

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Reaktivní formy dusíku v obranném
mechanismu rostlin**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Tereza Jendrišáková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Lenka Luhová, PhD.
Konzultant:	Mgr. Pavla Satková
Rok:	2015

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 30. 4. 2015

Bc. Tereza Jendrišáková

Ráda bych velmi poděkovala paní doc. RNDr. Lence Luhové, PhD. za příjemné a odborné vedení, cenné rady, poskytnutí velkého množství materiálů a konzultací potřebných k vypracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala především své konzultantce Mgr. Pavle Satkové za všestrannou pomoc, trpělivost a ochotu při vypracování experimentální části a Mgr. Tereze Tiché a Mgr. Lucii Kubienové, Ph.D. a všem zaměstnancům Katedry biochemie za vstřícný přístup během zpracování experimentální části.

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

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Tereza Jendrišáková
Název práce	Reaktivní formy dusíku v obranném mechanismu rostlin
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Oxid dusnatý (NO) je důležitá signální molekula, která se podílí na imunitní odpovědi u rostlin po napadení mikrobiálními patogeny. S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) je známá jako klíčový enzym v metabolismu NO. GSNOR, dříve popsána jako S-(hydroxymethyl)glutathiohydrogenasa, patří do rodiny alkoholdehydrogenas třídy III. Reguluje hladinu S-nitrosoglutathionu (GSNO) v buňce a tak nepřímo ovlivňuje celkové množství proteinových S-nitrosothiolů.

Elicitiny patří do skupiny apoplastických efektorů sekretovaných rodem *Phytophthora* a blízce s ní příbuzným rodem *Pythium* z řádu *Pythiales*. Cílem této práce bylo studovat možné zapojení GSNOR v obrané reakci rostlin aktivované po aplikaci elicitinů na modelovém systému buněčných suspenzí tabáku. Byl testován elicitin kryptogein z *P. cryptogea* a jeho mutantní formy L41F, V84F a L41F/V84F s různou schopností vyvolat produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a nekrózu buněk. S využitím specifických fluorescenčních sond byla detekována různá intenzita zvýšené produkce ROS a reaktivních forem dusíku (RNS) v závislosti na použité formě elicitinu a s tím spojená změna ve viabilitě a schopnosti vývoje buněčné suspenze. Významně upregulovaná exprese *NADPHoxidas*y 1 a 2 (*NtRBOHD 1* a 2) v případě aplikace kryptogeinu a jeho mutantní formy V84F koreluje s detekovanou intenzivní produkcí ROS. Byl prokázán jednoznačný vliv elicitinů na úroveň S-nitrosylace proteinů stanovené metodou biotin-switch. S výjimkou mutantní formy elicitinu L41F/V84F byl zaznamenán po aplikaci elicitinů pokles GSNOR aktivity. Na úrovni exprese GSNOR byla pozorována downregulace. Změny v aktivitě GSNOR korespondují s intenzitou S-nitrosylace proteinů. Upregulace vybraných genů zejména po aplikaci kryptogeinu a jeho mutantní formy V84F poukazuje na aktivaci etylén/jasmonové signální dráhy.

Klíčová slova	Elicitiny, kryptogein, kyselina jasmonová, etylén, oxid dusnatý, S-nitrosoglutathionreduktasa, <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi
Počet stran	106
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Bc. Tereza Jendrišáková
Title	Reactive nitrogen species in plant defence responses
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2015

Abstract

Nitric oxide (NO) is an important signalling molecule involved in the plant immune response to infection by microbial pathogens. S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) is known as a key enzyme in the metabolism of S-nitrosothiols. GSNOR, previously described as S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase belongs to the family of alcohol dehydrogenases class III. It regulates the level of S-nitrosogluthathione (GSNO) in the cell and thus indirectly affects the total amount of protein S-nitrosothiols.

Elicitins belongs to the group of apoplastic effectors secreted by oomycetes from *Phytophthora* genus and closely related *Pythium* genus from the *Pythiales* order. The aim of this work was to study the possible involvement of GSNOR in plant defence responses activated after elicitins application to a model system of tobacco cell suspension. Cryptogein from *P. cryptogea* and its mutant forms L41F, V84F and L41F/V84F were tested with their varying ability to induce production of reactive oxygen species (ROS) and the cell necrosis. Using specific fluorescent probes, different intensities of increasing production of ROS and RNS were detected, depending on the form of elicitin, associated with changes in the viability and development of tobacco cell. Significantly upregulated expression of *NADPHoxidase 1* and *2* (*NtRBOHD 1* and *2*) after application of cryptogein and its mutant forms V84F was detected, which correlates with the intensive production of ROS. Unambiguous effect of elicitins to the level of protein S-nitrosylation was demonstrated using biotin-switch method. Decreased GSNOR activity and down-regulation of GSNOR expression were observed after elicitins application, except for the mutant L41F/V84F. Changes in GSNOR activity corresponded with levels of protein S-nitrosylation. Up-regulation of selected genes after cryptogein and mutant form V84F application indicates an activation of ethylene/jasmonic acid signalling pathway.

Keywords	Elicitins, cryptogein, jasmonic acid, ethylene, nitric oxide, S-nitrosogluthathione reductase, <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi
Number of pages	106
Number of appendices	0
Language	Czech

CÍLE PRÁCE

I. V teoretické části bylo cílem diplomové práce vypracování literární rešerše zaměřené na nové poznatky mechanismu působení elicitorů, se zaměřením na elicitory, u rostlin. Byly zpracovány aktuální poznatky o úloze ROS a RNS v obranném mechanismu rostlin v průběhu patogenese.

II. V experimentální části bylo cílem stanovit vliv aplikace čtyř elicitorů (kryptogeinu, mutantů L41F, V84F a L41F/ V84F) na:

- životnost buněk *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi
- produkci ROS a RNS
- S-nitrosoglutathionreduktasovou aktivitu (testovat vliv inhibitoru N6022)
- hladinu nitrace a nitrosylace proteinů
- expresi vybraných enzymů metabolismu ROS a RNS; byly zvoleny geny *GSNOR* a *NADPHoxidas* 1 a 2 (*NtRBOHD 1* a 2)
- změny úrovně transkripce genů zapojených do signálních obranných drah u rostlin: jako zástupce jednotlivých signálních kaskád byly zvoleny následující geny: *PR1a* (*pathogenesis related1*, kyselá forma) a *PAL* (*phenylalanine ammonia lyase*) pro signální dráhu kyseliny salicylové, *AOS* (*allene oxide synthase*) a *MYC 2* (*JIN1*, transkripční faktor) pro signální dráhu kyseliny jasmonové a *End/Hel* (*endochitinasa/hevein-like*) pro signální dráhu etylénu.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	<i>Phytophthora</i> spp.	2
2.2	Interakce hostitelské rostliny s patogeny rodu <i>Phytophthora</i>	4
2.3	Signální dráhy kyseliny jasmonové, salicylové a etylénu	6
3	ELICITINY	8
3.1	Kryptogein	11
3.1.1	Mechanismus působení kryptogeinu po napadení hostitelské buňky patogenem <i>P. cryptogea</i>	12
3.1.2	Mutantní formy kryptogeinu	15
4	REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU	17
4.1	Reaktivní formy kyslíku v rostlinách	17
4.2	Reaktivní formy dusíku v rostlinách	19
4.2.1	Oxid dusnatý a jeho produkce	19
4.3	Enzym S-nitrosoglutathionreduktasa	22
4.3.1	Role S-nitrosoglutathionreduktasy v obranném mechanismu rostlin	23
4.4	Nitrace proteinů	24
4.5	S-nitrosylace proteinů	26
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST		
5	MATERIÁL A PŘÍSTROJE	32
5.1	Chemikálie	32
5.2	Přístroje a experimentální vybavení	33
5.3	Rostlinný materiál	33
5.3.1	Kultivace suspenzních kultur tabáku	33
6	METODY	35
6.1	Příprava buněčného materiálu k experimentu	35
6.2	Spektrofotometrické stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy	35
6.2.1	Extrakce a přečištění buněčného materiálu	35

6.2.2	Měření aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy	36
6.2.3	Měření délky optické dráhy	36
6.3	Stanovení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) pomocí fluorescenčních sond	36
6.4	Měření optické hustoty buněk	39
6.5	Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku	39
6.6	Stanovení proteinů metodou Bradfordové	39
6.7	SDS-PAGE	40
6.7.1	Příprava vzorku pro SDS-PAGE	41
6.8	Western-blot	41
6.9	Stanovení nitrosylovaných proteinů metodou Biotin-Switch	43
6.9.1	Afinitní purifikace	44
6.10	Izolace a purifikace RNA z buněčného materiálu	45
6.10.1	Měření koncentrace RNA po izolaci	46
6.11	Reverzní transkripce	46
6.12	Kvantitativní polymerázová reakce	47
6.13	Statistické vyhodnocení	48
7	VÝSLEDKY	49
7.1	Vliv elicitinů na životnost buněk tabáku <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi	49
7.2	Vliv elicitinů na optickou hustotu buněk tabáku <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi	51
7.3	Vliv elicitinů na produkci reaktivních forem kyslíku v rané fázi po aplikaci elicitinů	52
7.4	Vliv elicitinů na produkci reaktivních forem dusíku v rané fázi po aplikaci elicitinů	56
7.5	Vliv aplikace modulátorů na suspenzní kultury buněk <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi po aplikaci elicitinů	58
7.5.1	Vliv aplikace L-askorbátu na produkci reaktivních forem kyslíku v suspenzních kulturách tabáku	58
7.5.2	Vliv aplikace cPTIO na produkci reaktivních forem dusíku v suspenzních kulturách tabáku	59

7.6	Vliv elicitinů na aktivitu enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy v suspenzních kulturách buněk	60
7.6.1	Vliv inhibitoru N6022 na aktivitu enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy v suspenzních kulturách buněk	61
7.6.2	Expese enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy po aplikaci elicitinů	62
7.7	Western blot analýza změn hladiny S-nitrosoglutathionreduktasy po aplikaci elicitinů	62
7.8	Western blot analýza změn hladiny nitrace proteinů po aplikaci elicitinů v buněčných kulturách tabáku	64
7.9	Biotin-Switch analýza změn hladiny nitrosylace proteinů po aplikaci elicitinů v buněčných kulturách tabáku	66
7.10	Expese genů zapojených do signálních obranných drah u rostlin	68
8	DISKUZE	71
8.1	Vliv aplikace elicitinů na životnost a produkci reaktivních forem dusíku a kyslíku u buněčných suspenzí tabáku	71
8.2	Vliv aplikace elicitinů na intenzitu nitrace a S-nitrosylace proteinů	75
8.3	Vliv aplikace elicitinů na enzym S-nitrosoglutathionreduktasu	79
8.4	Vliv aplikace elicitinů na expresi vybraných genů	80
9	ZÁVĚR	83
	Seznam použité literatury	84
	Seznam použitých zkratk	95

TEORETICKÁ ČÁST

1 Úvod

Rostliny reagují na útoky patogenů aktivací řady obranných odpovědí, které omezují růst patogena v místě infekce. Tyto reakce jsou iniciovány pomocí rozpoznání signálních molekul, neboli elicitorů pocházejících z patogenů nebo poškozených rostlinných tkání (Kurusu *et al.*, 2013).

Elicitiny jsou proteinové elicitory o velikosti 10 kDa sekretované patogeny rodu *Phytophthora* a blízkce s ní příbuzným rodem *Pythium* z řádu *Pythiales* (Ricci *et al.*, 1989). Nejznámějším a nejvíce prostudovaným zástupcem je elicitin kryptogein pocházející z fytopatogenní oomycety *P. cryptogea* způsobující hypersenzitivní reakci a nekrózu rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum L. cv. Xanthi*). Pomocí řízené mutagenese a záměny aminokyselin byla připravena řada mutantních forem kryptogeinu umožňující studium mechanismu působení tohoto typu elicitinu. Zároveň bylo možno sledovat vlastnosti určující jejich biologickou aktivitu (Dokládal *et al.*, 2012).

Jednou z prvních událostí nastávajících při inkompatibilní interakci rostlina-patogen je rychlá produkce reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species). Byla potvrzena jejich významná signální úloha v rámci obranné odpovědi na biotický a abiotický stres a podíl na programované buněčné smrti. Za produkci apoplastických ROS při biotickém stresu odpovídají enzymy lokalizované v buněčné stěně a na plasmatické membráně, jako jsou peroxidasy či oxidasy (Lherminier *et al.*, 2009).

Neméně důležitou signální molekulou hrající významnou úlohu při ataku patogenů je v poslední době intenzivně studovaný oxid dusnatý (NO). Řadíme jej mezi reaktivní formy dusíku (RNS, reactive nitrogen species). Má velmi krátký poločas života (3-5 s) a svým působením zasahuje také do růstu a vývoje rostliny. Velmi snadno a rychle reaguje za vzniku stabilnějších sloučenin. Jako příklad lze uvést *S*-nitrosoglutahion (GSNO), který slouží jako zásobní a transportní molekula pro NO. GSNO je preferovaným substrátem enzymu *S*-nitrosoglutahionreduktasy *S*-(hydroxymethyl) glutathion : NAD⁺ oxidoreduktasa, EC: 1.1.1.284, GSNOR), který GSNO redukuje a tím se podílí na regulaci intracelulární hladiny NO v organismu (Gupta *et al.*, 2011). Na základě detekované přítomnosti enzymu GSNOR téměř ve všech pletivech rostlin a v živočišných tkáních lze předpokládat jeho úlohu v nitrosačním stresu, spojeném s *S*-nitrosylací proteinů.

V předložené diplomové práci je studován vliv elicitinu kryptogeinu a jeho mutantních forem na produkci ROS, RNS, na aktivitu a expresi enzymu GSNOR a aktivaci vybraných signálních obranných drah v suspenzních kulturách tabáku.

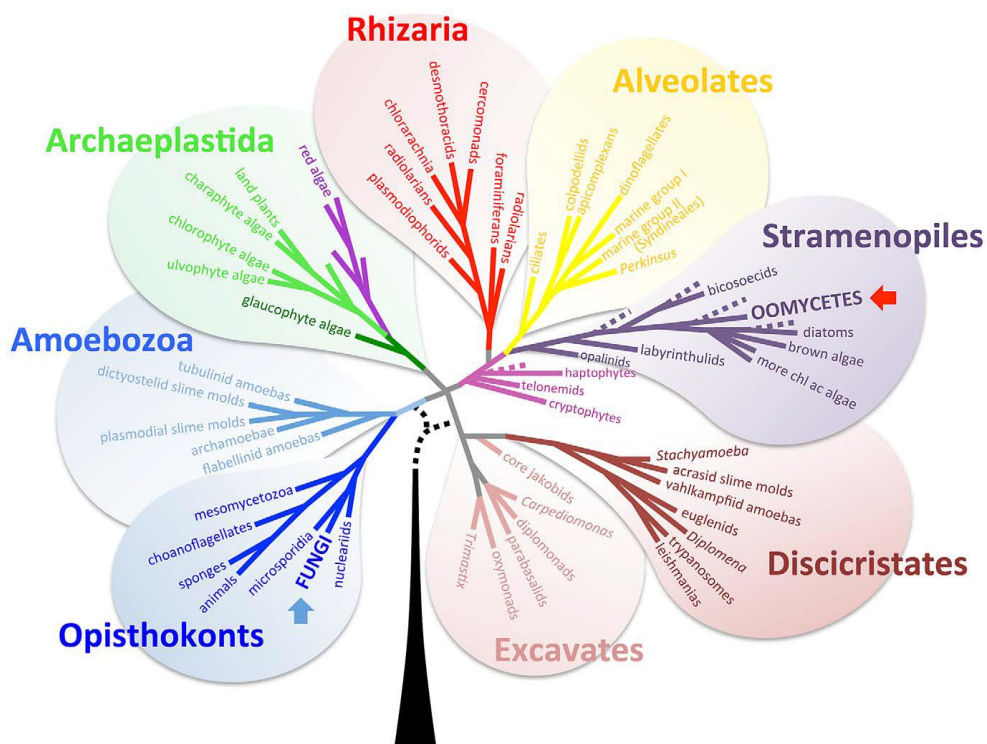
2 Současný stav řešené problematiky

2.1 *Phytophthora* spp.

Rod *Phytophthora* náleží do řádu Pythiales, třídy Oomycota (syn. Peronosporomycota), říše Chromista (syn. Straminipili). Přesto, že svou morfologií připomínají mikroskopické houby, zástupci této třídy jsou evolučně příbuzní některým zástupcům dříve řazených do říše rostlin. Tyto pravé plísně během evoluce ztratily sekundární endosymbiózou získané plastidy, nacházíme však podobnosti např. ve stavbě buněčné stěny a rozmnožování (Obr. 1) (Oswald *et al.*, 2014). Některé fylogenetické vlastnosti mají shodné s hnědými řasami a rozsivkami, které jsou také řazeny do říše Straminipili (Jiang *et al.*, 2006). Odlišnost oomycet od hub můžeme vidět ve stavbě buněčné stěny. Hlavními komponentami u oomycet jsou β -1,3- a β -1,6-glukany a celuloza (β -1,4-glukan), kdežto chitin, esenciální složka houbových buněčných stěn, je u oomycet zastoupen pouze okrajově. Oomycety také nejsou schopny syntetizovat steroly, protože postrádají skvalenepoxidasu (skvalen, NADPH:O₂ oxidoreduktasa (2,3 - epoxidace), EC 1.14.13.132) a enzymy nutné pro konverzi sterolových prekurzorů (Attard *et al.*, 2007).

Rod *Phytophthora* zahrnuje rozmanitou skupinu oomycet, které jsou považovány za významné rostlinné patogeny. Bylo popsáno, že rod *Phytophthora* obsahuje již přes 100 druhů rozdělených do deseti podtypů (Kroon *et al.*, 2012). 65 z nich je klasifikováno jako destruktivní fytopatogeny napadající širokou škálu dvouděložných rostlin. Dochází k infekci řady druhů kulturních rostlin včetně 40 druhů pěstovaných květin (Olson *et al.*, 2011). Mnohé z nich způsobují ekonomicky velmi závažná onemocnění jako je plíseň rajčat a brambor, hnilobu kořenů jahod či sóji nebo nemoc zvanou „náhlá smrt dubů“ (Sudden Oak Death) (Jones a Dangl, 2006; Meng *et al.*, 2014). Velká většina fungicidů se zaměřuje na metabolismus chitinu nebo syntézu sterolů, a proto nejsou účinné proti oomycetám (Attard *et al.*, 2007).

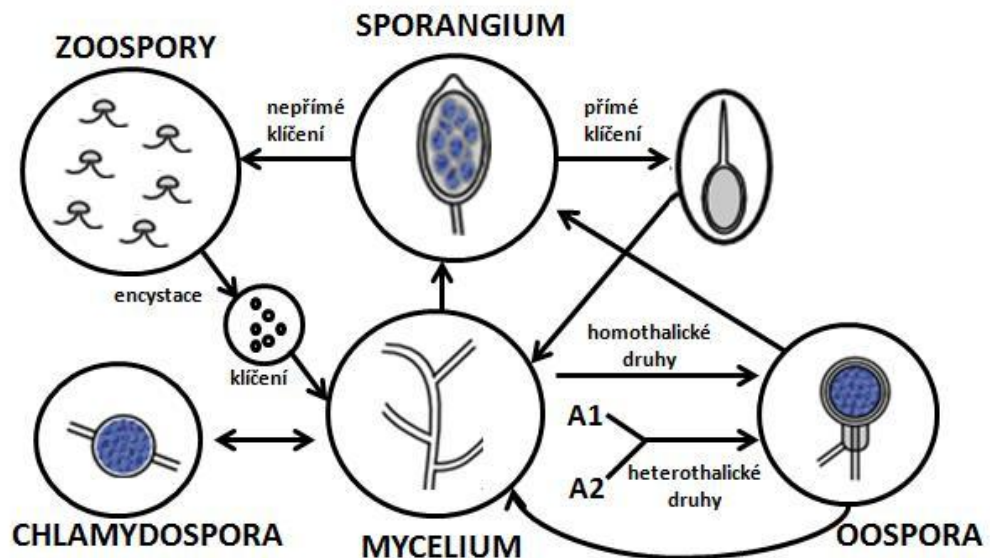
Rod *Phytophthora* řadíme mezi hemibiotrofní organismy, kteří během životního cyklu střídají biotrofní a nekrotrofní fázi, kdy dlouhou dobu nedochází k narušení buněčné stěny hostitelské rostliny.



Obr. 1: Strom života eukaryotických organismů. Rod *Phytophthora* náleží do superskupiny Straminipili (označeno červenou šipkou) (převzato z Lee *et al.*, 2012).

Phytophthora cryptogea patří spolu s *P. cinnamomi*, *P. nicotianae*, *P. palmivora* a *P. ramorum* k patogenům napadajícím velmi rozsáhlou skupinu hostitelů. Jako příklad můžeme uvést *Evolvulus glomeratus* (vyvinutec), *Senecio cineraria* (stařec hvězdicovitý), *Gerbera jamesonii* (gerbera), *Asparagus officinalis* (asparagus) či *Nicotiana tabacum* (tabák virginský). *Phytophthora infestans* způsobuje plísňové onemocnění brambor a rajčat na celém světě, fytopatogen *Phytophthora sojae* je zodpovědná za hnilobu kořene a stonku u sóji (Jiang *et al.*, 2005). Ve většině případů je hlavní příčinou choroby dlouhodobé oslabení rostliny, vodní stres nebo nedostatek živin. Tento patogen je velice odolný vůči výkyvům teploty, vydrží i průměrné mrazy. V častých případech je napadení rodu *Phytophthora* pro rostlinu letální.

Mnoho druhů rodu *Phytophthora* patří mezi půdní organismy, a proto je nejvíce typické napadení hostitelské rostliny skrze půdní kořenový systém. Běžným důsledkem takového napadení je také snížená absorpce vody pomocí kořenů (Tyler, 2002). Úspěšná infekce obvykle proběhne přes zoospory, které vlastní bičík a lépe se tak pohybují v hostitelské rostlině (Obr. 2). V *in vitro* studiích se zoospory akumulují ve specifických místech, typicky v zóně růstu a elongace, což jsou místa s nejvyšší nutriční hodnotou. Teplotní optimum pro šíření zoospor se pohybuje v rozmezí 23 - 28 °C.

