* **47**, 689-697.
- Salgado I., Martínez M.C., Oliveira H.C., Frungillo L. (2013): Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate reductase and S-nitrosoglutathione reductase in stress related responses. *Brazilian Journal of Botany* **36**, 89-98.
- Saville B. (1958): A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* **83**, 670-672.
- Shi Y.F., Wang D., Wang C., Culler A.H., Kreiser M.A., Suresh J., Cohen J.D., Pan J., Baker B., Liu J.Z. (2015): Loss of GSNOR1 function leads to compromised auxin signaling and polar auxin transport. *Molecular Plant* **8**, 1350-1365.
- Singh R.J., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B. (1996): Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 18596-18603.
- Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A., Mullins M.E., Jaraki O., Michel T., Singel D.J., Loscalzo J. (1992): S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **89**, 444-448.
- Soderberg A., Sahaf B., Rosen A. (2000): Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: Presence in human plasma. *Cancer Research* **60**, 2281-2289.
- Stamler J.S., Toone E.J. (2002): The decomposition of thionitrites. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**, 779-785.
- Stöhr C., Ullrich W.R. (2002): Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2293-2303.
- Stoyanovsky D.A., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Anand D., Mandavia D.N., Gius D., Ivanova J., Pitt B., Billiar T.R., Kagan V.E. (2005): Thioredoxin and lipoic acid catalyze the denitrosation of low

- molecular weight and protein S-nitrosothiols. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 15815-15823.
- 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.
- Theis T., Stahl U. (2004): Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* **6**, 437-455.
- 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.
- Tichá T. (2017): *Úloha S-nitrosoglutathionreduktasy a S-nitrosace ve vývoji rostlin a odpovědi na stresové podmínky*. Dizertační práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Tonon, C., Guevara G., Oliva C., Daleo G. (2002): Isolation of a potato acidic 39 kDa β -1, 3-glucanase with antifungal activity against *Phytophthora infestans* and analysis of its expression in potato cultivars differing in their degrees of field resistance. *Journal of Phytopathology* **15**, 189-195.
- Torres M.A., Jones J.D., Dangl J.L. (2005): Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* **37**, 1130-1134.
- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E.I., Scherer G.F. (2006): Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology* **47**, 346-354.
- Tuteja N., Chandra M., Tuteja R., Misra M.K. (2004): Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **4**, 227-237.
- Van Loon L.C., Kammen A. (1970): Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**, 190-211.
- Wang Y.Q., Feechan A., Yun, B.W., Shafiei R., Hofmann A., Taylor P., Xue P., Yang, F.Q., Xie, Z.S., Pallas J.A., Chu C.C., Loake, G.J. (2009): S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 2131-2137.
- Wawer I., Bucholc M., Astier J., Anielska-Mazur A., Dahan J., Kulik A., Wyslouch-Cieszyńska A., Zareba-Koziół M., Krzywinska E., Dadlez M., Dobrowolska G., Wendehenne D. (2010): Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochemical Journal* **429**, 73-83.
- Wendehenne D., Gould K., Lamotte O., Durner J., Vandelle E., Lecourieux D., Courtois C., Barnavon L., Bentéjac M., Pugin A., (2005): NO signaling functions in the biotic and abiotic stress responses. *BMC Plant Biology*, **5**, 31-35.
- Wimalasekera R., Villar C., Begum T., Scherer G.F. (2011): COPPER AMINE OXIDASE1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Molecular Plant* **4**, 663-678.
- Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S. (1999): An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science* **4**, 128-129.
- Yamasaki H., Cohen M. F. (2006): NO signal in crossroads: polyamine induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends in Plant Science* **11**, 522-524.
- 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. (2012): S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264-268.
- Zaffagnini M., Morisse S., Bedhomme M., Marchand C.H., Festa M, Rouhier N., Lemaire S.D., Trost P. (2013): Mechanisms of nitrosylation and denitrosylation of cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 22777-22789.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA/BIS	Akrylamid- <i>N,N</i> -bisakrylamid
ABA	Kyselina abscisová
AEBSF	4-(2-aminoethyl)benzensulfonyl fluorid
ADH	Alkoholdehydrogenasa
AP	Alkalická fosfatasa
APS	Persíran amonný
Biotin-HPDP	(<i>N</i> -(6-(biotinamido)hexyl)-3'-(2'- -pyridyldithio)propionamid)
BSA	Hovězí sérový albumin
BST	Biotin-switch
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
CRMP-2	Collapsin Response Mediator Protein-2
CRY	Kryptogein
CuAO	Diaminoxidasa
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
FALDH	glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GDC	Glycindekarboxylasy
GSH	Glutathion redukovaný
GSSG	Glutathion oxidovaný
GSNHOH	S-hydroxylaminoglutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSONH ₂	Glutathion-sulfinamid
HAE	Hyperkyselá elicitiny
Hb	Hemoglobin
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- -ethansulfonová kyselina
HMGSH	S-(hydroxymethyl)glutathion
HR	Hypersenzitivní reakce/odpověď
INF	Infestin

JA	Kyselina jasmonová
MMTS	S-methylmethanthiosulfonát
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkinasa
NBT-BCIP	Nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem
NAD ⁺	Oxidovaný nikotinamidadeninukleotid
NADH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADP ⁺	Oxidovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát
NADPH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát
NH ₂ OH	Hydroxylamin
NH ₃	Amoniak
NH ₄ ⁺	Amonný kationt
Ni-NOR	Nitrit:NO reduktasa
NiR	Nitritreduktasa
NED	N-(1-naftyl)ethylendiamin
NPR1	Non-Expresser of Patogenesis-Related Genes 1
NO	Oxid dusnatý
NO ⁻	Nitroxylový anion
NO ⁺	Nitrosoniový kationt
NO ₂ ⁻	Dusitanový aniont
NO ₃ ⁻	Dusičnanový aniont
NOS	NO-synthasa
NiR	Nitrit:NO reduktasa
NR	Nitrátreduktasa
O ₂	Kyslík
O ₂ ⁻	Superoxidový anion
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PA	Kyselina fosfatidová
PAO	Polyaminoxidasa
PR	Pathogenesis related protein
Prx	Peroxiredoxin
PTM	Posttranslační modifikace
RBOHD	Respiratory burst oxidase homology D
RNS	Reaktivní formy dusíku

ROS	Reaktivní formy kyslíku
RSH	Thiol
RSNO	S-nitrosothiol(y)
SA	Salicylová kyselina
SABP3	SA-vazebný protein 3
SAR	Systémově získaná rezistence
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
TBS	Fyziologický roztok pufrovaný Tris
TEMED	N,N-tetramethylendiamin
TrxR	Thioredoxinreduktasa
Trx	Thioredoxin
TTBS	Tween v TBS
XOD	Xanthinoxidasa