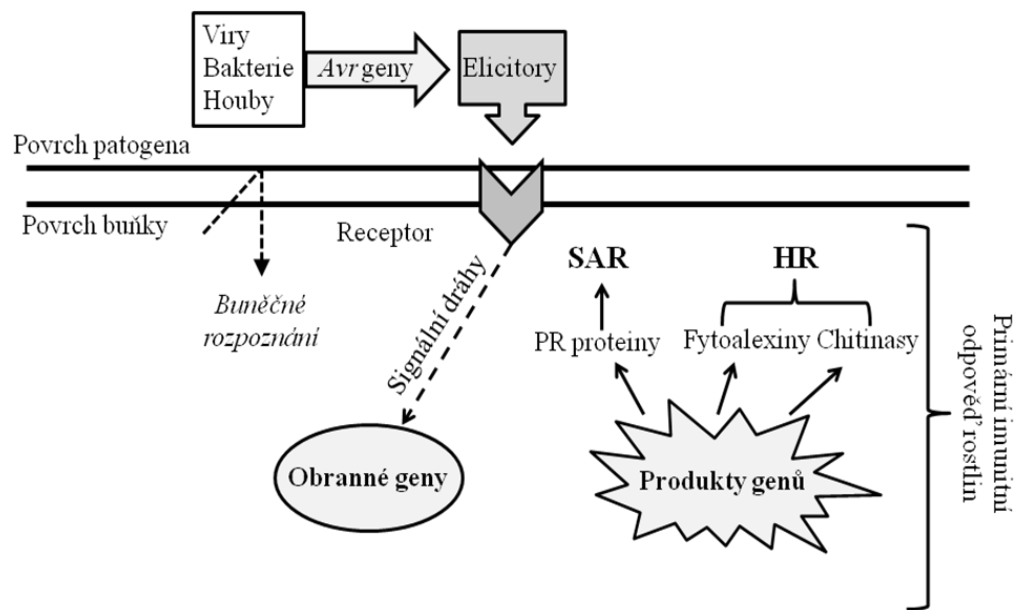


Obr. 2: Životní cyklus patogena rodu *Phytophthora*. Patogen se může množit sexuálně i asexuálně. U homothalických druhů se sexuální struktury objevují na jednom jedinci, heterothalické druhy mají vlákna určená k páření a označená A1 a A2. Dojde-li k páření, dávají vlákna A1 a A2 vzniknout diploidním oosporám. Patogen *P. parasitica* je dominantně heterothalický. Zoospory obsahující dva bičíky jsou produkovány sporangiem. Asexuální (mitotické) spory jsou chlamydospory (přepřacováno z Meng *et al.*, 2014).

Patogen *P. parasitica* infikuje také listy produkcí speciálního útvaru appressorium na špičce zárodečných trubic. Poté jsou vyvinuty invazivní hyfy, které obsahují několik diploidních jader na rozdíl od hub tvořících filamenta (Attard *et al.*, 2007). Dále se formují haustorium-podobné struktury a vznikají shluky sporangií na povrchu infikovaných rostlin. Pokud je stav životního prostředí nepříjemný pro růst sporangií, hyfy produkují chlamydospory (Meng *et al.*, 2014). Patogeny *P. citrophthora*, *P. capsici*, *P. litchii* či *P. palmivora* mohou napadnout rostlinu také přes plody.

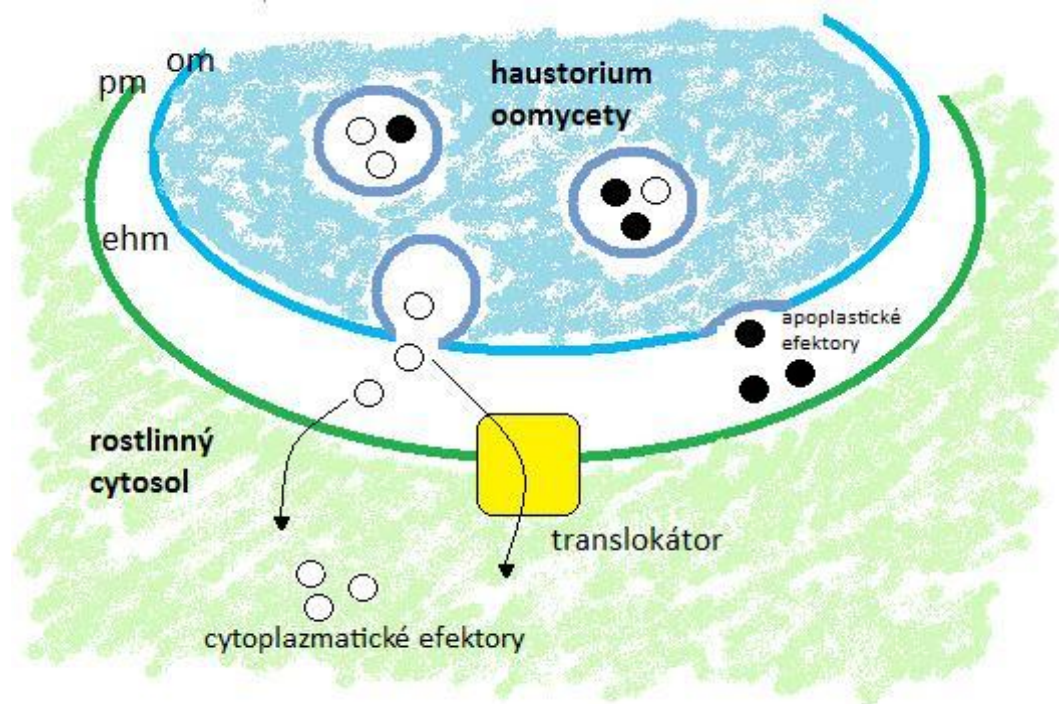
2.2 Interakce hostitelské rostliny s patogeny rodu *Phytophthora*

Při patogenezi obecně platí, že patogenní organismy musí čelit dvěma úrovním obranné linie rostlin. V první řadě rostlina rozpozná takzvané mikrobiální nebo patogen-asociované molekulární struktury (microbial-, pathogen-associated molecular patterns, MAMPs nebo PAMPs) skrze struktury rozpoznávající receptory (pattern recognition receptors, PRR). Tento mechanismus vede ke spuštění primární imunitní obranné reakce, která zahrnuje remodelaci buněčné stěny, ukládání kalosy (Thakur a Sohal, 2013), či akumulaci fytoalexinů a obranných proteinů (Obr. 3, Mejía-Teniente *et al.*, 2010).



Obr. 3: Primární imunitní odpověď rostlin v interakci patogen-rostlina. Rostlina obsahuje gen rezistence (označovaný „R“) a patogen gen avirulence (Avr). Jedná se o tzv. inkompatibilní reakci (převzato z Mejía-Teniente *et al.*, 2010).

Při napadení hostitelské buňky vytvářejí biotrofní patogeny intracelulární struktury haustoria, a to za účelem resorpce živin z hostitelského organismu. Tato haustoria se nacházejí v extrahaustoriální matrix, tedy v prostoru vytvářejícím se mezi patogenní a hostitelskou plazmatickou membránou, do kterého jsou primárně sekretovány potenciální efekty (Oswald *et al.*, 2014). Některé efekty oomycet působí v extracelulárním prostoru (apoplastické efekty), kde interferují s apoplastickými proteiny podílejícími se na obraně proti patogenům. Jedná se například o glukanasu nebo serinové a cysteinové proteasy. Apoplastické efekty sekretované rodem *Phytophthora* zahrnují inhibitory enzymů, toxiny, enzymy podílející se na degradaci buněčné stěny a také elicitory, 10 kDa peptidy. Jiné oomycetové efekty jsou translokovány přímo dovnitř hostitelských buněk (cytoplasmatické efekty), (Obr. 4) (Schornack *et al.*, 2009). Cytoplasmatické efekty obsahují cílovou HT sekvenci (HT - host-targeting), která umožňuje translokaci přes hostitelskou plazmatickou membránu. Tato sekvence je u všech efektorů sekretovaných rodem *Phytophthora* konzervovaná a je složena z aminokyselin Arg-X-Leu-Arg, kde X je jakékoliv residuum. Tato doména je funkčně ekvivalentní s doménou P-E-X-E-L prokázanou u patogenů *Plasmodium* spp.

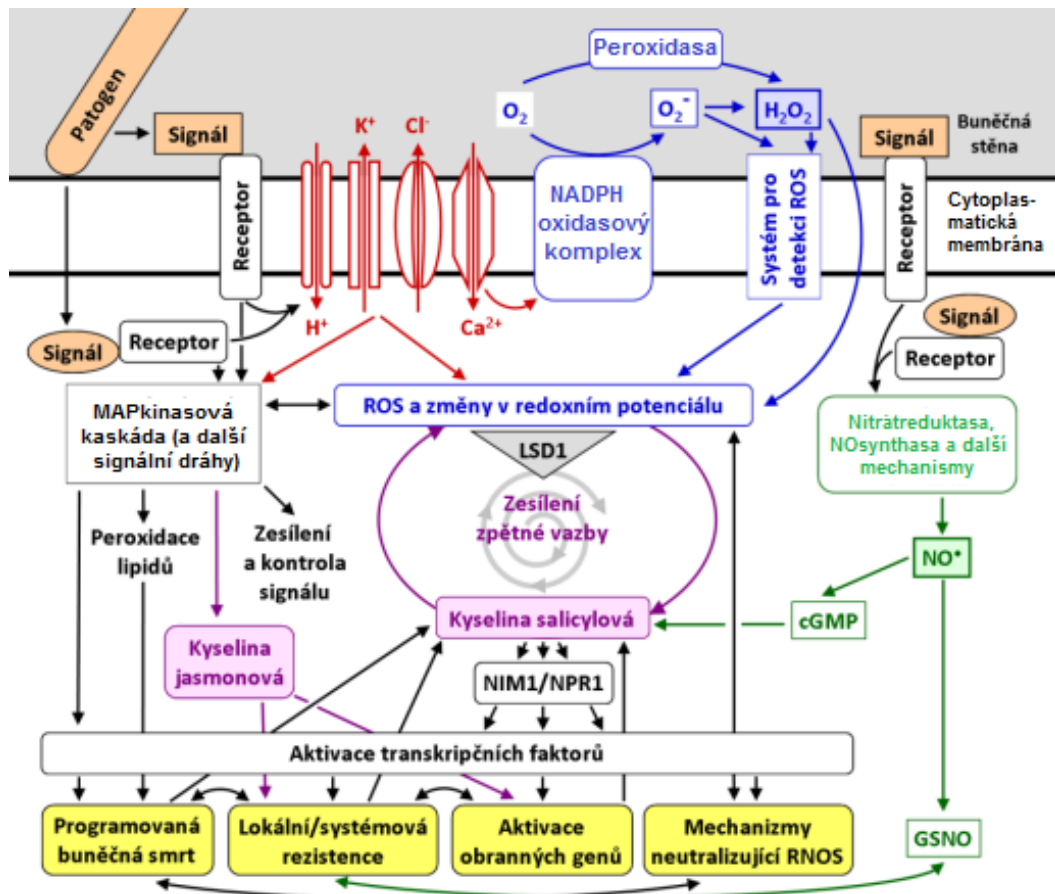


Obr. 4: Schématické znázornění sekrece efektorů pomocí haustoria. Apoplastické efekторы (černé kuličky) jsou sekretovány haustoriem do extracelulárního prostoru, kde interferují s apoplastickými obrannými molekulami rostliny. Cytoplasmatické efekторы jsou translokovány dovnitř hostitelské buňky, čímž překonávají dvě membrány; první membránu od oomycety, druhou pak od hostitelské buňky. Vysvětlivky: Ehm, extrahaustoriální matrix; om, oomycetová membrána; pm, plazmatická membrána (převzato z Schornack *et al.*, 2009).

2.3 Signální dráhy kyseliny jasmonové, salicylové a etylénu

Fytohormony jsou důležité organické nízkomolekulární molekuly zapojené do signální obranné odpovědi rostlin (Pieterse *et al.*, 1998). Jsou rozpoznávány pomocí receptorů a účinkují již při velmi nízkých koncentracích (10^{-6} až 10^{-9} M). Objevují se při sekundární imunitní odpovědi organismu („pomalé“), která nastává několik hodin až dní po útoku patogena (Obr. 5).

Kyselina salicylová (SA) představuje hlavní signál systémově získané odpovědi (SAR) u rostlin (Obr. 5). Je to signální molekula produkovaná při mechanickém poškození, nekróze, oxidačním stresu a také při napadení hemibiotrofními patogeny. Endogenní hladina SA prudce stoupá v místě napadení (hodiny) a poté i v celé rostlině (dny). Podílí se na hypersenzitivní reakci a expresi PR genů (Loon *et al.*, 2008). SA působí jako donor elektronů pro peroxidasový reakční cyklus, a tím inhibuje působení enzymu katalasy (H_2O_2 : H_2O_2 oxidoreduktasa, EC 1.11.1.6). Umožňuje tak působení H_2O_2 jako sekundárního posla (Durner a Klessig, 1996). Lokální buněčnou smrt mohou způsobovat také analoga SA, jako je 2,6-dichloroisoinikotinová kyselina nebo benzothiadiazol (Jabs, 1999).



Obr. 5: Sekundární obranné reakce u rostlin. Dochází k akumulaci fytohormonů (SA, JA, etylen), genové expresi, syntéze NPR1 proteinů, zesílení buněčné stěny a k indukci rezistence (přepřacováno z Jabs, 1999).

Kyselina jasmonová (JA) je signálním fytohormonem při napadení herbivorními živočichy a při mechanickém poškození rostliny. JA a její deriváty indukují expresi genů spojených s obrannými proteiny rostliny, jako jsou thioniny a inhibitory proteinas (Obr. 5, Pieterse *et al.*, 1998). Exogenní JA nebo její methylester mohou podporovat stárnutí a chovat se jako růstové regulátory. Enzym lipoxygenasa (LOX, EC 1.13.11.12), jejíž aktivita je asociována s inkompatibilitou zprostředkovanou geny *R-Avr*, se podílí na syntéze JA a jejích derivátů (Brash, 1999). Etylen je prvním známým endogenním regulátorem růstu rostlin. Jeho biosyntéza je indukována v případě napadení rostliny patogenem. V reakci na různé stresové odpovědi pletiva rostlin produkují etylen, který úzce spolupracuje s JA. Působí synergicky při simulaci elicitin-indukované *PR* genové expresi. Oba tyto fytohormony hrají klíčovou roli při indukované systémové odpovědi (ISR) (Pieterse *et al.*, 1998). Proti SA však etylen působí antagonisticky, jeho biosyntéza je regulována inhibičním fytohormonem kyselinou abscisovou (ABA).

3 Elicitiny

Elicitiny patří do skupiny apoplastických efektorů sekretovaných rodem *Phytophthora* a blízce s ní příbuzným rodem *Pythium* z řádu *Pythiales* (Panabières *et al.*, 1997). Elicitiny jsou malé globulární proteiny o molekulové hmotnosti přibližně 10 kDa. Jsou zodpovědné za nekompatibilní reakci patogen-hostitelská rostlina (Fefeú *et al.*, 1997). Struktura elicitinů je dána pěti α -helixy, jedním β -listem a objemnou ω -smyčkou. Hydrofóbní dutina se nachází v jádře proteinu spojeného s proteinovým povrchem pomocí tunelu (Gooley *et al.*, 1998; Plešková *et al.*, 2011). Vlásačka β -listu a ω -smyčka tvoří zobáku-podobnou strukturu (beak-like motif) hraničící s hydrofóbní kavitou, která je zodpovědná za zabudování sterolové molekuly do struktury (Mikes *et al.*, 1998). Významnou funkcí elicitinů je extracelulární přenos sterolů (v rostlinách konkrétně dehydroergosterolu) a jiných lipidů přes fosfolipidové dvojvrstvy membrán. Elicitiny jsou tak nepostradatelné pro oomycety rodu *Phytophthora*, které neumí steroly syntetizovat a získávají je z hostitelského organismu. Všechny tyto holoproteiny mají společnou, vysoce konzervovanou doménu složenou ze šesti cysteinových residuí tvořící tři disulfidické můstky, které celou strukturu zpevňují. Aminokyseliny tryptofan, arginin a histidin nejsou ve struktuře elicitinů přítomné (Ponchet *et al.*, 1999).

Kamoun *et al.*, 1993 a 1994 provedla kategorizaci elicitinů do tří skupin (Tabulka 1). Elicitiny třídy 1 obsahují striktně 98 aminokyselin a jsou rozděleny do dvou podtříd, α (1A) a β (1B) podle jejich isoelektrického bodu.

Tab. 1: Klasifikace a charakteristika elicitinů (přepřacováno z Kamoun *et al.*, 1993; Oswald *et al.*, 2014)

Třída	Počet aminokyselin	Charakteristika	pI
Třída 1: podtřída 1A (α)	98	Pozice 13: valin (lipofilní)	Kyselé
Třída 1: podtřída 1B (β)	98	Pozice 13: lysin (hydrofilní)	Zásaditý
Třída 2	cca 104		Velmi kyselé
Třída 3: Elicitinům-podobné	98 + cca 65-70 dalších na C-terminálním konci		Kyselé

Kyselé elicitory 1. třídy (pI 4-5) jsou značeny jako α a zásadité (pI 7,5-8,5) jsou značeny jako β . Tyto dvě podtřídy se liší počtem lysinových residuí, α -elicitory obsahují 2-4, β podtřída přesně 6 lysinových residuí. Elicitory se dále liší ve schopnosti aktivovat nekrózy, což je spojováno s povahou aminokyseliny nacházející se v pozici 13. β -elicitory s hydrofilním lysinem v pozici 13 vykazují vyšší nekrotickou aktivitu v porovnání s α -elicitory, které mají v pozici 13 hydrofóbní aminokyselinu valin (Plešková *et al.*, 2011). β -elicitory způsobují nekrózu v koncentracích v řádech nM, α -elicitory v řádech μ M. U tabákových buněk stimulovaných elicitem INF1, který je sekretovaný patogenem *Phytophthora infestans* (plíseň bramborová), byl detekován peroxydisulfát jako marker hypersenzitivní odpovědi u rostlin (Huitema *et al.*, 2005).

Méně časté elicitory 2. třídy s C-terminálním koncem jsou často hyperacidické s pI přibližně 3,5. Počet aminokyselin se pohybuje v rozmezí 103-104. Novou třetí skupinou jsou elicitinům-podobné (elicitin-like, ELL) sloučeniny nalezené v organismech *P. infestans*, *P. sojae*, *P. brassicae*, *P. ramorum* a *Pythium oligandrum* (Takenaka *et al.*, 2006, Oswald *et al.*, 2014). Jedná se o polypeptidy pevně ukotvené na povrchu buněk (Huitema *et al.*, 2005). Tyto ELL mají různě dlouhou délku C-terminální domény, obsahující převážně threonin, serin, alanin a prolin, které pomáhají k uchycení patogena na buněčnou stěnu hostitele (Jiang *et al.*, 2006).

Elicitory třídy 1 a 2 jsou vysoce zastoupeny v myceliu, nebo v infikovaném rostlinném pletivu (*P. sojae*). Naproti tomu elicitinům-podobné sloučeniny (elicitin-like) jsou primárně obsaženy v zoosporách. Příklady elicitinů produkovaných patogeny rodu *Phytophthora* a *Pythium* a jejich charakteristika jsou shrnuty v tabulkách 2a a 2b.

Tab. 2a: Elicitory produkované zástupci rodu *Pythium* (Kamoun *et al.*, 1997; Panabières *et al.*, 1997; Ponchet *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2006)

Oomyceta	Elicitin
<i>Pythium aphanidermatum</i>	PaNie ₂₁₃
<i>Pythium marsipium</i>	Marsipin
<i>Pythium oedochilum</i>	Oedochilin
<i>Pythium oligandrum</i>	Oligandrin, POD-1, POD-2, POS-1
<i>Pythium sylvaticum</i>	Sylvaticin
<i>Pythium ultimum</i>	PYU1
<i>Pythium vexans</i>	Vexiny-Vex1, Vex2

Tab. 2b: Elicitiny produkované zástupci rodu *Phytophthora* (Panabières *et al.*, 1997; Ponchet *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2006; Oswald *et al.*, 2014).

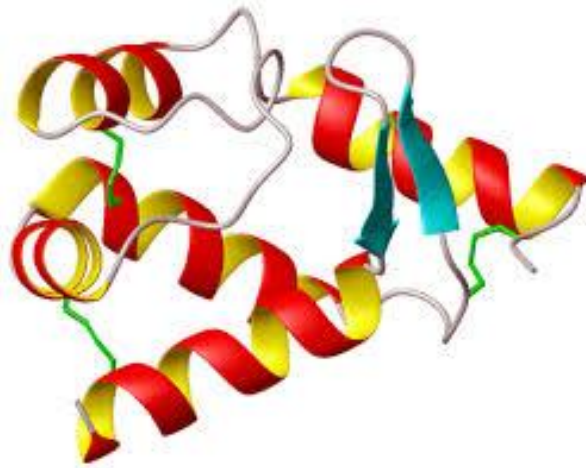
Oomyceta	Elicitin	Třída	pI
<i>Phytophthora alni</i>	AE1.1	1A	4,99
	AE1.2	1A	4,99
	BE1, 2	1B	8,22
	HAE1	2	3,95
<i>Phytophthora brassicae</i>	Bra1	3	4,09
<i>Phytophthora cambivora</i>	AE2	1A	4,99
	AE1.1	1A	4,99
<i>Phytophthora cactorum</i>	CAC-A (cacto)	1A	4
<i>Phytophthora capsici</i>	Capsicein	1A	3,5
	CAP-Pa28	1A	4,23
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	α -CIN	1A	4,4
	β -CIN	1B	8,9
	HAE1-cin	2	3,38
	HAE2-cin	2	3,54
<i>Phytophthora citrophthora</i>	Citro	1A	3,5
<i>Phytophthora cryptogea</i>	Cry- α	1A	3,6
	Cry- β	1B	9,8
	HAE1-cry	2	3,88
	HAE2-cry	2	3,34
<i>Phytophthora drechsleri</i>	Dre- α	1A	4,6
	Dre- β	1B	8,96
<i>Phytophthora fragariae</i>	AE1.1	1A	4,99
	AE2	1A	4,99
<i>Phytophthora infestans</i>	INF1	1A	4,22
	INF2a;b	3	3,37; 3,73
	INF4	1B	9,97
	INF5;6	3	4,09; 3,34
<i>Phytophthora hibernalis</i>	hib1=syringicin	1A	-
	hib2	1A	-
	hib3	1A	-
<i>Phytophthora megasperma</i>	α -megaspermin	1A	4
	β -megaspermin	1B	8,36
	γ -megaspermin	3	3,8
<i>Phytophthora nicotianae</i>	Parasiticein	1A	<4
<i>Phytophthora palmivora</i>	Palmivorein	1A	4,0
	310 - Parasiticein	1A	4,7
<i>Phytophthora parasitica</i>	PARA1	1A	4,22
<i>Phytophthora plurivora</i>	Citricolin=plurivorin	1A	4,2
<i>Phytophthora quercina</i>	Quercinin	1A	3,6
	Quercinin	1B	8,3
<i>Phytophthora ramorum</i>	ram- α 1, ram- α 2	1	-
<i>Phytophthora syringae</i>	Syringicin	1A	4,31
<i>Phytophthora sojae</i>	Sojein1	-	4,0
	Cojein2	-	6,16
	SOJA, SOJB	1A	3; 5

Metodou molekulární biologie lze tyto proteiny exprimovat přímo z genomické DNA. Geny kódující elicitory neobsahují introny. Díky této vlastnosti je možné v bakteriálních expresních systémech využít techniku řízené mutagenese za účelem záměny vybraných aminokyselin. Takto lze následně identifikovat a zároveň sledovat zásadní vlastnosti elicitorů určující jejich biologickou aktivitu (Kamoun *et al.*, 1993; Dokládal *et al.*, 2012).

3.1 Kryptogein

Kryptogein (Obr. 6) je proteinový elicitor sekretovaný oomycetou *Phytophthora cryptogea*. Obsahuje 98 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost stanovená metodou MALDI-MS má hodnotu 10 386 Da (Dokládal *et al.*, 2012). Elicitin kryptogein vyvolává obranné reakce v rostlinách tabáku vazbou přes specifická vysokoafinitní vazebná místa na plazmatické membráně buněk tabáku. Jedná se o receptory na bázi glykoproteinů s hodnotou K_d 2 nM (Bourque *et al.*, 1999; Svozilova *et al.*, 2011). Počet specifických vazebných míst byl stanoven na 136 pmol/mg z celkového počtu proteinů na plazmatické membráně. Vazba kryptogeinu s receptorem je reverzibilní a vysoce specifická. Tato vysoká specifita koreluje s nízkou koncentrací přirozeně se vyskytujícího kryptogeinu potřebného pro biologickou aktivitu *in vivo* (Svozilová *et al.*, 2011). Optimální pH pro vazbu kryptogeinu je kolem hodnoty 7. Vazba začíná slábnout při kyselém pH 6 a bazickém pH 7,5.

Mezi obranné reakce vyvolané působením kryptogeinu řadíme depolarizaci plazmatické membrány, oxidaci NADPH, fosforylaci proteinů nebo tvorbu reaktivních forem kyslíku jako jsou superoxid, peroxid vodíku, či hydroxylový radikál, které mohou mít za následek peroxidaci lipidů. Oxidace NADPH aktivuje pentosafosfátovou dráhu, což vede k poklesu obsahu pentosa-6-fosfátu a naopak akumulaci glyceraldehyd-3-fosfátu a fosfoenolpyruvátu (Pugin *et al.*, 1997). Dále byla prokázána po aplikaci elicitoru kryptogeinu indukce syntézy sekundárních metabolitů, patřících mezi sloučeniny produkované rostlinou při stresové situaci. Řadíme zde reakce vedoucí k tvorbě fytoalexinů (př. kapsidiol) nebo akumulaci etylénu (Chaudhuri *et al.*, 2009). Všechny tyto reakce jsou závislé na koncentraci vápenatých kationtů (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).



Obr. 6: Struktura β -kryptogeinu. Kryptogein je globulární protein skládající se 50 % ze struktury α -helix a dále struktury β -skládaného listu (Fefeu *et al.*, 1997; Dokládal *et al.*, 2012).

3.1.1 Mechanismus působení kryptogeinu po napadení hostitelské buňky patogenem *P. cryptogea*

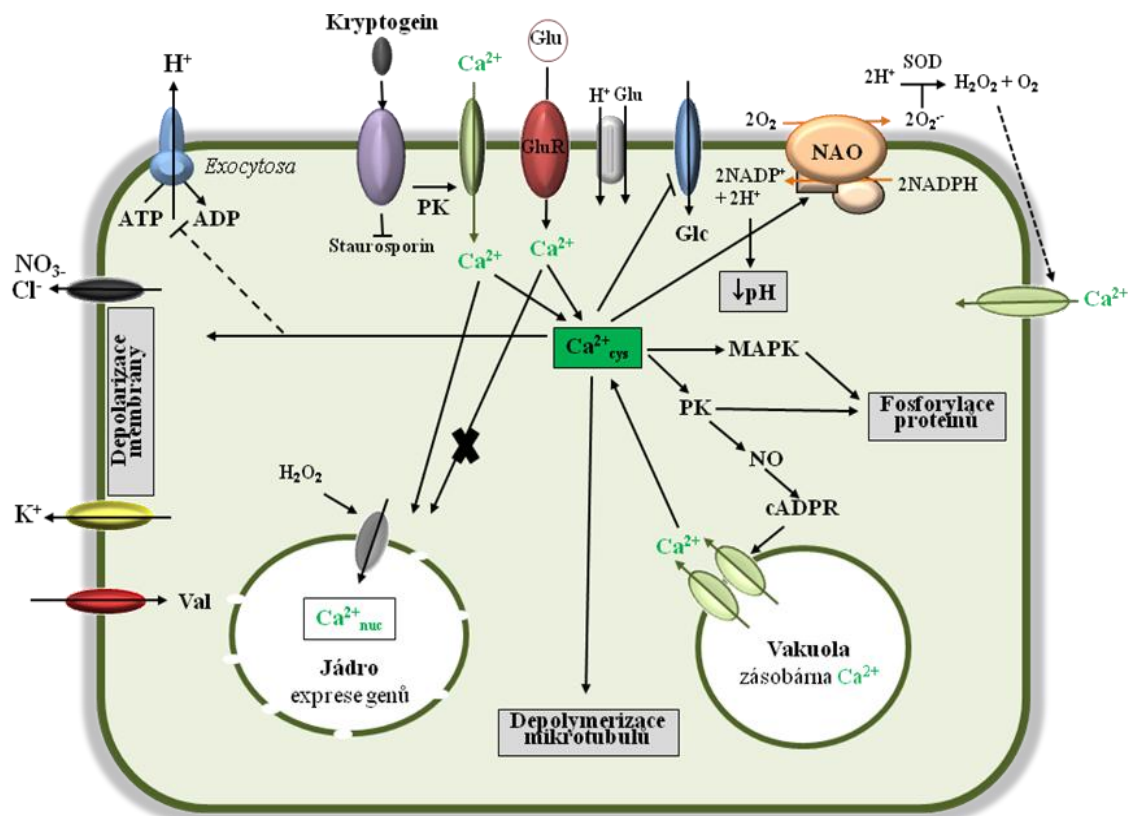
Působení patogenních organismů je významným a častým stresovým faktorem ohrožujícím život rostliny. Je známo, že rezistenci k mnoha chorobám mají rostliny kontrolovanou geneticky, a to geny rezistence (*R* geny) a geny avirulence (*Avr*), což je model gen-proti-genu (Flor, 1947). Florova hypotéza vychází z interakce specificky si odpovídajících genů rezistence a virulence. Ukázalo se, že rezistence je většinou dominantní (*R*) a náchylnost recesivní (*r*). Naopak avirulence je klasifikována jako dominantní (*Avr*) a virulence recesivní (*avr*) (Tab. 3). Bylo také postulováno, že produkty *R* genů slouží jako receptory pro *Avr* proteiny; model elicitor-receptor (Flor, 1971).

Tab. 3: Vztah jednoho genu rezistence a odpovídajícího genu virulence. Tři kombinace: *R-avr*, *r-Avr* a *r-avr* (produkty se nerozpoznají), mají za výsledek kompatibilní reakce a infekce je úspěšná (+). Pouze jedna kombinace, *R-Avr* (produkty se rozpoznají), má za výsledek inkompatibilní reakce a neobjeví se žádná infekce (rezistence).

Genotyp hostitele	Genotyp patogena	
	<i>Avr</i>	<i>avr</i>
<i>R</i>	rezistence	onemocnění
<i>r</i>	onemocnění	onemocnění

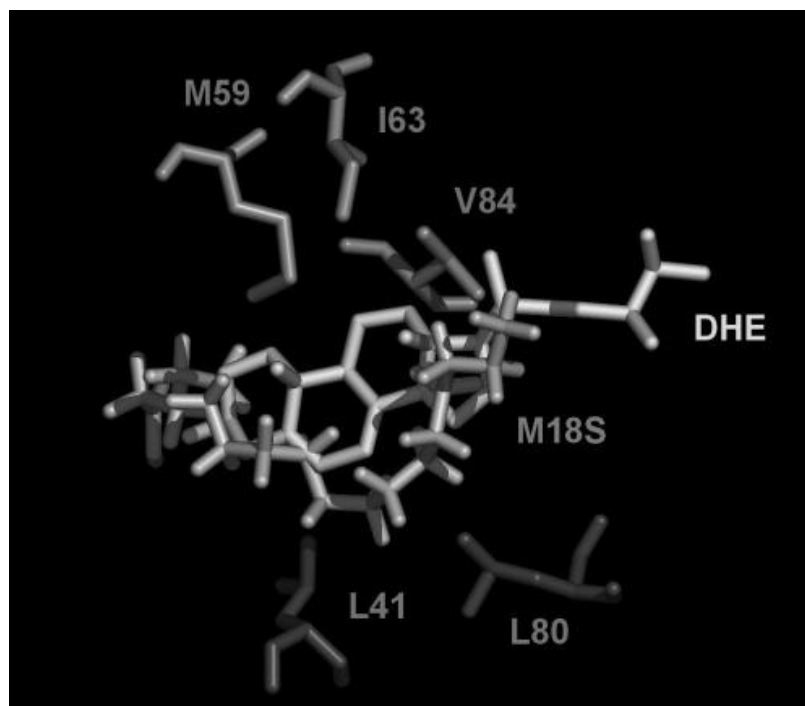
Tyto molekulární interakce vedou k inicializaci signální dráhy zodpovědné za aktivaci obranné odpovědi. Spuštění obranných mechanismů rostliny se děje také skrze obecné elicitory schopné aktivovat obranu v různých kultivarech a druzích rostlin. Jsou sekretovány patogeny nebo jsou uvolněny z buněčných stěn rostliny či patogena působením hydrolytických enzymů. Mohou to být například proteiny, glykoproteiny, glykany nebo lipidy (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Mezi obranné odpovědi rostliny řadíme SAR (systemic acquired resistance, systémově získaná rezistence), která vyžaduje signální molekulu salicylové kyseliny a je spojena s akumulací PR proteinů pojmenovaných jako SAR proteiny, dále hypersenzitivní reakci, která je definována jako smrt buněk hostitele v průběhu několika hodin po kontaktu s patogenem a spojená s programovanou buněčnou smrtí hostitelských buněk, syntézu kyseliny jasmonové a etylénu a produkci proteinů s enzymovou aktivitou (např. antioxidační aktivita).

Experimenty zaměřené na studium přesného mechanismu působení elicitinu kryptogeinu na rostlinnou buňku byly realizovány na vyizolovaných plazmatických membránách buněk tabáku. Působení kryptogeinu na rostlinu je zahájeno rozpoznáním elicitinu specifickými receptory na povrchu hostitelské rostliny, což jsou *N*-glykosylované heterodimerní proteiny s podjednotkami 162 a 59 kDa. Následně dochází k aktivaci proteinkinasy nebo inhibici proteinfosfatasy (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000). Během rané fáze obranné reakce se také často mění permeabilita cytoplazmatické membrány pro některé ionty, dochází k influxu Ca^{2+} a H^+ a efluxu K^+ a Cl^- . Zejména zvýšená koncentrace vápenatých iontů v cytosolu je považována za nezbytnou pro spuštění obranné reakce. Zvyšující se koncentrace extracelulárních vápenatých iontů, vede k aktivaci např. NADPH oxidasy a MAPkinasy, k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), dusíku (RNS), depolarizaci mikrotubulů či inhibici importu glukosy (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999; Garcia-Brugger *et al.*, 2006). V prvních pěti minutách po napadení hostitelského organismu patogenem bylo také pozorováno zvýšené množství fosforylovaných proteinů (Obr. 7). Elicitin kryptogein indukuje hypersenzitivní reakci a SAR v rostlinách.



Obr. 7: Schéma signální kaskády reakcí indukovaných kryptogeinem v buněčných kulturách tabáku. První krok zahrnuje reakci kryptogeinu s receptorem. Následuje kaskáda reakcí zahrnující aktivaci NADPH oxidasy (NAO, RBOHD), fosforylaci proteinů, či zvýšení přítok Ca²⁺ iontů. Dochází ke snížení pH v cytosolu. Staurosporin inhibuje fosforylaci proteinů. Vysvětlivky: proteinkinasa (PK), glutamátový receptor (GluR), glukosa (Glc), superoxididismutasa (SOD), mitogen-aktivovaná proteinkinasa (MAPK), cyklická adenosindifosforibosa (cADPR) (upraveno dle Garcia-Brugger *et al.*, 2006; Pugin *et al.*, 1997).

S aktivitou kryptogeinu úzce souvisí jeho schopnost vázat steroly a mastné kyseliny. Je známo, že po navázání sterolů nastanou konformační změny v ω -smyčce, což indukuje primární buněčné odpovědi jako je produkce ROS a změna pH (Osman *et al.*, 2001; Dokládál *et al.*, 2012). Mastné kyseliny tyto konformační změny v proteinové struktuře nezpůsobují, jsou více flexibilnější, což jim umožňuje zabudovat se do struktury aktivního místa dříve než rigidní steroly. Aminokyseliny vhodné pro substituce vedoucí k rozdílné vazbě sterolů a mastných kyselin ukazují obrázek 8 (Dobeš *et al.*, 2004).

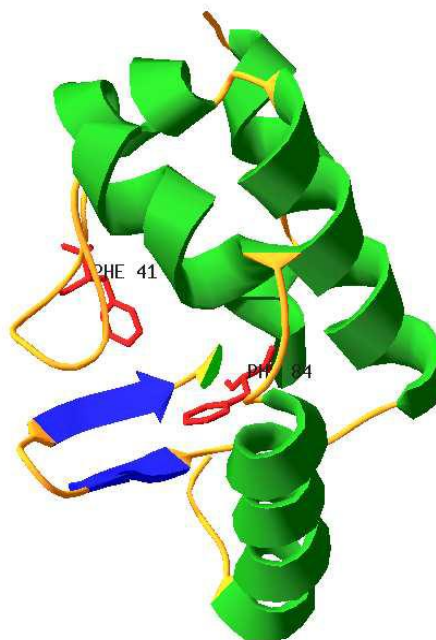


Obr. 8: Aminokyselinová residua odpovědná za vazbu kryptogeinu se steroly a mastnými kyselinami. Substitutece residuí M59, I63 a V84 objemným hydrofóbním fenylalaninem vede k preferenci kryptogeinu vázat mastné kyseliny. Stejná substitutece residuí L41 a L80 vede naopak k preferenci vazby sterolů. Oktadekanová kyselina (M18S) je zde ukázána jako modelová mastná kyselina, DHE je 7-dehydroergosterol (převzato z Dobeš et al., 2004)

3.1.2 Mutantní formy kryptogeinu

Za účelem studia a rozpoznání mechanismu vazby mezi kryptogeinem a steroly, případně mastnými kyselinami, byla záměnou aminokyselin na významných pozicích ve struktuře kryptogeinu zodpovědných právě za vazbu sterolů nebo mastných kyselin, vytvořena řada mutantních forem. Jedná se převážně o aminokyseliny nacházející se v hydrofóbní kavitě elicitinů. V experimentální části předložené diplomové práce jsme se zaměřili na studium tří mutantních forem kryptogeinu; L41F, V84F a dvojité mutantní formy L41F/V84F (Obr. 9). Všechny tyto mutanty včetně proteinu X24 (označován jako wild type), který se od přirozeného kryptogeinu liší signální sekvencí EAEA na N-konci, byly produkovány pomocí expresního systému kvasinky *P. pastoris*.

Mutantní forma L41F má v místě 41. aminokyseliny malý nepolární leucin zaměněný za objemný hydrofóbní fenylalanin. Tato mutace má za následek mnohem menší schopnost tohoto mutantu aktivovat v hostitelském organismu produkci ROS. Je také známo, že tato mutace vede ke snížení schopnosti interakce proteinu s vysokoafinitním vazebným místem na plazmatické membráně. Molekulová hmotnost 10 418 Da byla stanovena metodou MALDI MS (Dokládál *et al.*, 2012).



Obr. 9: Mutantní forma kryptogeinu obsahující mutaci L41F a V84F (převzato z Plešková, 2010).

U mutantu V84F byl v místě 84. aminokyseliny zaměněn valin za fenylalanin. Tato mutace snižuje schopnost vázat steroly. Molekulová hmotnost tohoto mutantu je 10 433 Da. Dvojitý mutant byl připraven kombinací předchozích dvou mutací. Molekulová hmotnost je 10 467 Da. Mutantní formy kryptogeinu L41F a L41F/V84F vykazují sníženou schopnost aktivovat produkci ROS hostitelským organismem a s tím spojenou tvorbu nekrotických efektů, což koreluje s velmi nízkou schopností aktivace syntézy seskviterpenoidního fytoalexinu kapsidiolu, který se akumuluje v nekrotických oblastech a je známou rostlinou obranou sloučeninou (Plešková *et al.*, 2011; Dokládál *et al.*, 2012). Srovnání vlastností kryptogeinu (wildtype) a jeho mutantních forem se nachází v tabulce 4.

Tab. 4: Srovnání vlastností kryptogeinu a jeho mutantních forem. Kapsidiol je sekundární metabolit sekretovaný buňkou po napadení patogenem. Vysvětlivky: DHE, 7-dehydroergosterol; NBD-PC, nitrobenzoxadiazolem-značený fosfatidylcholin, PM, plasmatická membrána (převzato z Dokládál *et al.*, 2012).

Mutace	DHE přenos	NBD-PC přenos	Vazba k PM	Syntéza ROS	Akumulace kapsidiolu	Indukce rezistence
Wild type	+++	+++	+++	+++	+++	+++
V84F	+	+++	+++	+++	++	+++
L41F	+++	++	+	+	-	+
L41F/V84F	+	+++	+	-	-	-

4 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU

4.1 Reaktivní formy kyslíku v rostlinách

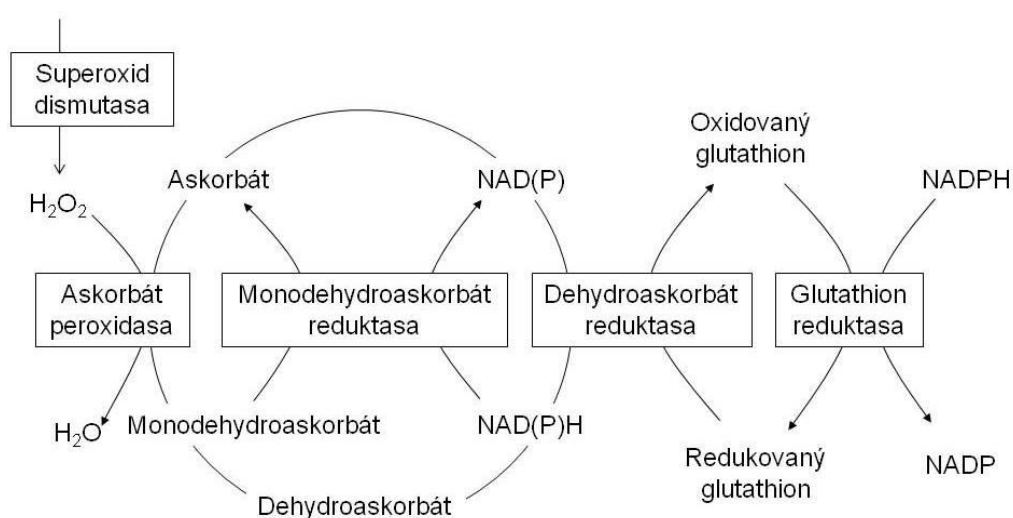
Reaktivní formy kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species) vznikají v rostlinách jako produkty aerobního metabolismu (Apel a Hirt, 2004). ROS mají v rostlinách významnou úlohu při signalizaci. Jsou zapojeny v řadě obranných mechanismů rostlin v rámci odpovědi na biotický i abiotický stres, např. se jedná o hypersenzitivní reakci (HR), zesílení buněčné stěny – lignifikaci aj. (Hirasawa *et al.*, 2005).

Jedná se o částečně redukované nebo aktivované sloučeniny molekulárního kyslíku jako je singletový kyslík, peroxid vodíku, hydroxylový radikál, perhydroxylový radikál a superoxidový anion-radikál pouze s jedním nepárovým elektronem (Mittler, 2002). ROS jsou produkovány v řadě rostlinných organel, jedná se o: 1. chloroplasty, kde jsou ROS generovány Mehlerovou reakcí, 2. mitochondrie, ve kterých probíhá elektronový transport, 3. peroxisomy, kde jsou ROS generovány v rámci fotorespirace a 4. glyoxysomy, což jsou specializované peroxisomy (Neill *et al.*, 2002).

Produkce a lokalizace vzniku ROS v rostlinách je velmi rozmanitá. Může se jednat o reakce přirozeného metabolismu, jako je např. elektronový transportní řetězec fotosyntetického aparátu či respirace. V reakci na stresové faktory je významným zdrojem ROS NADPHoxidasa (NAD(P)H:O₂ oxidoreduktasa, EC 1.6.3.1), katalyzující NADPH-dependentní redukci molekulárního kyslíku na superoxidový radikál. NADPHoxidasa (jiným názvem také RBOHD) je lokalizována v cytoplazmatické membráně a na její aktivaci se podílejí Ca²⁺ ionty. Vzniklý superoxidový radikál v apoplastu je činností superoxidodismutasy (superoxid:superoxid oxidoreduktasa, SOD, EC 1.15.1.1) oxidován na peroxid vodíku (H₂O₂), který může procházet přes plasmatickou membránu do buňky. V rostlinách se vyskytují tři formy SOD obsahující 1. zinek s mědí (Cu/Zn SOD), 2. železo (Fe-SOD) nebo 3. mangan (Mn-SOD). Další enzymy podílející se na vzniku peroxidu vodíku jsou peroxidasy (donor:H₂O₂ oxidoreduktasa, POX, EC 1.11.1.7) buněčné stěny, dále enzymy oxalát oxidoreduktasa (oxalát:O₂ oxidoreduktasa, EC 1.2.3.4), aminoxidasa (amine:O₂ oxidoreduktasa (obsahující měď), EC 1.4.3.6) a polyaminoxidasa (amin:O₂ oxidoreduktasa (obsahující flavin), EC 1.4.3.4) (Neill *et al.*, 2002). V přítomnosti Fe²⁺ nebo Cu²⁺ iontů přechází H₂O₂ nastává hydroxylový radikál ([•]OH), který je potenciálně nejsilnějším oxidantem vyskytujícím se v biologických systémech. Může iniciovat radikálové řetězové reakce s řadou organických molekul a přispívat tak k rozvoji oxidačního stresu, kdy dochází

k intenzivní reakci ROS s proteiny, lipidy a nukleovými kyselinami (Mittler, 2002). Peroxid vodíku má řadu významných funkcí v rámci obranných reakcí. Je zapojen v procesu zesílení buněčné stěny (lignifikace), peroxidaci lipidů a působí také jako regulační molekula pro expresi genů a aktivaci enzymů podílejících se na regulaci tvorby dalších signálních molekul (např. kyseliny salicylové, SA)

Účinná regulace za fyziologických podmínek vede k udržování trvale nízké hladiny ROS. Pro ochranu před toxickými účinky ROS si rostliny vytvořily systémy enzymového a neenzymového charakteru. Jedním z nejvýznamnějších neenzymových antioxidantů zapojených v obranné reakci rostlin je L-askorbát (vitamin C). Jeho přítomnost byla prokázána u většiny typů rostlinných buněk a organel a rovněž v apoplastu. Všechny rostliny mají schopnost *de novo* syntézy askorbátu, výchozí sloučeninou je glukosa. Mezi další účinné nízkomolekulární antioxidanty patří β -karoten, α -tokoferol (vitamin E) a redukovaný glutathion. Do antioxidantních enzymových složek řadíme již výše zmíněnou SOD, katalasu ($H_2O_2:H_2O_2$ oxidoreduktasa, CAT, EC 1.11.1.6) a enzymy askorbát-glutathionového cyklu. Ten zahrnuje enzymy askorbátperoxidasy (L-askorbát: H_2O_2 oxidoreduktasa, APX, EC 1.11.1.1), monodehydroaskorbátreduktasu (NADH:monodehydroaskorbát oxidoreduktasa, EC 1.6.5.4), dehydroaskorbátreduktasu (glutathion:dehydroaskorbát oxidoreduktasa, EC 1.8.5.1) a glutathionreduktasu (glutathion:NADP⁺ oxidoreduktasa, GR, EC 1.8.1.7) (Piterková *et al.*, 2005). Ve sledu reakcí dochází k přeměně H_2O_2 na vodu a k regeneraci askorbátu a glutathionu (Obr. 10).



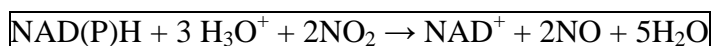
Obr. 10: Enzymy askorbát-glutathionového cyklu (přepřacováno z May *et al.*, 1998).

4.2 Reaktivní formy dusíku v rostlinách

Reaktivní formy dusíku (RNS) jsou sloučeniny odvozené od oxidu dusnatého (NO). Peroxydusitan (ONOO⁻) vzniká rychlou reakcí radikálů NO a superoxidového anion-radikálu, oxid dusičitý (\cdot NO₂) vznikající reakcí peroxydusitanu s hemovou peroxidasou, dusitan (NO₂⁻), nitroxylový anion (NO⁻), nebo nitrosoniový kation (NO⁺) vzniklý oxidací NO. V rostlinách bylo nalezeno sedm možných mechanismů syntézy RNS (Yu *et al.*, 2012).

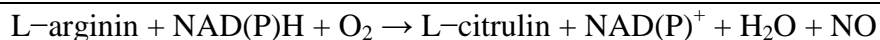
4.2.1 Oxid dusnatý a jeho produkce

Oxid dusnatý (NO), endogenně produkovaný všudypřítomný plynný radikál, je jednou z nejmenších a nejjednodušších známých biologicky aktivních molekul, která může díky své lipofilní povaze snadno procházet membránami a působit tak na okolní buňky. NO reaguje s mnoha látkami, např. se superoxidovým anionem za vzniku toxického produktu ONOO⁻, thiolovými skupinami, hemoglobinem nebo přechodnými kovy a nepřímo s DNA, proteiny a nenasycenými mastnými kyselinami v lipidech (Wink a Mitchell, 1998). Obecně se předpokládá, že NO své účinky na biomolekuly uplatňuje přímou modifikací residuí, která jsou důležitá pro strukturu proteinu, resp. pro aktivitu enzymu. NO vystupuje jako důležitá signální molekula v řadě procesů podílejících se na růstu a vývoji rostliny, klíčení, otevírání a zavírání stomatálních průduchů a také na aktivaci transkripce řady obranných genů. Jeho produkce vyžaduje cytosolární enzym nitrátoreduktasu (nitrit:NAD⁺oxidoreduktasa, NR, EC 1.7.1.1), který katalyzuje redukci dusičnanů na NO podle reakce:

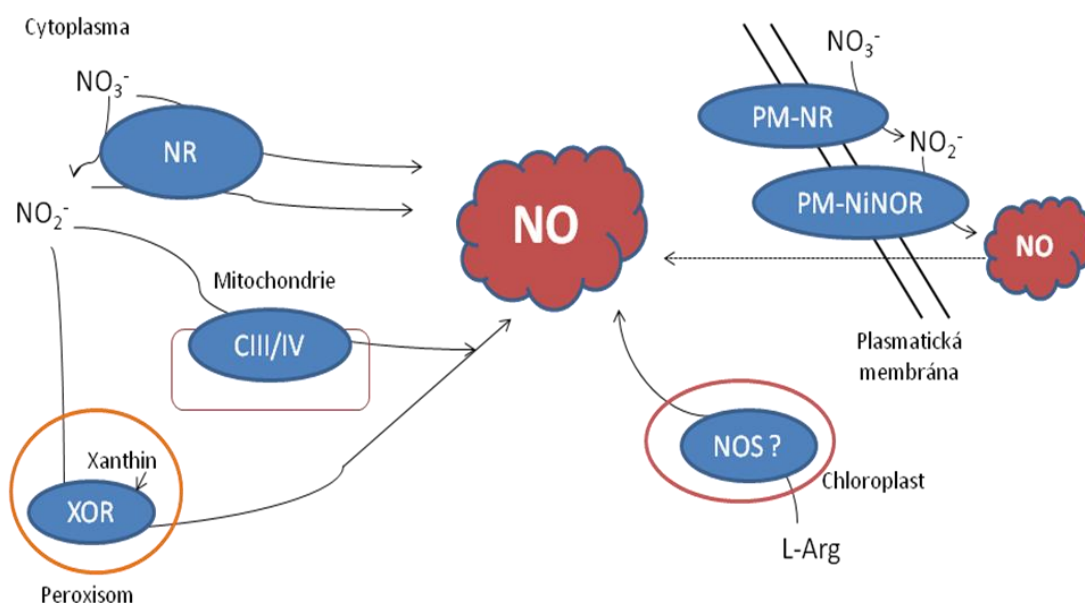


Účinnost této reakce je však velmi malá. Primárně enzym katalyzuje NAD(P)H-dependentní dvouelektronovou redukci dusičnanů na dusitan, za podmínek vyšší koncentrace dusičnanů a nižší koncentrace kyslíku v buňce (Yu *et al.*, 2012). Optimální pH reakce katalyzované kukuřičnou NR za vzniku NO bylo rovno 7. Enzym NR je lokalizován na plasmatické membráně a aktivita je regulována reverzibilní fosforylací (Yamasaki *et al.*, 2000). Dle několika studií je NO produkován enzymem podobným NO-synthase (NOS-like, dosud neidentifikováno), což je hlavní enzym produkce NO u živočichů (Corpas *et al.*, 2009; Kulik *et al.*, 2015). Živočišný enzym NOS (L-arginin, NADPH:O₂ oxidoreduktasa (produkující NO), EC 1.14.13.39) má tři velmi dobře

charakterizované isoformy (Yu *et al.*, 2012) a katalyzuje NADP-dependentní oxidaci L-argininu na L-citrulin a NO dle reakce (Knowles a Moncada, 1994):



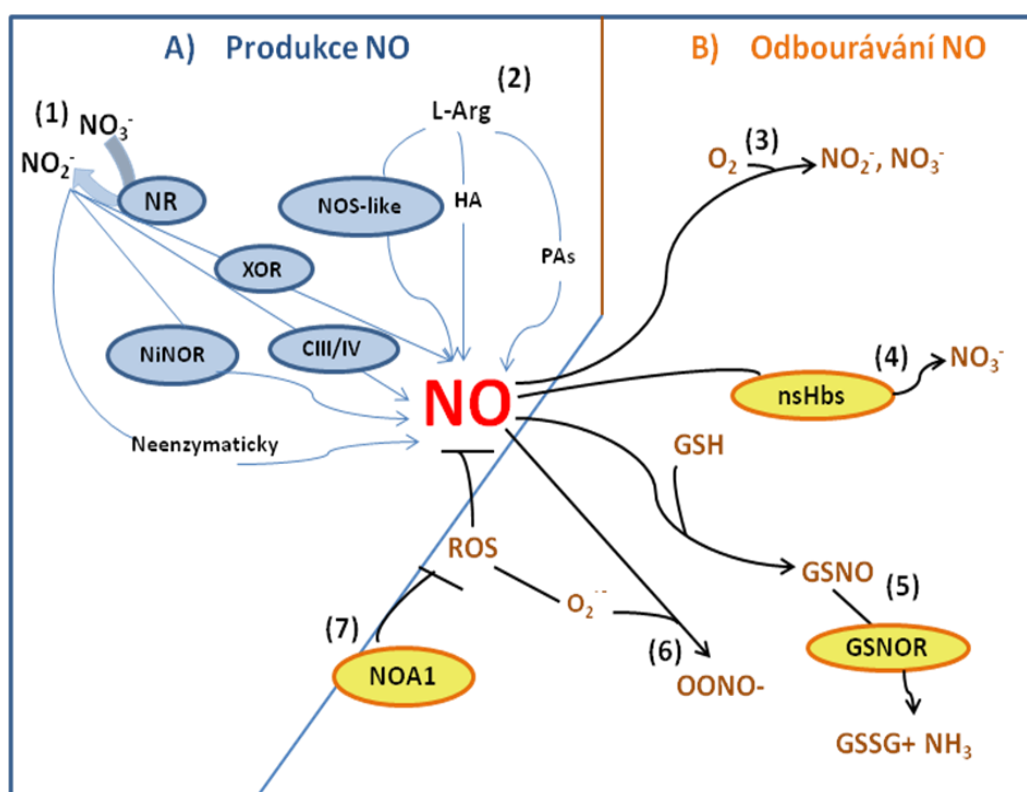
NOS funguje pouze za přítomnosti kyslíku (O_2) a Ca^{2+} /kalmodulinu. U rostlin však geny kódující tento enzym nebyly ještě prokázány. Na přítomnost enzymu u rostlin poukazuje fakt, že syntézu NO inhibují strukturní analogy L-argininu. Průlom v problematice rostlinné NOS nastal ve studii Foresi *et al.*, 2010, kde byla popsána NOS ze zelené řasy *Ostreococcus tauri*. Jedná se o nejmenší volně žijící eukaryotní organismus na světě. Porovnáním aminokyselinových sekvencí byla zjištěna 45% podobnost s lidskou indukibilní a neuronální NOS. Tento enzym vykazuje NOS aktivitu *in vitro* a má podobné vlastnosti jako živočišná NOS: K_M pro L-arginin ($12 \mu\text{M}$) a rychlosti oxidace NADPH (Yu *et al.*, 2014). Řada studií na modelových rostlinách *Arabidopsis* a tabáku poukazuje na význam enzymu NOS jako zdroje RNS v průběhu obranných odpovědí rostliny (Yu *et al.*, 2012). Zdroje produkce NO jsou shrnuty na obrázku 11.



Obr. 11: Zdroje oxidu dusnatého. NR primárně katalyzuje redukci dusičnanů na dusitany, dále indukuje přeměnu dusičnanů na NO. Aktivita nitrit-NOreduktasy (NiNOR) vázané na plasmatickou membránu byla objevena v kořenech. Její substrát dusitan je pravděpodobně produkován ve spřažené reakci s enzymem NiNOR. NO může být také generován redukcí dusitanu na vnitřní membráně mitochondrií přes cytochrom c oxidasu a/nebo reduktasu. Enzym xantinoxidoreduktasa (XOR) lokalizovaný v peroxisomech také redukuje dusitan na NO (přepřacováno z Yu *et al.*, 2014).

Zvýšená koncentrace polyaminů sperminu a spermidinu, což jsou nízkomolekulární alifatické sloučeniny, se podílí na uvolňování NO. Přesný mechanismus nebyl dosud objasněn. Polyaminy a exogenní NO mají antisenescenční účinky. Předpokládá se, že k produkci NO přes polyaminy dochází v rámci embryogeneze a vývoje kořenového systému a při nedostatku vody (Groppa *et al.*, 2008).

Při obranných reakcích má NO velký význam díky své schopnosti vázat se na hem, který je funkční skupinou např. katalasy a askorbátperoxidasy. Následná inhibice aktivity antioxidantních enzymů, snižuje schopnost organismu odstraňovat toxický H₂O₂ (Perazzolli *et al.*, 2006). NO je signálem pro aktivaci mechanismů vedoucích ke spuštění exprese obranných genů. NO může podléhat velkému množství reakcí, které vedou ke vzniku dalších RNS, a následně stabilnějších metabolitů, kterými jsou dusičnany. Radikál NO reaguje přímo s cílovými molekulami (Freschi, 2013). Na obrázku 12 jsou znázorněny reakce vzniku a odbourávání NO.



Obr. 12: Mechanismy produkce a odbourávání NO v rostlinách. A) Produkce NO: (1) vznik NO z dusitanů neenzymatickou i enzymatickou cestou zahrnující nitrátoreduktasu (NR), xantinoxidoreduktasu (XOR) a nitrit-NOreduktasu (NiNOR). (2) NO je také generován redukcí dusitanu přes cytochrom c oxidasu a/nebo reduktasu (CIII/IV), přes polyaminy (PAs) a hydroxylamin (HA). B) Odbourávání zahrnuje reakci (3) NO s molekulárním kyslíkem, (4) nesymbiotickými hemoglobiny (nsHbs), či s (5) redukováným glutationem (GSH) za vzniku glutathionu (GSNO), který je dále převeden enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR) na oxidovanou formu (GSSG). NO může také reagovat se superoxidem za vzniku peroxynitritu (OONO-) (6). Enzym NOA1 (NO-associated 1) nepřímě ovlivňuje hladinu NO v rostlinách (přepřacováno z Freschi, 2013).

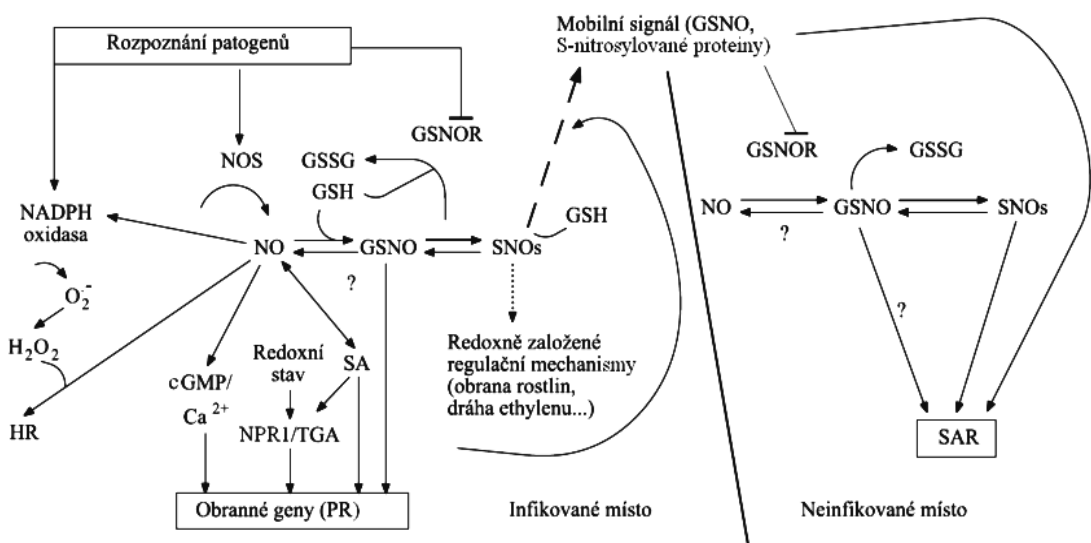
4.3 Enzym S-nitrosoglutathionreduktasa

Enzym S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR), systematickým názvem S-(hydroxymethyl)glutathion : NAD⁺ oxidoreduktasa, je homodimerní cytosolární enzym obsahující dvě 40 kDa podjednotky. Enzym se řadí do skupiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3, EC 1.1.1.1). Ve starší literatuře je uváděn název glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (GD-FALDH, GS-FDH), v původní klasifikaci byla GSNOR nesprávně označována jako EC 1.2.1.1. Od roku 2005 je enzym označován jako S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284). Obsahuje dva atomy zinku, do katalytické reakce je zapojen pouze jeden zinek, druhý má strukturní funkci. Katalytický zinek je v lidské ADH3 vázán Cys177 a Cys47, His69 a buď Glu70 nebo hydroxid v závislosti na specifickém komplexu (Sanghani *et al.*, 2002). U ADH1 je katalytický zinek vázán na vodu (nebo hydroxid) a residua His67, Cys174 a Cys46. Úloha těchto residuí v aktivním místě, kde se váží fyziologicky důležité substráty, byla zkoumána na základě krystalové struktury ternárního komplexu s S-(hydroxymethyl)glutathionem (HMGS) a NADH. Hlavní rozdílem mezi ADH I a ADH třídy III je residuum Glu70, které nevykazuje žádnou interakci s katalytickým atomem zinku ADH1 (Kubienová *et al.*, 2013).

Preferovaným substrátem enzymu GSNOR je S-nitrosoglutathion (GSNO) (Gaston *et al.*, 2003). Je největší zásobárnou NO v organismech. GSNO vzniká při O₂-dependentní reakci NO a redukováného glutathionu (GSH) (Malik *et al.*, 2011). GSH je jednou z hlavních nízkomolekulárních antioxidačních sloučenin v rostlinných buňkách a je zapojena v askorbát-glutathionovém cyklu, detoxifikaci xenobiotik a může také působit jako nezávislá signální molekula v redoxních dějích (Corpas *et al.*, 2008). Dalším významným substrátem GSNOR je S-(hydroxymethyl)glutathion (HMGS), který spontánně vzniká z glutathionu a formaldehydu. Tato reakce představuje klíčový krok při detoxifikaci organismu - odstranění exogenního i endogenního formaldehydu. Charakteristiky enzymu naznačují, že se jedná o bifunkční enzym, který katalyzuje dvě reakce. NAD⁺-dependentní oxidaci HMGS na S-formylglutathion a druhou, fyziologicky významnější reduktasovou, při níž redukcí GSNO za účasti NADH a vody vzniká oxidovaná forma glutathionu (GSSG) a amoniak (Jensen *et al.*, 1998). Za účinnou vazbu HMGS a GSNO jsou zodpovědná převážně residua Arg114, Thr46, Asp55, Glu57 a také katalytický zinek. Zda reakce proběhne dehydrogenasovým nebo reduktasovým mechanismem a jaký bude výsledný produkt, rozhoduje hladina GSH.

4.3.1 Role S-nitrosoglutathionreduktasy v obranném mechanismu rostlin

Enzym GSNOR je intenzivně studován v mnoha rostlinných organismech. Byla prokázána významná role GSNOR v rámci obranných mechanismů při patogenezí např. u slunečnice roční (*Helianthus annuus*) (Obr. 13; Rusterucci *et al.*, 2007; Chaki *et al.*, 2009), při vývoji rostliny např. u rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*) (Leterrier *et al.*, 2011; Kubienová *et al.*, 2013), při působení abiotických stresových faktorů u hrachu setého (*Pisum sativum*) a lociky (*Lactuca spp.*) (Díaz *et al.*, 2003; Corpas *et al.*, 2008; Wünsche *et al.*, 2011; Chaki *et al.*, 2011; Leterrier *et al.*, 2011) a dále při ochraně buňky proti působení nitrosačního stresu např. u kukuřice seté (*Zea mays*), či tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) (Sakamoto *et al.*, 2002). U buněčných suspenzních linií huseničku (*Arabidopsis*) overexprimujících GSNOR byla stanovena 13x vyšší aktivita ve srovnání s divokým typem (WT) a 28x vyšší aktivita oproti liniím s *antisense*-GSNOR. U linií s *antisense*-GSNOR byla stanovena o 50 % nižší aktivita GSNOR porovnáním s WT (Frunghillo *et al.*, 2013).

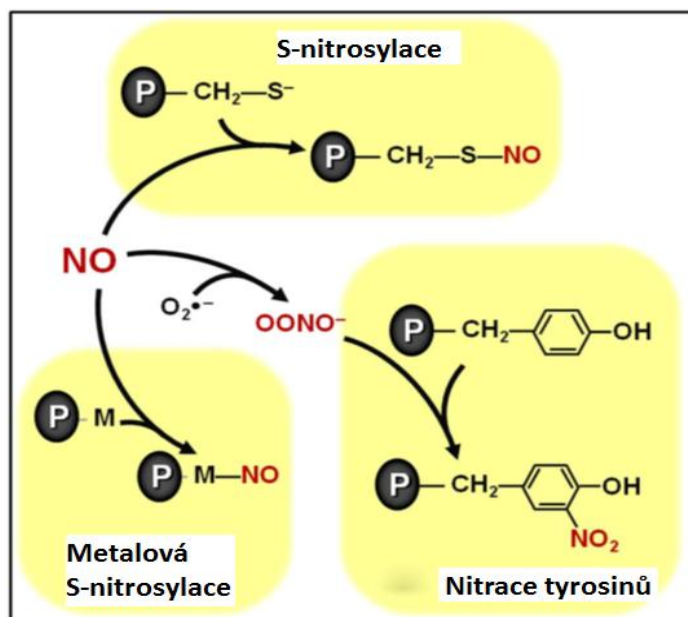


Obr. 13: Model úlohy S-nitrosoglutathionreduktasy v obranné reakci rostlin v místě infekce patogenem a systémově získané rezistenci ve vzdálených částech rostliny. Rozpoznání patogenů iniciované zvýšenou produkcí NO, ROS (H_2O_2 , O_2^-) a kyseliny salicylové (SA), která synergicky indukuje hypersenzitivní reakci (HR), má za následek aktivaci NADPH oxidasy a NOS-like synthasy. NPR1 je protein nacházející se v cytosolu a je rozhodujícím prvkem kaskády signální transdukce zprostředkované SA, při níž dochází k indukci obranných genů, např. *PR-1* (pathogenesis-related 1). GSNOR reguluje intracelulární hladiny GSNO a S-nitrosothiolů, snížení aktivity vyvolá zvýšení intracelulární hladiny S-nitrosothiolů (SNO) a tím posílení lokální i systémové rezistence rostliny vůči patogenu (upraveno dle Rusterucci *et al.*, 2007).

Ve studii Wünsche *et al.*, 2011 byl proveden knock-down GSNOR díky systému VIGS (virus induced gene silencing) a byla studována funkce GSNOR v obranné reakci po napadení herbivorním živočichem *Manduca sexta*, napadající druh tabáku *Nicotiana attenuata*. Umlčení exprese GSNOR snížilo herbivorem-vyvolanou akumulaci kyseliny jasmonové (JA) a etylenu, aniž by byla snížena aktivita dvou mitogen-aktivovaných proteinkinás (MAPKs), proteinkinasy indukované poraněním (WIPK) a proteinkinasy indukované kyselinou salicylovou (SIPK). Ztráta funkce v mutantu *atgsnor1-3* v *Arabidopsis* snížila hladinu GSNO a vedla k redukcí akumulace SA (Malik *et al.*, 2011). U rostlin hrachu vystavených nízkým teplotám (8°C po dobu 48 hodin) byla zvýšená aktivita GSNOR o 67 %, 5x vyšší hladina RSNOs, zvýšená nitrace tyrosinových residuí v proteinech a také zvýšená aktivita enzymu NOS. Celkový obsah dusičnanů a dusitanů však nebyl tímto stresem ovlivněn (Corpas *et al.*, 2008).

4.4 Nitrace proteinů

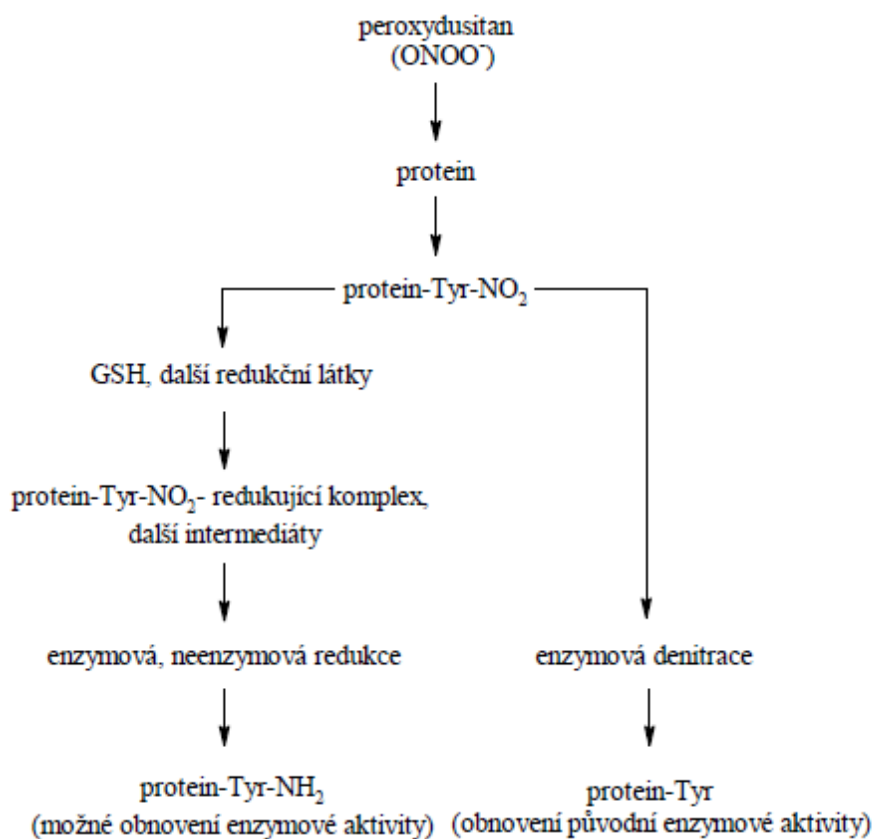
Posttranslační kovalentní modifikace proteinů jsou důležité reakce ovlivňující a kontrolující strukturu, funkci, buněčnou lokalizaci a odbourávání proteinů. Mezi nejznámější a nejvíce prostudované posttranslační modifikace patří *N*- a *O*-glykosylace, fosforylace a methylace lysinů (Hnízdová *et al.*, 2009), dále může docházet ke kovalentní modifikaci acetylací, sulfatací, isoprenylací, ubikvitinylací, glutathionylací, citrulinací a polyglutamylací (Jensen, 2006; Hoffman *et al.*, 2008). Významná role byla také prokázána v případě nitračních a nitrosačních modifikací, kdy RNS reagují s postranními řetězci aminokyselin v proteinech (Obr. 14, Freschi, 2013). *In vivo* byly nejvíce prozkoumané a charakterizované reakce nitrace tyrosinu za vzniku 3-nitrotyrosinu a nitrosylace thiolových skupin cysteinů na *S*-nitrosocystein.



Obr. 14: Přehled biologických posttranslačních modifikací závislých na NO. S-nitrosylace cysteinových residuí, nitrace tyrosinů a metalová S-nitrosylace. Proteiny jsou znázorněny písmeny P v šedých oválech (převzato z Freschi, 2013).

Při vzájemných interakcích mezi ROS a RNS vznikají silná nitrační činidla. Při jejich zvýšené produkci dochází k tzv. nitrosačnímu stresu. Mezi nejvýznamnější nitrační činidla *in vivo*, která mohou nitrovat volné i v proteinech vázané aminokyseliny, patří NO, oxid dusičitý (NO_2), peroxydusitan ($ONOO^-$), a sloučeniny odvozené od dusitanu, kyselina dusitá (HNO_2) a nitrylchlorid (NO_2Cl) (Hnízdová *et al.*, 2009). Nitrace tyrosinu je považována za marker nitrosačního stresu (Corpas *et al.*, 2008).

Navázáním nitroskupiny na tyrosin dochází ke změně konformace modifikovaných proteinů a následnému ovlivnění biologické aktivity proteinů. Vnesení nitroskupiny do *ortho*-polohy vzhledem k hydroxyly na aromatickém kruhu snižuje možnost fosforylace tyrosinu, což významně ovlivňuje rychlost přenosu informací v mnoha signálních drahách založených na regulaci aktivity enzymů reverzibilní fosforylací. Nitrací tyrosinu se snižuje pKa tyrosinu téměř o 3 jednotky a zvyšuje se hydrofobicita tyrosinu, což může vést ke ztrátě funkce proteinu. Nitrované proteiny jsou většinou degradovány proteolyticky, jiným způsobem degradace *in vivo* je tzv. denitrace za katalýzy enzymu denitrasy (nitratasy), avšak tento enzym nebyl dosud z rostlin izolován. Vedle denitrace může docházet k přeměně nitrotyrosinu na aminotyrosin, což může vést k návratu aktivity některých proteinů a buněčné obnově (Obr. 15; Kuo *et al.*, 2002). Redukcí nitroskupiny na aminoskupinu dochází ke zvýšení pKa na hodnotu 10, což vede k obnovení přístupnosti proteinů pro působení tyrosinkinás (Gow *et al.*, 1996).

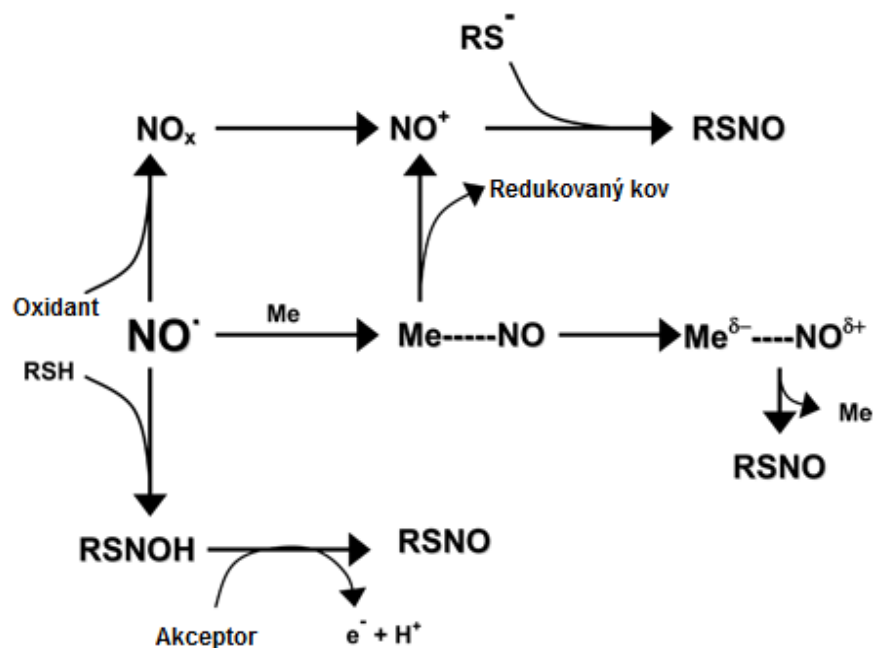


Obr. 15: Schéma vzniku nitrovaných proteinů a jejich metabolismus denitrací nebo redukcí. U všech nitrovaných proteinů je upřednostňována proteolytická degradace, která probíhá rychleji (převzato z Kuo *et al.*, 2002)

4.5 S-nitrosylace proteinů

S-nitrosylace, kdy dochází k reversibilnímu kovalentnímu navázání -NO skupiny na thiolový postranní řetězec cysteinového residua, je v poslední době velmi intenzivně studovaná posttranslační modifikace (Yu *et al.*, 2012). Vysoce specifická reaktivní cysteinová residua s nízkým pKa sulfhydrylových skupin jsou hlavním místem reakce RNS. Nízké hodnoty pKa významně zvyšují úspěšnost oxidace (Malik *et al.*, 2011). Vzniklé S-nitrosothioly (SNO) mají obecnou strukturu RSNO. S-nitrosylace vysoce reaktivních cysteinových residuí může významně ovlivnit funkci proteinu. S-nitrosylace je považována za klíčový proces v přenosu NO a jeho bioaktivitě (Yu *et al.*, 2012).

Mechanismus vzniku S-nitrosothiolů byl poprvé popsán ve studii Stamler *et al.*, 1992 u S-nitrosoalbuminu. K tvorbě RSNO dochází v reakci NO s molekulárním kyslíkem nebo superoxidem, v reakci NO s redukováným thiolem (RSH) kdy je reakčním meziproductem radikál RSNOH nebo v reakci s přechodnými kovy (Cu, Fe) (Obr. 16, Gow *et al.*, 2004).



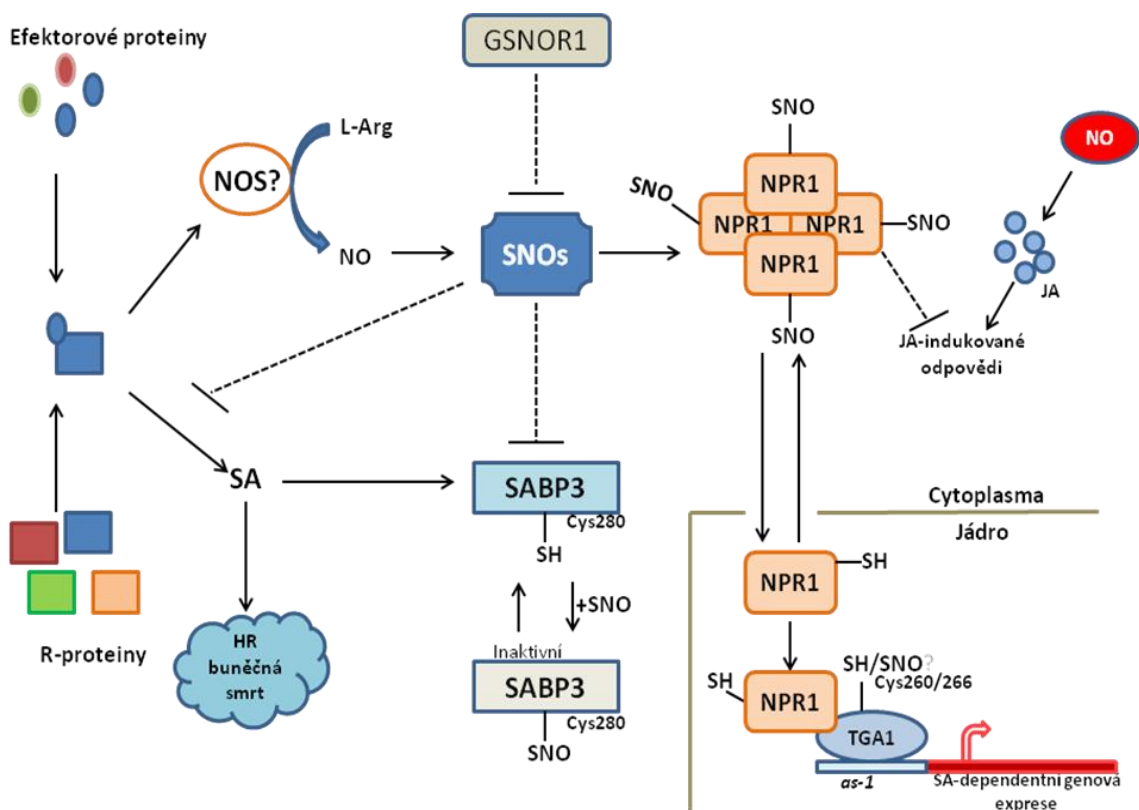
Obr. 16: Mechanismy vzniku S-nitrosothiolů. 1) Reakce s oxidanty (O_2 , O_2^-), reakčními meziprodukty jsou vyšší oxidy dusíku; 2. reakce s redukováným thiolem (RSH), reakčním meziproduktem je radikál RSNOH; 3) reakce s kovy (Me), které mohou působit jako katalyzátory, a nebo vést k tvorbě NO^+ (Gow et al., 2004)

Katabolismus S-nitrosothiolů může probíhat enzymaticky za přispění systémů: xantin/xantinoxidasa (X/XO, EC 1.17.3.2), Cu/Zn superoxiddismutasy (Cu/Zn SOD, EC 1.15.1.1), glutathionperoxidasy (GPX, EC 1.11.1.9), γ -glutamyltranspeptidasy (γ -GT, EC 2.3.2.2) nebo GSNOR (Gaston *et al.*, 2003). První zmínka o důležité roli S-nitrosylace v rostlinné signální transdukcii byla nalezena u genu *S-nitrosogluthathionreduktasy* u *A. thaliana* (*AtGSNOR1*), který byl identifikován jako kontrola celkové hladiny nízkomolekulárních (GSNO) a vysokomolekulárních S-nitrosothiolů (Feechan *et al.*, 2005). GSNO je vytvářen S-nitrosylací buněčného antioxidantu glutathionu (GSH) a slouží jako zásobárna NO.

Modulace hladiny buněčných SNOs je důležitým regulátorem akumulace imunitních aktivátorů, např. kyseliny salicylové (SA) a SA-dependentních genů. NPR1 (Non-Expresser of Patogenesis-Related Genes) je klíčovým regulátorem exprese SA-dependentních genů. NPR1 se nachází v cytosolu v důsledku tvorby intermolekulárních disulfidických vazeb ve formě oligomeru. Redoxní změny vyvolané SA vedou k redukci NPR1 oligomerů na monomery a usnadňují tak pohyb NPR1 do jádra, kde je zahájena transkripce cílových genů. Rovnováha mezi NPR1 oligomery a monomery v cytosolu je klíčový proces v kontrole exprese genů aktivovaných SA. S-nitrosylace NPR1 na cys156 usnadňuje jeho oligomerizaci a lokalizaci v cytosolu. S-nitrosylované

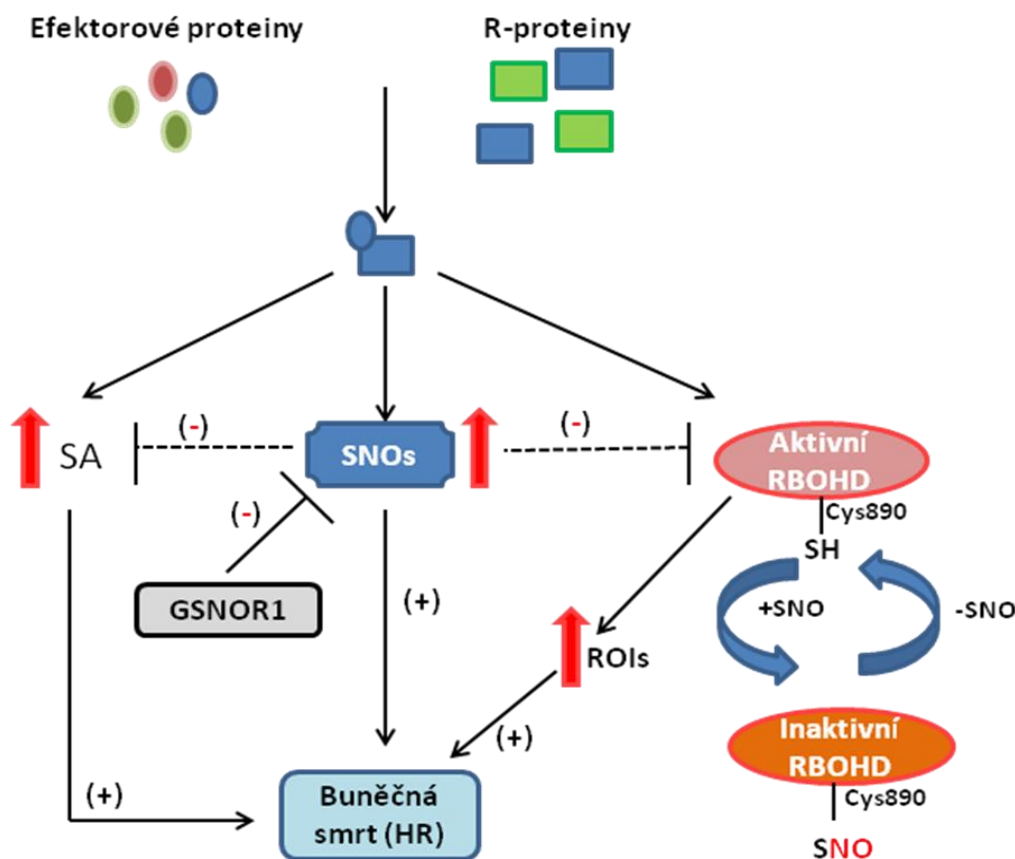
oligomerní formy NPR1 potlačují odpovědi na působení další regulační sloučeniny kyseliny jasmonové (JA), jejíž produkce je spojena se zvýšenou tvorbou NO. Transkripční regulátor (TGA1), patřící do podtřídy proteinů se strukturálním motivem leucin zipper, je zodpovědný za expresi SA-dependentních genů. S-nitrosylace TGA1 na Cys260 a Cys266 chrání tato rezidua a upřednostňuje vazbu transkripčního faktoru na DNA (Delledonne *et al.*, 2001).

SA-vázající protein 3 (SA-binding protein 3; SABP3) má vysokou afinitu pro SA a inhibuje aktivitu karbonátnhydrasy (karbonáthydro-lyasa, CA, EC 4.2.1.1) důležitého enzymu při biosyntéze lipidů. Molekuly na bázi lipidů hrají klíčovou roli v obranných reakcích rostliny a jejich funkce je úzce spjata se signalizací SA. Míra S-nitrosylace SABP3 proteinu na Cys280 je přímo úměrná hladině celkových SNOs uvnitř buňky (Kachroo *et al.*, 2001). S-nitrosylace blokuje vazbu SA na tento protein (Obr. 17) a také aktivitu enzymu CA (Yu *et al.*, 2012, Freschi, 2013).



Obr. 17: Model navrhuující možné role SNOs v regulaci exprese SA-dependentních genů. Rozpoznání patogena má za následek vzrůst hladiny SA a syntézu NO. Celková buněčná hladina SNOs je kontrolována přes enzym GSNOR1, který přeměňuje GSNO. SABP3 pozitivně reguluje obrannou signalizaci, S-nitrosylací na Cys280 je tento protein inaktivován. NPR1 proteiny existují v dynamické rovnováze v monomerní a oligomerní formě. S-nitrosylace na Cys156 posouvá rovnováhu k oligomerním formám. TGA1 faktor, který je S-nitrosylován na Cys260 a 266, pomáhá vazbě DNA na *as-1* motif (převzato z (Yu *et al.*, 2012)).

SNOs mohou také kontrolovat akumulaci ROS v apoplastu (Yu *et al.*, 2012) a hrát důležitou roli při rozvoji hypersenzitivní reakce (HR) vedoucí k buněčné smrti (Obr. 18, Delledonne *et al.*, 2001). S-nitrosylace na Cys 890 NADPHoxidasy (označována také jako RBOHD) brání vazbě kofaktoru flavinadenindinukleotidu (FAD), což vede ke snížení aktivity NADPHoxidasy a následně k redukci akumulace ROS. Jedná se o jeden z regulačních momentů umožňujících vymezit rozsah buněčné smrti v pozdní fázi HR (Yu *et al.*, 2012).



Obr. 18: Model naznačující možné funkce SNOs ve vývoji buněčné smrti hostitelské buňky v průběhu imunitní funkce. Rozpoznání patogena vede k akumulaci hladiny SA, ke zvýšení hladiny celkových SNOs a k aktivaci NADPHoxidasy (RBOHD). Dohromady působí tyto změny pozitivně na rozvoj buněčné smrti. Při růstu hladiny SNOs až na kritickou úroveň dochází k oslabení biosyntézy SA a naopak k nárustu S-nitrosylace enzymu RBOHD na cysteinovém residuu 890 (Cys890). Tím je snižována aktivita tohoto enzymu a v důsledku toho dochází ke snížení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS nebo také ROIs - reaktivní kyslíkové intermediáty). Tato negativní zpětná vazba může omezit rozsah buněčné smrti v pozdní fázi hypersenzitivní reakce (HR) imunitní odpovědi rostliny (převzato z Yu *et al.*, 2012).

Bylo dokázáno, že antioxidační enzym peroxyredoxin II E (thiol-obsahující reduktant:hydroperoxid oxidoreduktasa, PrxII E, EC 1.11.1.15), který je součástí specifického detoxifikačního systému pro peroxydusitan, tvořící se reakcí NO s O_2^- , je také S-nitrosylován během vývoje rezistence rostlin vůči chorobám (Romero-Puertas *et al.*, 2007). U *Arabidopsis* byla popsána inaktivace PrxII E S-nitrosylací. Inhibice vede ke zvýšení hladiny peroxydusitanu a následně k intenzivním nitracím tyrosinových zbytků. NO může přes S-nitrosylace klíčových komponent antioxidačního obranného systému regulovat zapojení vlastních radikálů během HR a tím ovlivnit tyrosin kinasové signální dráhy (Yu *et al.*, 2012).

Další enzym, který je S-nitrosylován v průběhu hypersenzitivní reakce, je enzym allenoxidcyklasa ((9Z,11E,15Z)-(13S)-hydroperoxyoktadeka-9,11,15-trienoát-12,13-hydrolyasa, EC 4.2.1.92), což je enzym biosyntézy JA. V závislosti na druhu rostliny metabolizuje 9(S) - nebo 13(S) - hydroperoxydy linolové nebo linolenové kyseliny. S-nitrosylace potenciálně představuje mechanismus regulace hladiny oxylipinů (Romero-Puertas *et al.*, 2008; Leitner *et al.*, 2009).

S-nitrosylace enzymu methioninadenosyltransferasy 1 (ATP:L-methionin S-adenosyltransferasa, MAT1, EC 2.5.1.6) účastní se biosyntézy etylenu, zastavuje činnost tohoto enzymu (Lindemayr *et al.*, 2010).

Intracelulární hladina NO reguluje apoptosu. Koncentrace NO rozhoduje o tom, zda bude NO chránit buňku před apoptosou nebo bude iniciovat buněčnou smrt. S-nitrosylace cysteinového residua, které se nachází v aktivním místě všech isoformů enzymů kaspas, způsobuje antiapoptotický účinek (Belenghi *et al.*, 2007).

I když mnoho proteinových cílů S-nitrosylace v průběhu imunitní reakce rostliny bylo objeveno pomocí techniky biotin-switch, reprezentují tyto výsledky pouze malou část z celkového počtu možných cílů S-nitrosylace, neboť postup v technice má mnoho omezení.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 Materiál a přístroje

5.1 Chemikálie

Absolute qPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific, USA), akrylamid/bisakrylamid (Sigma, USA), 2 - [6-(4'-amino)fenoxy-3*H*-xanthen-3-on-9-yl]benzoová kyselina (APF, Sigma Aldrich, USA), 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM, Alexis, USA), 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA, Alexis, USA), anti-aktin polyklonální (králičí) protilátka (Agrisera, Švédsko), anti-biotin monoklonální protilátka (myší) konjugovaná s alkalickou fosfatase (Sigma, USA), anti-nitrotyrosin polyklonální (králičí) protilátka (Sigma, USA), anti-nitrotyrosin monoklonální (myší) protilátka (Sigma, USA), APS (Fluka, Švýcarsko), AtGSNOR1 polyklonální (králičí) protilátka, Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad, USA), biotin-HPDP (Thermo Scientific, USA), bisakrylamid (MP Biomedicals, USA), BSA (Sigma Aldrich, USA), Complete Ultra Tablets Mini, EDTA-free, EASY pack (Roche, Švýcarsko), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, USA), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H₂DCF DA, Sigma Aldrich, USA), dihydroethidium (DHE, Setareh, USA), DMSO (Thermo Scientific, USA), DTT (Sigma, USA), Ethanol (Lach-Ner, ČR), fluorescein diacetát (FDA, Serva, USA), Glutathion (Acros Organics, USA), 2-[6-(4'-hydroxy)fenoxy-3*H*-xanthen-3-on-9-yl]benzoová kyselina (HPF, Sigma Aldrich, USA), 2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (cPTIO, Sigma, USA), kryptogein (Ústav biochemie MU, Brno), kyselina L-askorbová (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), Laemmliho vzorkovací pufr (Bio-Rad, USA), LuminataTM Forte Western HRP substrate (Millipore), luminol (Santa Cruz Biotechnology, USA), MMTS (Sigma, USA), Murashige a Skoog medium (MS medium, Duchefa Biochemie, Nizozemsko), mutant L41F, V84F a L41F/V84F (Ústav biochemie MU, Brno), n-butanol (Sigma, USA), N6022 (Axon Medchem, Holandsko), NADH (AppliChem, Německo), NBT-BCIP (Sigma, USA), Neocuproin (Sigma, USA), NucleoSpin RNA plant kit (Macherey-Nagel), PMSF (Fluka, Švýcarsko), Ponceau S (Merck, Německo), SDS (Sigma, USA), sekundární anti-rabbit protilátka IgG s peroxidasovým konjugátem (Sigma, USA), sekundární anti-rabbit protilátka IgG značená alkalickou fosfatase (Sigma, USA), standard BSA (Sigma, USA), sušené mléko (AppliChem, Německo), TBS (Fluka, Švýcarsko), TEMED (Fluka, Švýcarsko), Tris HCl (MP Biomedicals, Francie), TRITON X-100 (Sigma, USA), Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Švýcarsko), Tween-20 (Sigma, USA), β - merkaptoethanol (Fluka, Švýcarsko).

5.2 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo), autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo, automatické pipety (Eppendorf, Německo), digitální pH metr WTW 526 (InoLab, Německo), digitální předvážky (KERN, Německo), dokumentační zařízení BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP, USA), elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA), elektromagnetická míchačka IKA (Labortechnik, Německo), flowbox Holten Lamin Air HH 1.2 Plus (Heto-Holten, Dánsko), Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA), chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo), inkubátor INCUBAT (Melag, Německo), kolonky NAP-5 (GE Healthcare, USA), magnetická míchačka (IKA, Německo), mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko), mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA), minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika), nitroceluloseová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA), PCR termocykler (Eppendorf, Německo), přístroj CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System (Millipore, USA), trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, USA), trans-BlotR Transfer Medium – nitroceluloseová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA), třepačka Mixing Block MB-102 (BIOER technology, Čína), VisionWorks®LS (UVP, USA), vortex mixer SA8 (Stuart, UK)

5.3 Rostlinný materiál

V experimentální části diplomové práce byly použity čtyřdenní suspenzní kultury buněk tabáku *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi. Suspenze byla poskytnuta Ústavem biochemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

5.3.1 Kultivace suspenzních kultur tabáku

Buněčná suspenze byla uchovávána ve fytotronu s fotoperiodou 16/8 (den/noc), při 23 °C a pěstována v modifikovaném tekutém médiu Murashige-Skoog zvaném Chandlerovo médium (Murashige a Skoog, 1962; Chandler *et al.* 1972), které obsahuje dvě složky: hlavní médium s makroprvky a mikroprvky (Tab. 5) a roztok hormonů a vitaminů potřebných pro růst buněk (Tab. 6). Buňky tabáku byly jednou týdně sterilně přeočkovávány v laminárním boxu, 8 ml buněčné kultury bylo aplikováno do 100 ml nového média.

Tab. 5: Hlavní médium pro buněčné suspenze tabáku (přepočováno z Murashige a Skoog, 1962; Chandler *et al.* 1972).

		Zásobní roztok (1 l)	Na přípravu 1 l média	Výsledná koncentrace (mg/l)
Makroprvky	NH ₄ NO ₃	33,0 g	50 ml	1650
	KNO ₃	38,0 g		1900
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,4 g		370
	KH ₂ PO ₄	3,4 g		170
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	8,8 g		440
Mikroprvky	H ₃ BO ₃	6,2 g	1ml	6,2
	MnSO ₄ x H ₂ O	22,3 g		22,3
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,6 g		8,6
	KI	0,83 g		0,83
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25 g		0,25
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025 g		0,025
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025 g		0,025
EDTA - Fe	Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	3,72 g	10 ml	37,2
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,78 g		27,8

Tab. 6: Roztok hormonů a vitaminů pro buněčné suspenze tabáku

		Zásobní roztok (1 l)	Na přípravu 1 l média	Výsledná koncentrace (mg/l)
Vitaminy	Kyselina nikotinová	50 mg	10 ml	5
	Pantothénát Ca	30 mg		3
	Glycin	20 mg		2
	Thiamin	5 mg		0,5
	Kyselina folová	5 mg		0,5
	Pyridoxin	5 mg		0,5
	Biotin	0,5 mg		0,05
	Kinetin	---	1 ml	0,1
	2,4 D	22 mg	0,8 ml	0,175
	Myo-inositol	---	100 mg	100
	Glutamin	---	200 mg	200
	Sacharosa	---	30 g	30 000

6 Metody

6.1 Příprava buněčného materiálu k experimentu

Čtyřdenní buňky tabáku (exponenciální fáze růstu) byly odsáty pomocí Büchnerovy nálevky a zbaveny tak původního média. K přesně odváženému množství takto odsátých buněk bylo přidáno ekvilibrační médium (Tab. 7) v poměru 1g buněk/10 ml média. Nově připravená buněčná suspenze byla rozdělena do Erlenmeyerových baněk a ponechána jednu hodinu v inkubátoru pro ekvilibraci. Objem suspenze byl 50 ml. Následně bylo do každé z baněk přidáno přesné množství 1 μM testovaného elicitinu tak, aby konečná koncentrace elicitinu v baňce byla 5 nM. Do páté baňky, která sloužila jako kontrola, byla přidána pouze destilovaná voda. V případě inhibitoru GSNOR (N6022) byla výsledná koncentrace v baňce 1 μM , lapač ROS (L-askorbát) měl koncentraci 5 mM a lapač NO (cPTIO) 1 mM. Zásobní roztoky čtyř testovaných elicitinů kryptogeinu (X24) a jeho mutantních forem L41F, V84F a L41F/ V84F o koncentraci 96 μM byly poskytnuty Ústavem biochemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

Odběry vzorků byly provedeny v čase 0 (okamžitě po aplikaci elicitinů), 1, 2, 3 a 4 hodiny od aplikace elicitinů. 15 ml buněčného extraktu bylo odsáto na Büchnerově nálevce. Pomocí analytických vah bylo naváženo 0,3 g buněk do plastových zkumavek a zamraženo v tekutém dusíku. Poté byly vzorky umístěny do mrazícího boxu o teplotě - 80 °C.

Tab. 7: Ekvilibrační médium pro suspenzní kultury tabáku.

Na přípravu 1 l média (pH 5,8)	
Mannitol	32 g
CaCl ₂	74 mg
K ₂ SO ₄	87 mg
MES-hydrát	390 mg

6.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy

6.2.1 Extrakce a přečištění buněčného materiálu

K zamraženým čtyřdenním buňkám tabáku byl přidán čerstvě připravený extrakční pufr (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,2% (v/v) Triton X-100; 1 mM PMSF; 2 mM DTT)

v poměru 1:2 (0,3 g rostlinného materiálu : 0,6 ml extrakčního pufru). Buňky byly rozetřeny mechanicky za pomoci paliček a následně byl homogenát centrifugován 20 minut při 16 000g, teplota 4 °C.

Z důvodu odstranění endogenního GSNO bylo 0,5 ml supernatantu přečištěno na odsolovací DNase-free kolonce NAP-5 (náplň Sephadex, porozita G-25). K ekvilibraci kolonek byl použit 10 mM Na-fosfátový pufr, pH 6,8. Po vsáknutí extraktu byl na kolonku nanesen 1 ml 50 mM K-fosfátového pufru o pH 7,8. Veškerý eluát byl okamžitě jímán do plastové zkumavky a následně uchováván při 4 °C. Kolonky byly následně promyty 25 ml destilované vody (upravená metodika dle Corpas *et al.*, 2008).

6.2.2 Měření aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy

Aktivita enzymu GSNOR byla měřena spektrofotometricky na readeru Synergy-HT v 96-ti jamkových mikrodestičkách. Stanovení bylo prováděno při 25 °C sledováním oxidace NADH při 340 nm (Warburghův optický test) (dle Sakamoto *et al.*, 2002). Do jednotlivých jamek mikrodestičky bylo postupně pipetováno 225 µl reakčního pufru (20 mM Tris, pH 8), 15 µl čerstvě připraveného extraktu a 30 µl 2 mM NADH. Reakce byla startována přidávkem 30 µl 4 mM GSNO. Roztoky GSNO a NADH byly připraveny vždy čerstvé a uchovávány ve tmě při 4 °C. Do jamky blanku bylo místo substrátu GSNO pipetováno 30 µl destilované vody.

Vzorky byly měřeny ve třech opakováních, každý vzorek měl vlastní blank. Byl zaznamenáván pokles absorbance při 340 nm v průběhu patnácti minut.

6.2.3 Měření délky optické dráhy

Pro výpočet aktivity enzymu bylo také nutné provést měření délky optické dráhy (DOD). Toto stanovení se provádí ihned po doměření aktivity enzymu a to při vlnových délkách 900 a 977 nm.

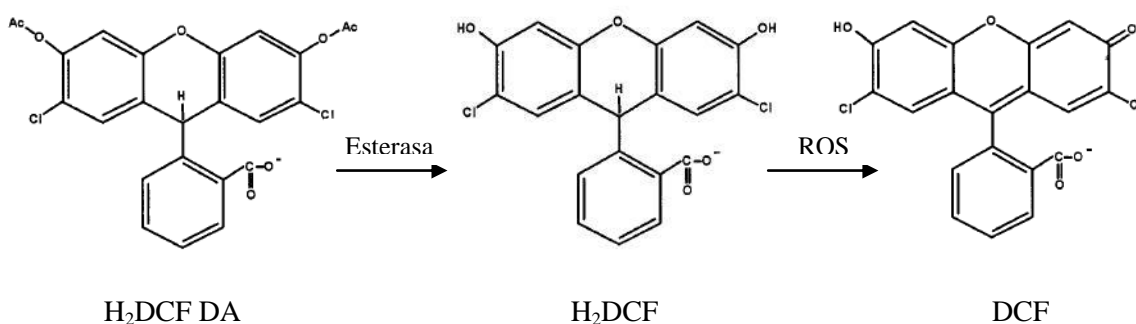
6.3 Stanovení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) pomocí fluorescenčních sond

V případě měření produkce ROS se jednalo o fluorescenční sondy H₂DCF DA, APF, HPF a DHE, u RNS pak měření probíhalo pomocí citlivých sond DAF-FM DA a DAF-FM. V případě sondy H₂DCF DA (Obr. 19) a DAF-FM DA (Obr. 20) dochází po vstupu

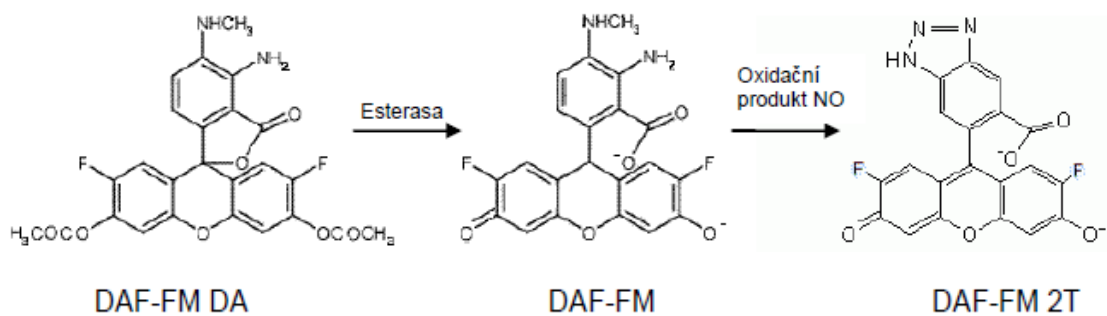
sloučenin do buňky k odštěpení diacetátu buněčnými esterasami s následně probíhá reakce s ROS případně RNS za vzniku fluorescenčního produktu. Sondy APF (Obr. 21) a HPF (Obr. 22) jsou stabilnější a poskytují větší specifitu než próba H₂DCF DA. Tyto sondy jsou více odolné vůči světlem-indukované oxidaci. Obě tyto sondy vykazují fluorescenci až po kontaktu s ROS. Sondy APF a HPF se používají pro detekci hydroxylových radikálů a peroxynitritových aniontů - označované jako vysoce reaktivní formy kyslíku (hROS). Sonda DHE neboli dihydroethidium (Obr. 23) je specifická sonda pro měření superoxidu. Jedná se o redukovanou formu běžně používané interkalační barvy ethidiumbromid. Volně prochází přes buněčné stěny a membrány (Zhao *et al.*, 2003).

DAF-FM je vysoce senzitivní fotostabilní próba pro měření RNS. Je citlivější oproti originální sloučenině DAF-2 a méně náchylná na změny pH.

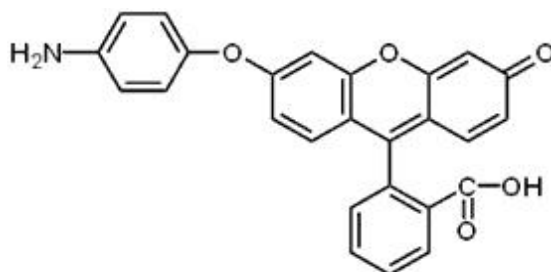
100 μ l suspenze ekvilibrovaných buněk (viz bod 6.1) byla pipetována do černých 96-ti jamkových mikroděstiček pro měření fluorescence. Buňky byly ponechány 30 minut na třepačce zakryté víkem. Poté byly k suspenzi přidány čtyři testované elicitiny tak, aby jeho výsledná koncentrace v jamce mikroděstičky byla 5 nM. Jako kontrola bylo použito ekvilibrační médium. Okamžitě po aplikaci elicitinů byly k buňkám přidávány fluorescenční sondy s výslednou koncentrací v jamce 8 μ M. Výsledný objem v jamce mikroděstičky byl 125 μ l. Následovalo kinetické měření produkce ROS a RNS po dobu 1-1,5 hodiny. Kontrolní experimenty byly prováděny s lapačem oxidu dusnatého (cPTIO) a lapačem ROS kyselinou L-askorbovou. Jako blank bylo použito ekvilibrační médium buněk. Stanovení bylo prováděno vždy v triplicátu.



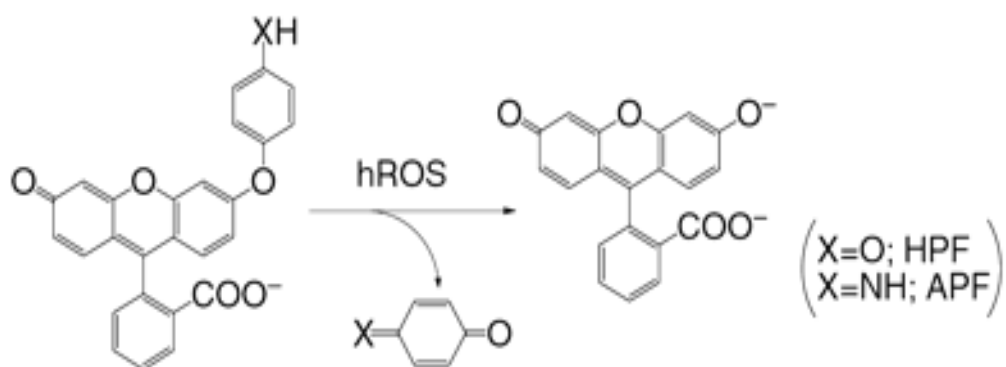
Obr. 19: Reakce sondy H₂DCF DA. Próba je esterasou deacetylována po vstupu do buňky. S ROS reaguje sonda za vzniku fluorescenčního produktu DCF. Excitační/emisní vlnová délka je 495/515 nm (převzato z Crow *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2005).



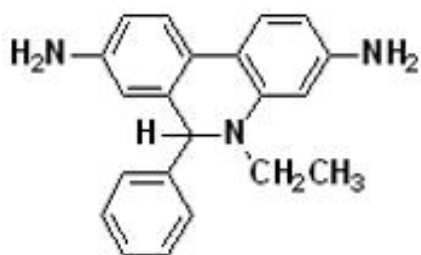
Obr. 20: Reakce sondy DAF-FM DA. Průba je esterasa deacetylována po vstupu do buňky. S RNS reaguje sonda za vzniku fluorescenčního produktu DAF-FM 2T (převzato z Kojima *et al.*, 1998).



Obr. 21: Fluorescenční průba APF. Excitační/emisní vlnová délka je přibližně 490/515 nm (převzato ze Setsukinai *et al.*, 2003).



Obr. 22: Reakce fluorescenčních sond APF a HPF. Po reakci s hROS (vysoce reaktivní formy kyslíku) se stává sloučenina silně fluorescenční (převzato ze Setsukinai *et al.*, 2003).



Obr. 23: Specifická sonda DHE. Produktem reakce se superoxidem je 2-hydroxyethidium. Excitace se pohybuje v rozmezí 500-530 nm; emise v rozmezí 590-620 nm (převzato ze Zhao *et al.*, 2003).

6.4 Měření optické hustoty buněk

Měření bylo provedeno spektrofotometricky. Do mikrodestičky bylo napipetováno 200 μ l buněčné suspenze. Poté byla na spektrofotometru SynergyTM HT (BioTek Instruments, USA) změřena optická hustota (OD) při vlnové délce 600 nm. Jako blank bylo použito ekvilibrační médium buněk. Měření bylo prováděno v duplikátu.

6.5 Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku

Životnost byla stanovena spektrofluorimetricky metodou využívající fluorescenční sondu fluorescein diacetát (FDA). Měření bylo prováděno na mikrodestičkovém readeru Synergy-HT. Ke 100 μ l ekvilibrovaných buněk v mikrodestičce bylo přidáno 5 μ l pracovního roztoku (20 μ l zásobního roztoku FDA v 1 ml ekvilibračního média) sondy FDA o koncentraci 25 μ g/ml. Ihned po detekci signálu (excitace 490 nm, emise 514 nm) byla mikrodestička ponechána ve tmě při 27 °C po dobu 10 minut. Poté byl signál proměřen znovu. Stanovení bylo prováděno v triplicátu, jako blank bylo použito ekvilibrační médium buněk.

Zásobní roztok FDA: 5 mg FDA rozpuštěno v 1 ml acetonu.

6.6 Stanovení proteinů metodou Bradfordové

Do jamky mikrodestičky bylo postupně pipetováno 45 μ l destilované vody, 5 μ l standardu BSA nebo vzorku proteinu. Na závěr bylo přidáno 200 μ l činidla Bradfordové, což byl zásobní roztok Coomasie Blue ředěný destilovanou vodou v poměru 1:4 (zásobní roztok Coomasie Brilliant Blue: 50 mg CBB G-250, 25 ml 95% metanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné). Destička byla protřepána a po dobu 10 minut se vyvíjelo zbarvení. Stanovení bylo prováděno v duplikátu, spektrofotometricky

na readeru Synergy™ HT (BioTek Instruments, USA) při vlnové délce 595 nm. Pro kalibraci byly použity standardy hovězího sérového albuminu (BSA) v koncentrační řadě: 0,02 - 0,08 - 0,1 - 0,16 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 a 1,0 mg/ml (Bradford, 1976).

6.7 SDS-PAGE

Elektroforetická separace proteinů byla provedena v prostředí dodecylsírany sodného (SDS), který se váže na bílkoviny pomocí hydrofóbní interakce a udílí jim uniformní náboj. Dochází k migraci proteinů k anodě, přičemž pohyblivost proteinů je závislá na velikosti molekuly.

Elektroforéza byla provedena v 10% dělicím a 4% zaostřovacím gelu (viz. Tab. 8). Polymerace gelu byla zahájena přidávkem 10% persíranu amonného (APS). Polymerace obou gelů probíhala přibližně 30 minut. Po uplynutí doby polymerace byla skla s gely vložena do elektroforetické komůrky a zalita elektrodoým puřrem. Do jamek bylo postupně pipetováno 5 µl markeru molekulové hmotnosti Protein-Ladder 10-250 kDa (BioLabs), což je směs dvanácti rekombinantních, vysoce purifikovaných proteinů, které dávají jasně identifikovatelné bandy v rozmezí 10-250 kDa a jsou předbarveny barvivem Coomassie Brilliant Blue R-250. Dále bylo do jamek pipetováno 20 µl vzorku smíchaného v poměru 1:1 se vzorkovacím puřrem a také příslušné množství standardu, kterým byl rekombinantní protein GSNOR z *Lactuca sativa* o koncentraci 0,1 µg/ml; 0,3 µg/ml nebo v případě detekce nitrovaných proteinů NO₂-BSA o koncentraci 0,05 µg/ml; 0,1 µg/ml a 0,3 µg/ml. Dělení probíhalo při konstantním napětí 120 V po dobu 25 minut, poté při konstantním napětí 180 V, kdy separace probíhala přibližně 45 minut.

Tab. 8: Složení zaostřovacího a dělicího gelu. Množství je uvedeno pro 4 gely, 1,5 mm spacery. Objemy jsou uvedeny v ml.

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

Další roztoky a pufrы použité pro SDS-PAGE:

Vzorkovací pufr: 0,125 M Tris/HCl, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 0,02% bromfenolová modř, 5% merkaptoethanol (přidán až před použitím v poměru 9:1 - (pufr : 2-merkaptoethanol), pH pufru 6,8

Elektrodový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% SDS, pH 8,3

n-butanol: destilovanou vodou nasycený v poměru 10:1 (n-butanol:voda)

Bio-Safe Coomassie Stain: komerční pufr pro barvení polyakrylamidových gelů

6.7.1 Příprava vzorku pro SDS-PAGE

Po centrifugaci (viz. bod 6.2.1) bylo 0,5 ml supernatantu převedeno do čisté zkumavky. Z důvodů zakoncentrování vzorků byla provedena lyofilizace na přístroji LyoVac. Lyofilizace probíhala vždy přes noc za přítomnosti konstantního vakua.

Lyofilizované vzorky byly rozpuštěny v 50 μ l destilované vody a smíchány 1:1 se vzorkovacím pufrém (50 μ l vzorku + 50 μ l vzorkovacího pufru). Následná inkubace při 100 °C probíhala po dobu 10 minut, poté bylo 20 μ l vzorku pipetováno do jamky gelu.

V případě přípravy vzorků pro precastované gely (NOVEX) se k rozpuštěnému vzorku přidal Bolt™ LDS Sample Buffer (4x) a Bolt™ reducing agent (10x) dle tabulky přiložené k návodu od výrobce. Maker molekulové hmotnosti byl použit Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard (5 μ l do jamky). Následovalo zahřátí vzorku 10 minut při 70 °C. Elektroforéza poté probíhala při napětí 165 V po dobu 45 minut v přítomnosti 1 x Bolt™ MES Running Buffer.

6.8 Western-blot

Metoda Western blot je analytickou metodou používanou pro detekci specifických proteinů ve vzorku. Separované proteiny metodou SDS-PAGE byly přeneseny na nitrocelulosoovou membránu, ve které byly zafixovány. Elektrotransfer proteinů byl proveden s využitím zařízení Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, USA), kdy přenos probíhal cca 2 hodiny při konstantním proudu 150 mA, nebo zařízením Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, USA), v tomto případě se jedná o vysoce rychlý a účinný přenos proteinů na membránu po dobu 10 minut, konstantním jednosměrném proudu 1,3 A a napětí 25 V. Uspořádání materiálu potřebného pro přenos bylo následující: katoda – 2 x blotovací papír – gel – membrána -

2 x blotovací papír – anoda, vše předem namočené několik minut v blotovacím pufru (0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 20% (v/v) metanol, pH 8,3). Odstranění případných bublin bylo provedeno speciálním válečkem. Úspěšnost přenosu byla potvrzena vizualizací barvivem Ponceau S (0,2% Ponceau S; 10% kyselina octová), které bylo poté zpětně vymyto destilovanou vodou.

Roztoky a pufrы pro Western blot

5% nízkotučné sušené mléko v 0,1 % TTBS

3% BSA v 0,1% TTBS

Blotovací pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,3

TBS: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5

TTBS: 400 ml TBS, 400 μ l Tween

Po úspěšném přenosu byla nitroceluloseová membrána ponechána v blokovacím roztoku (5% nízkotučné sušené mléko v 0,1% TTBS; v případě detekce nitrovaných proteinů se jednalo o 3% BSA v 0,1% TTBS) po dobu minimálně 2 hodin. Při tomto procesu dochází k zablokování volných míst na povrchu membrány tak, aby v následujících krocích nedocházelo k nespecifickým interakcím mezi protilátkami a matricí. Imunochemická detekce následně probíhala s využitím primárních a sekundárních protilátek, kdy se primární protilátka váže s vysokou specifitou na daný protein. Po odstranění nenavázané primární protilátky opakovaným promytím membrány následovala inkubace se sekundární protilátkou, která byla značená např. alkalickou fosfataseou či křenovou peroxidaseou.

V případě detekce enzymu GSNOR ve vzorcích ošetřených eliciny byla jako primární protilátka použita polyklonální AbGSNOR 1 (připravená imunizací králíka připravenou rekombinantní GSNOR), v případě detekce nitrovaných proteinů byla použita primární protilátka anti-nitrotyrosin polyklonální (králičí) (Sigma) (Tab. 9). Inkubace s primárními protilátkami probíhala vždy přes noc na třepačce pro zvýšení účinnosti navázání. Následující den byla membrána promyta roztokem TTBS třikrát po dobu 30 minut. Poté následovala hodinová inkubace se sekundární protilátkou a následně opětovné promytí roztokem TTBS třikrát po dobu 30 minut. Primární i sekundární protilátky byly ředěny do 5% nízkotučného mléka v 0,1% TTBS; v případě detekce nitrovaných proteinů se jednalo o 3% BSA v 0,1% TTBS.

Tab. 9: Použité primární a sekundární protilátky.

Detekovaný protein	Primární Ab	Ředění	Sekundární Ab	Ředění
GSNOR	AtGSNOR1, polyklonální, (králíčí)	1:500	Anti-králíčí/ alkalická fosfatasa (kozí)	1:5000
			Anti-králíčí/ křenová peroxidasa (kozí)	1:10000
Nitrované proteiny	Anti-nitrotyrosin, monoklonální (myší)	1:500	Anti-myší alkalická fosfatasa (kozí)	1:5000
	Anti-nitrotyrosin, polyklonální (králíčí)	1:500	Anti-králíčí křenová peroxidasa (kozí)	1:5000
β-aktin	Anti-aktin, polyklonální (králíčí)	1:500	Anti-králíčí křenová peroxidasa (kozí)	1:5000

K vyhodnocení v případě použití sekundární protilátky značené alkalickou fosfatase byl použit chromogenní substrát NBT-BCIP. V tomto barvicím roztoku byla membrána inkubována maximálně 10 minut do vyvinutí tmavě fialového zabarvení. Poté byla membrána přenesena do destilované vody, několikrát promyta a vysušena. Následovalo denzitometrické vyhodnocení na přístroji BioSpectrum 410 vybaveném citlivou chlazenou CCD kamerou s napojením na počítač s programem VisionWorks pro sběr a analýzu získaných obrazových dat.

Vizualizace nitrovaných proteinů s navázanou sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidase (HRP) byla realizována za pomoci chemikálie Luminol reagent A a B (Santa Cruz). HRP katalyzuje oxidaci luminolu na 3-aminofalát. Reakce je doprovázena emisí světla při vlnové délce 428 nm. V těchto roztocích smíchaných vždy v poměru 1:1 byla membrána ponechána přibližně 4 minuty, následovalo vyvolání ve fotografické komoře za pomoci přístroje s vývojkou a ustalovačem na fotografický film (Kodak) s expozicí 30 sekund až 2 minuty. Práce probíhala vždy za přítomnosti pouze červeného světla. Sekundární protilátky značené křenovou peroxidase byly také detekovány s využitím chemikálie LuminataTM Forte Western HRP substrate (Millipore). Inkubace v tomto případě trvala 5 minut.

Fotodokumentace spolu s vyhodnocením byla následně provedena přístrojem Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad,USA) za použití programu ImageLab 4.1 (Bio-Rad,USA).

6.9 Stanovení nitrosylovaných proteinů metodou Biotin-Switch

Metoda byla provedena na základě článku Jaffrey a Snyder, 2001 s malými změnami dle článku Astier *et al.*, 2012. K 0,3 g zamražených buněk (viz. bod 6.1) bylo přidáno 1,5 ml extrakčního pufru (1% Triton-X, Complete Ultra Tablets Mini, EDTA-free, EASY pack, v poměru 3 tablety/ 50 ml extrakčního pufru). Buňky byly poté ponechány

15 minut na ledu a 1 minutu v ultrazvukové lázni. Následně byl homogenát centrifugován 20 minut při 16 000g, teplota 4 °C.

Po centrifugaci proběhla v supernatantu kvantifikace proteinů metodou Bradfordové (viz bod 6.6), minimální koncentrace potřebná pro následující experimenty byla 0,2 mg/ml). Ke vzorku byl dále přidán komerční roztok MMTS (0,02 mM) a 2% SDS. Tato směs byla inkubována po dobu 30 minut při 50 °C v termobloku. Následně byl ke směsi přidán 1 ml acetonu a vzorky byly pro lepší precipitaci ponechány 30 minut při -28 °C. Vzorky byly poté centrifugovány 20 minut při 16000 g a 4 °C. Proces promývání byl proveden dvakrát. Výsledný pelet byl vysušen během 10 minut v lednici a poté byl rozsuspendován ve 100 µl HENS pufru (25 mM HEPES, 1 mM EDTA, 0,1 mM Neocuproin, 1% SDS). Ke vzorkům byl přidán askorbát (1 mM) a biotin-HPDP (1 mM). Inkubace probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky smíchány s 1 ml acetonu a ponechány přes noc precipitovat při -28 °C.

Druhý den byly vzorky opět dvakrát centrifugovány s přídavkem 1 ml acetonu (20 minut, 16000 g, 4 °C) a výsledný pelet byl rozsuspendován v 500 µl HENS pufru. Část vzorku (250 µl) byla odebrána a uchována pro afinitní purifikaci, druhá polovina byla smíchána se vzorkovacím pufrem (bez DTT a β-merkapt ethanolu). Elektroforéza byla provedena dle bodu 6.8, marker molekulové hmotnosti byl použit Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard (Biorad) (5 µl do jamky). Transfer na nitrocelulosovou membránu byl proveden dle bodu 6.8. Blokace probíhala 2 hodiny v 1% mléku a 1% BSA v TTBS. Následná inkubace s protilátkou (monoklonální anti-biotin alkalická fofatasa, myší) probíhala přes noc při 4 °C.

Třetí den byla membrána čtyřikrát promyta TTBS (4 x 30 minut) a detekce byla provedena přídavkem komerčního roztoku NBT-BCIP.

6.9.1 Afinitní purifikace

Část vzorku (250 µl), která byla odebrána a uchována (kapitola 6.9) byla přečištěna afinitní purifikací. Tato metoda funguje na principu interakce biotinu s avidinem, který je obsažen v matrici. Nejdříve byla připravena matrice (High Capacity NeutrAvidin Agarose Resin, Thermo Scientific, USA), na 250 µg proteinu ve vzorku bylo použito 35 µl matrice. K matrici bylo přidáno 70 µl neutralizačního pufru (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% Triton-X) a směs byla centrifugována 1 minutu při 200 g (2x). Supernatant byl vždy odstraněn. Poté bylo opět přidáno 70 µl neutralizačního pufru a směs byla ponechána 30 minut ve tmě na rotační třepačce kvůli správné

ekvilibraci matrice. Směs byla poté znovu centrifugována a promyta 70 μ l neutralizačního pufru. K takto ekvilibrované matrici bylo přidáno 250 μ l připraveného vzorku. Směs se hodinu inkubovala na rotační třepačce, poté byla centrifugována (1 min, 200 g) a následně byl odstraněn supernatant. Směs vzorku a matrice byla poté čtyřikrát promyta 350 μ l promývacího pufru (20 mM HEPES, 600 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton-X). Po posledním promývacím cyklu byl odstraněn supernatant a směs byla eluována ve 150 μ l promývacího pufru a 70 μ l elučního pufru (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA + 7 μ l β -merkapt ethanolu/1 ml elučního pufru), který byl předem zahřán v termobloku na 95 °C. Eluce probíhala 20 minut za mírného třepání na kolonkách SigmaPrepTM spin column (Sigma, Biorad). K takto připravenému vzorku byl přidán 1 ml chlazeného acetonu a směs byla ponechána precipitovat přes noc při -28 °C.

Druhý den byla směs centrifugována 20 minut při 14 000 g, pelet byl opatrně promyt 1 ml acetonu, znovu centrifugována (20 minut, 14 000 g) a výsledný pelet byl rozsuspendován ve 20 μ l HENS pufru. Následovala elektroforéza dle bodu 6.7. Gely byly poté barveny pomocí barvicího roztoku (0,1% (w/v) CBB R-250 Coomassie Blue, 15% (v/v) CH₃COOH, 45% (v/v) methanol) přes noc.

Třetí den byly gely odbarveny pomocí odbarvovacího roztoku (40% (v/v) methanol, 10% (v/v) CH₃COOH). Bandy byly vyříznuty pomocí žiletky a špičky pro další zpracování a detekci pomocí hmotnostní spektrometrie.

6.10 Izolace a purifikace RNA z buněčného materiálu

Izolace a purifikace mRNA probíhala za pomoci NucleoSpin RNA plant kitu (Macherey-Nagel). Zamražené vzorky elicitovaných buněk tabáku (viz. 6.1) byly 10 minut ponechány v tekutém dusíku a následně rozdrceny v třecí misce s tloučkem, předem vše ošetřeno ethanolem a ponecháno také několik minut v tekutém dusíku. Na analytických vahách bylo naváženo 100-120 mg rozdrcených buněk, které byly přeneseny do nové čisté zkumavky. K homogenizovaným buňkám bylo přidáno 350 μ l roztoku RA1 (lyzační pufr) a 3,5 μ l β -merkapt ethanolu, následovalo prudké vortexování po dobu 1 minuty tak, aby došlo k co nejintenzivnějšímu rozpadu buněk. Poté bylo nutné lyzát zfiltrovat za pomoci speciálního filtru Space NucleoSpin po dobu 1 minuty při 11 000x g. Filtrát byl poté umístěn do nové 2 ml zkumavky a vortexován s 350 μ l ethanolu. Lyzát byl přenesen na speciální kolonu NucleoSpin RNA Plant

Column a centrifugován 30 sekund při 8 000 g. Na kolonu se poté aplikovalo 350 μ l pufru MDB (Membrane desalting buffer), který membránu odsoluje a vysušuje. Následovala centrifugace 1 minutu při 11 000 g. Pro správné štípání DNA se na střed silikátové membrány kolony aplikovalo 95 μ l reakční směsi DNasy (10 μ l DNasy I a 90 μ l reakčního pufru pro DNasu). Tato směs byla inkubována na kolonce při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Následovalo promytí a vysušení silikátové membrány, nejprve 200 μ l promývacího roztoku RA2, který inaktivuje DNasu (centrifugace 30 s při 8 000 g), poté 600 μ l roztoku RA3 (centrifugace 30 s při 8 000 g). Centrifugace posledního promytí 250 μ l roztoku RA3 probíhala 2 minuty při 11 000 g. Po každém kroku byla vyměněna sběrná zkumavka za novou. Vymytí vysoce čisté RNA probíhalo po přidavku 50 μ l RNase-free vody centrifugací 1 minutu při 11 000 g. Z důvodů stability byla vyizolovaná RNA uchovávána při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.10.1 Měření koncentrace RNA po izolaci

Stanovení koncentrace RNA bylo provedeno spektrofotometricky s využitím měření při vlnových délkách 260, 280 a 320 nm. Měření bylo provedeno na přístroji Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA) za použití programu Gen5, složka TakeSeason 3. Jako blank byla použita RNase-free sterilní voda, která se použila na rozpuštění RNA v posledním kroku izolace. Koncentrace byla vypočtena na základě předpokladu, že roztok dsDNA o absorbanci 1 při vlnové délce 260 nm má koncentraci 50 ng/ μ l, pro ssDNA za daných podmínek platí koncentrace 33 ng/ μ l, pro RNA 40 ng/ μ l. Objem potřebný pro analýzu každé RNA byl 2 μ l.

6.11 Reverzní transkripce

K přepisu genetické informace z mRNA do cDNA byl použit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche). Do mikrozkuvek byl postupně pipetován 1 μ l Anchored-oligo (dT)₁₈ primeru a příslušný objem (koncentrace) vyizolované RNA tak, aby konečný objem po doplnění sterilní vodou činil 11,4 μ l. Tato směs byla inkubována 10 minut při $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ v termostatu Bio-Rad. Poté se mikrozkuvky umístily ihned do ledu. Ke směsi bylo dále pipetováno 8,6 μ l premixu složeného ze 4 μ l reakčního pufru, 0,5 μ l protector RNase inhibitoru 40 U/ μ l, 2 μ l směsi deoxynukleotidů každý o koncentraci 10 mM, 1 μ l DTT 0,1 M a 1,1 μ l reverzní transkriptasy o koncentraci 20 U/ μ l. Takto připravená směs byla inkubována 30 minut při $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté 10 minut při 85

°C. Po inkubaci byly mikrozkušavky převedeny ihned do ledu. Získaná cDNA byla poté uchována při -20 °C.

6.12 Kvantitativní polymerázová reakce

Kvantitativní polymerázová reakce (označovaná jako Real-time PCR nebo qPCR) umožňuje kvantifikaci sledovaného úseku DNA, analýzu genové exprese. Metoda byla provedena s využitím interkalačního barviva SYBR Green 1. Pro přípravu reakční směsi byl použit Absolute qPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific, USA). Do jedné reakce bylo pipetováno 10 µl Mixu (Thermo Scientific, USA), 1,75 µl forward primeru (3 µM), 1,75 µl reverse primeru (3 µM), 4,5 µl sterilní vody a 2 µl cDNA získané z předchozího kroku reverzní transkripce. Samostatná reakce byla provedena v přístroji CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rads) využitím softwaru Mx3000P.

PCR reakce probíhala dle programu uvedeného v Tab. 10. Podle toho, který gen byl právě exprimován, byla nastavena teplota navázání primerů. V případě genu *GSNOR*, *AOS*, *End/Hel* a *PR-1a* byla optimální teplota 56 °C, u genů *NADPH1 a 2*, *PAL* a *MYC 2* 60 °C. House-keepingový gen *EF-1α* měl optimální teplotu nasednutí primerů 54 °C.

K ověření vzorků a detekci nespecifických produktů byla využita analýza křivek tání PCR produktů. Po proběhnutí real-time PCR software automaticky provedl analýzu vzorků a určil hodnoty Ct pro jednotlivé vzorky. Výpočet exprese genů byl následně proveden metodou $2^{-\Delta C_t}$.

Tab. 10: Nastavení real-time PCR reakce v programu MxPro.

	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95	15 min	1
Denaturace	95	15 s	40
Navázání primerů	54-60	30 s	40
Elongace	72	30 s	40

Primery byly navrženy dle programu Primer3. Sekvence genu byla zjištěna z databází (EMBL, GenBank). Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 11: Sekvence forward a reverse primerů použitých při PCR reakci.

Sledovaný gen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>GSNOR</i>	CCTCTGGTGATCGAGGATGT	TTCCTGGCTGAACCTCAGT
<i>EF-1α</i>	TGTGATGTTTTTGTTCGGTCTTT AA	TCAAAGAAAATGCAGACAGACT CA
<i>End/Hel</i>	AGAACTATAACTACGGGCCT	AGGTTTTGGTGATTGAGGAG
<i>AOS</i>	CGGTTGTATACGAGGCTTTA	TACCCGAATAACAATTCCCC
<i>PR-1a</i>	GGTTCGATGAGAAACAGTAT	CTCCATTGTTACTACTGAACC
<i>NtRBOHD 1</i>	CATCAAACAGCTAAGGACAC AG	GTACACAATAGGGAGAGTTGGTA GAC
<i>NtRBOHD 2</i>	AGATACCAAGGGAATTAAGAA TGTG	GGCACCCATCAAAGAGG
<i>PAL</i>	CTGTTGGTTCTGGTATGGCA	TCAGTGAATTCGGGCTTTCC
<i>MYC 2</i>	GCATCAAGAGGTAGCAACGA	GACTTCCCCGTGTTTGAAC

6.13 Statistické vyhodnocení

Realizované experimenty byly provedeny ve třech opakováních, pokud není uvedeno jinak. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka.

Vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu Microsoft Excel 2010.

Seznam použité literatury

Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373–399.

Amelot N., Carrouche A., Danoun S., Bourque S., Haiech J., Pugin A., Ranjeva R., Grima-Pettenati J., Mazars C., Briere C. (2011): Cryptogein, a fungal elicitor, remodels the phenylpropanoid metabolism of tobacco cell suspension cultures in a calcium-dependent manner. *Plant, Cell & Environment* **34**, 149–161.

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 cryptogein signalling in tobacco cells. *Biochemical Journal* **447**, 249–260.

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

Attard A., Gourgues M., Galiana E., Panabières F., Ponchet M., Keller H. (2008): Strategies of attack and defense in plant–oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). *Journal of Plant Physiology* **165**, 83–94.

Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., López-Jaramillo J., Padilla M. N., Carreras A., Corpas F. J., Barroso J. B. (2013): Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 527–538.

Belenghi B., Romero-Puertas M. C., Vercammen D., Brackenier 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.

Besson-Bard A., Griveau S., Bedioui F., Wendehenne D. (2008): Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3407–3414.

Blein J. P., Milat M. L., Ricci P. (1991): Responses of cultured tobacco cells to cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*: Possible plasmalemma involvement. *Plant Physiology* **95**, 486–491.

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**, 181–192.

Bourque S., Binet M.-N., Ponchet M., Pugin A., Lebrun-Garcia A. (1999): Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 34699–34705.

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

Brash A. R. (1999): Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 23679–23682.

Camejo D., Ortiz-Espín A., Lázaro J. J., Romero-Puertas M.-C., Lázaro-Payo A., Sevilla F., Jiménez A. (2015): Functional and structural changes in plant mitochondrial PrxII F caused by NO. *Journal of Proteomics* **199**, 112-125.

Cecconi D., Orzetti S., Vandelle E., Rinalducci S., Zolla L., Delledonne M. (2009): Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* **30**, 2460-2468.

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

Corpas F. J., Hayashi M., Mano S., Nishimura M., Barroso J. B. (2009): Peroxisomes are required for *in vivo* nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* **151**, 2083–2094.

Crow J. P. (1997): Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **1**, 145-157.

Cvetkovska M., Vanlerberghe G. C. (2012): Coordination of a mitochondrial superoxide burst during the hypersensitive response to bacterial pathogen in *Nicotiana tabacum*. *Plant, Cell and Environment* **35**, 1121-1136.

D'Alessandro S., Posocco B., Costa A., Zahariou G., Lo Schiavo F., Carbonera D., Zottini M. (2013): Limits in the use of cPTIO as nitric oxide scavenger and EPR probe in plant cells and seedlings. *Frontiers in plant science* **4**, 1-7.

Díaz M., Achkor H., Titarenko E., Martínez M. C. (2003): The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Letters* **543**, 136–139.

Dobeš P., Kmuníček J., Mikeš V., Damborský J. (2004): Binding of fatty acids to β -cryptogein: Quantitative structure-activity relationships and design of selective protein mutants. *Journal of Chemical Information and Modeling* **44**, 2126–2132

Dokládal 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.

Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. (2001): Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **98**, 13454–13459.

Desikan R., Hancock J. T., Neill S. J. (2003): Oxidative stress signalling. *Topics in Current Genetics* **4**, 129-149.

Durner J., Klessig D. F. (1996): Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 88492–28501.

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.
- Flor H. H. (1942): Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**, 653–669.
- Flor H. H. (1971): Current status of gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275–283.
- Foissner I., Wendehenne D., Langebartes Ch., Durner J. (2000): *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *The Plant Journal* **23**, 817-824.
- Freschi L. (2013): Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* **4**, doi: 10.3389/fpls.2013.00398.
- Frunghillo L., de Oliveira J. F. P., Saviani E. E., Oliveira H. C., Martínez M. C., Salgado I. (2013): Modulation of mitochondrial activity by S-nitrosoglutathione reductase in *Arabidopsis thaliana* transgenic cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1827**, 239-247.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006): Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 711–724.
- Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A. (2003) S-nitrosylation signaling in cell biology. *Molecular Interventions* **3**, 253–263.
- Gaupels F., Spiazzi-Vandelle E., Yang D., Delledonne M. (2011): Detection of peroxynitrite accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive defense response. *Nitric Oxide* **25**, 222–228.
- Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C. (2005): Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **65**, 45–80.
- Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C. (2006): Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: A review. *Journal of Fluorescence* **16**, 5-30.
- 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., Duran D., Malcolm S., Ischiropoulos H. (1996): Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Letters* **385**, 63-66.
- Gow A. J., Farkouh C. R., Munson D. A., Posencheg M. A., Ischiropoulos H. (2004): Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **287**, 262-268.
- Green L. S., Chun L. E., Patton A. K., Sun X., Rosenthal G. J., Richards J. P. (2012): Mechanism of inhibition for N6022, a first-in-class drug targeting S-nitrosoglutathione reductase. *Biochemistry* **51**, 2157-2168.
- 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.

- Gupta K. J., Fernie A. R., Kaiser W. M., van Dongen J. T. (2011): On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* **16**, 160–168.
- Hirasawa K., Amano T., Shioi Y. (2005): Effects of scavengers for active oxygen species on cell death by cryptogein. *Phytochemistry* **66**, 463–468.
- Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2009): Nitrace proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické listy* **103**, 788–794.
- Hoffman M. D., Sniatynski M. J., Kast J. (2006): Current approaches for global post-translational modification discovery and analysis. *Analytica Chimica Acta* **627**, 50–61.
- Huitema E., Vleeshouwers V. G. A. A., Cakir C., Kamoun S., Govers F. (2005): Differences in intensity and specificity of hypersensitive response induction in *Nicotiana* spp. INF1, INF2A, and INF2B of *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 183–193.
- Chaki M., Fernández-Ocana A. M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F. J., Luque F., Gómez-Rodríguez M. V., Begara-Morales J. C., Corpas F. J., Barroso J. B. (2009): Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower–mildew interaction. *Plant Cell Physiology* **50**, 265–279.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocana A. M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M. V., Pedrajas R., Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F. J., Barroso J. B. (2011): Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1803–1813.
- Chaki M., Kovacs I., Spannagl M., Lindermayr C. (2014): Computational prediction of candidate proteins for S-nitrosylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* **9**, doi: 10.1371/journal.pone.0110232.
- Chandler M. T., Tandeau de Marsac N., De Kouchkovsky, Y. (1972): Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. *Canadian Journal of Botany* **50**, 2265–2270.
- Chaudhuri K., Das S., Bandyopadhyay M., Zalar A., Kollmann A., Jha S., Tepfer D. (2009): Transgenic mimicry of pathogen attack stimulates growth and secondary metabolite accumulation. *Transgenic research* **18**, 121–134.
- Chen R., Sun S., Wang C., Li Y., Liang Y., An F., Li C., Dong H., Yang X., Zhang J., Zuo J. (2009): The Arabidopsis PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Research* **19**, 1377–1387.
- Jabs T. (1999): Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology* **57**, 231–245.
- 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.
- Jensen D. E., Belka G. K., Du Bois G. C. (1998): S-nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *The Biochemical Journal* **331**, 659–668.
- Jensen O. N. (2006): Interpreting the protein language using proteomics. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 391–403.

- Jiang R. H., Dawe A. L., Weide R., van Staveren M., Peters S., Nuss D. L., Govers F. (2005): Elicitin genes in *Phytophthora infestans* are clustered and interspersed with various transposon-like elements. *Molecular Genetics and Genomics* **273**, 20–32.
- Jiang R. H., Tyler B. M., Whisson S. C., Hardham A. R., Govers F. (2006): Ancient origin of elicitin gene clusters in *Phytophthora* genomes. *Molecular Biology and Evolution* **23**, 338–351.
- Jones J. D., Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Kachroo P., Shanklin J., Shah J., Whittle E. J., Klessig D. F. (2001): A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **98**, 9448–9453.
- Kamoun S., Klucher K. M., Coffey M. D., Tyler B. (1993): A gene encoding a host specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 573–581.
- Kamoun S., Young M., Förster H., Coffey M. D., Tyler B. M. (1994): Potential role of elicitins in the interaction between *Phytophthora* species and tobacco. *Applied and environmental microbiology* **60**, 1593–1598.
- Kamoun S., Lindqvist H., Govers F. (1997): A novel class of elicitin-like genes from *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 1028–1030.
- Kojima H., Nakatsubo, Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Nagano T. (1998): Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins. *Analytical Chemistry* **70**, 2446–2453.
- Koo J. C., Chun H. J., Park H. C., Kim M. C., Koo Y. D., Koo S. C., Ok H. M., Park S. J., Lee S. H., Yun D. J., Lim C. O., Bahk J. D., Lee S. Y., Cho M. J. (2002): Over-expression of a seed specific hevein-like antimicrobial peptide from *Pharbitis nil* enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic tobacco plants. *Plant and Molecular Biology* **50**, 441–52.
- Knowles R. G., Moncada S. (1994): Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* **298**, 249–258.
- 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.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Mieslerová B., Petřivalský M. (2014): Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosoglutathione reductase in plants. *Planta* **239**, 139–146.
- 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 cryptogeiin signalling. *Plant, Cell and Environment* **38**, 331–348.
- Kuo W. N., Kocis J. M. (2002): Nitration/S-nitrosation of proteins by peroxy nitrite-treatment and subsequent modification by glutathione S-transferase and glutathione peroxidase. *Molecular and Cell Biochemistry* **233**, 57–63.
- Kurusu T., Saito K., Horikoshi S., Hanamata S., Negi J., Yagi Ch., Kitahata N., Iba K., Kuchitsu K. (2013): An S-Type anion channel SLAC1 is involved in cryptogeiin-induced ion fluxes and modulates hypersensitive responses in tobacco BY-2 cells. *PLoS One* **8**, doi: 10.1371/journal.pone.0070623

- Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Seyueira-Legrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., Pugin A., Wendehenne D. (2004): Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology* **135**, 516-529.
- Lebrun-Garcia A., Bourque S., Binet M.-N., Ouaked F., Wendehenne D., Chiltz A., Schöffner A., Pugin A. (1999): Involvement of plasma membrane proteins in plant defense responses. Analysis of the cryptogein signal transduction on tobacco. *Biochimie* **81**, 663–668.
- Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R., Pugin A. (2002): Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *The Plant Cell* **14**, 2627-2641.
- Lecourieux-Ouaked F., Pugin A., Lebrun-Garcia A. (2000): Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 821–829.
- Lee S. CH., Ristaino J. B., Heitman J. (2012): Parallels in intercellular communication in Oomycete and Fungal pathogens of plants and humans. *PLOS pathogens* **8**, doi:10.1371/journal.ppat.1003028
- 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**, 451–45.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J. M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2011): Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling & Behaviour* **6**, 789–793.
- Lherminier J., Elmayan T., Fromentin J., Elaraqui K. T., Vesa S., Morel J., Verrier J.-L., Cailleteau B., Blein J.-P., Simon-Plas F. (2009): NADPH Oxidase-mediated reactive oxygen species production: Subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 868–881.
- Lim M. H., Lippard S. J. (2006a): Fluorescent nitric oxide detection by copper complexes bearing anthracenyl and dansyl fluorophore ligands. *Inorganic chemistry* **45**, 8980-8989.
- Lim M. H., Xu D., Lippard S. J. (2006b): Visualization of nitric oxide in living cells by a copper-based fluorescent probe. *Nature Chemical Biology* **2**, 375-380.
- 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.
- Olson H. A., Carbone I., Benson D. M. (2011): Phylogenetic History of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* Isolates from Floriculture Crops in North Carolina Greenhouses. *Phytopathology* **101**, 1373–1384.
- Osman H., Mikes V., Milat V. L., Ponchet M., Marion D., Prangé T., Maume B. F., Vauthrin S., Blein J. P. (2001) Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS letters* **489**, 55–58.
- Oswald W., Fleischmann F., Rigling D., Coelho A. C., Cravador A., Diez J., Dalio R. J., Jung H. M., Pfanz H., Robin C., Sipos G., Solla A., Cech T., Chanbery A., Diamandis S., Hansen E.,

Jung T., Orlikowski L. B., Parke J., Prospero S., Werres S. (2014): Strategies of attack and defence in woody plant–*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology* **44**, 169–190.

Otvos K., Pasternak T. P., Miskolczi P., Domoki M., Dorjgotov D., Szucs A., Bottka S., Dudits D., Fehér A. (2005): Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *The Plant Journal* **43**, 849–860.

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.

May M. J., Vernoux T., Leaver C., Van Montagu M., Inze D. (1998): Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* **49**, 649–667.

Mikes V., Milat M.-L., Ponchet M., Panabières F., Ricci P., Blein J.-P. (1998): Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol Carrar proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **245**, 133–139.

Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405–410.

Moricová P. (2011): *Vliv nanočástic stříbra na proces regenerace protoplastů*. Diplomová práce, UPOL Olomouc, Česká republika

Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* **15**, 473–497.

Neill S., Desikan R., Hancock J. (2002): Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 388–395

Panabières F., Ponchet M., Allasia V., Cardin L., Ricci P. (1997): Characterization of border species among Pythiaceae: several Pythium isolates produce elicitors, typical proteins from *Phytophthora* spp. *Mycological Research* **101**, 1459–1468.

Panabières F., Birch P. R. J., Unkles S. E., Ponchet M., Lacourt I., Venard P., Keller H., Allasia V., Ricci P., Duncan J. M. (1998): Heterologous expression of a basic elicitor from *Phytophthora cryptogea* in *Phytophthora infestans* increases its ability to cause leaf necrosis in tobacco. *Microbiology* **144**, 3343–3349.

París R., Iglesias M. J., Terrile M. C., Casalengué C. A. (2013): Functions of S-nitrosylation in plant hormone networks. *Frontiers in Plant Science* **4**:294. doi: 10.3389/fpls.2013.00294

Perazzolli M., Romero-Puertas M. C., Delledonne M. (2006): Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *Journal of Experimental Botany* **57**, 479–488.

Pieterse C. M. J., van Wees S. C. M., van Pelt J. A., Knoester M., Laan R., Gerrits H., Weisbeek P. J., van Loon L. C. (1998): A Novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**, 1571–1580

Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005): Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy* **99**, 455–466.

Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008): Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chemické Listy* **102**, 410-416.

Planchet E., Sonoda M., Zeier J., Kaiser W. M. (2006): Nitric oxide (NO) as an intermediate in the cryptogein induced hypersensitive response – a critical re-evaluation. *Plant, Cell and Environment* **29**, 59-69.

Plešková V. (2010): *Sledování pozdní fáze obranné reakce tabáku v závislosti na použitém elicitoru*. Diplomová práce, MU Brno, Česká republika.

Pugin A., Frachisse J.-M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R., Guern J. (1997): Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *The Plant Cell* **9**, 2077–2091.

Rasul S., Dubreuil-Maurizi C., Lamotte O., Koen E., Poinssot B., Alcaraz G., Jeandroz S. (2012): Nitric oxide production mediates oligogalacturonides-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **35**, 1483–1499.

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.

Rizzo D. M., Garbelotto M., Hansen E. A. (2005): *Phytophthora ramorum*: integrative research and management of an emerging pathogen in California and Oregon forests. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 309–335.

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.

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

Romero-Puertas M. C., Rodríguez-Serrano M., Sandalio L. M. (2013): Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. *Frontiers in plant science* **4**, 373. doi: 10.3389/fpls.2013.00373

Rusterucci C., Stallaert V., Milat M. L., Pugin A., Ricci P., Blein J. P. (1996): Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiology* **111**, 885-891.

Rusterucci C., Espunya M. C., Díaz M., Chabannes M., Martínez M. C. (2007): S-nitrosogluthione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant physiology* **143**, 1282-1292.

Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002): *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosogluthione reductase. *FEBS Letters* **515**, 20–24.

Sanghani P. C., Robinson H., Bosron W. F., Hurley T. D. (2002): Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary, and inhibitory ternary complexes. *Biochemistry* **41**, 10778–10786.

- Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H. J., Nagano T. (2003): Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 3170–3175.
- Schornack S., Huitema E., Cano L. M., Bozkurt T. O., Oliva R., van Damme M., Schwizer S., Raffaele S., Chaparro-Garcia A., Farrer R., Segretin M. E., Bos J., Haas B. J., Zody M. C., Nusbaum Ch., Win J., Thines M., Kamoun S. (2009): Ten things to know about oomycete effectors. *Molecular Plant Pathology* **10**, 795–803.
- Simon-Plas F., Elmayan T., Blein J. P. (2002): The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *The Plant Journal* **31**, 137–147.
- 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.
- Sun X., Wasley J. W. F., Qiu J., Blonder J. P., Stout A. M., Green L. S., Strong S. A., Cologiovanni D. B., Richards J. P., Mutka S. C., Chun L., Rosenthal G. J. (2011): Discovery of S-nitrosoglutathione reductase inhibitors: Potential agents for the treatment of asthma and other inflammatory diseases. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2**, 402–406.
- Svozilová Z., Kašparovský T., Skládal P., Lochman J. (2011): Interaction of cryptogein with its binding sites in tobacco plasma membrane studied using the piezoelectric biosensor. *Analytical Biochemistry* **390**, 115–120.
- Takenaka S., Nakamura Y., Kono A., Sekiguchi H., Masunaka A., Takahashi H. (2006): Novel elicitor-like proteins isolated from the cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet. *Molecular Plant Pathology* **7**, 325–339.
- Tyler, B. M. (2002): Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 137–146.
- Thakur M., Sohal B. S. (2013): Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A Review. *ISRN Biochemistry* **2013**,1–10.
- van Loon L. C., Bakker P. A. H. M., van der Heijden W. H. W., Wendehenne D., Pugin A. (2008): Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 1609–1621.
- Vandelle E., Delledonne M. (2011): Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science* **181**, 534-539.
- Vauthrin S., Mikes V., Milat M. L., Ponchet M., Maume B., Osman H., Blein J. P. (1999): Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1419**, 335-342.
- Veit S., J. M. Wörle, Nürnberger T., Koch W., Seitz H. U. (2001): A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, arabidopsis, and tobacco. *Plant Physiology* **127**, 832–841
- Vitecek J., Adam V., Petrek J., Vacek J. (2004): Esterases as a marker for growth of BY-2 tobacco cells and early somatic embryos of the Norway spruce. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **79**, 195-201.

Vitecek J., Reinohl V., Jones R. L. (2008): Measuring NO production by plant tissues and suspension cultured cells. *Molecular Plant* **1**, 270-284.

von Bohlen und Halbach O. (2003): Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric Oxide* **9**, 217-228.

Wawer I., Bucholc M., Astier J., Anielska-Mazur A., Dahan J., Kulik A. (2010): Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress- activated proteinkinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochemical Journal* **429**, 73-83.

Wendehenne D., Binet M. N., Blein J. P., Ricci P., Pugin A. (1995): Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS letters* **374**, 203-207.

Wendehenne D., Lamotte O., Frachisse J. M., Barbier-Brygoo H., Pugin A. (2002): Nitrate efflux is an essential component of the cryptogin signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *The Plant Cell* **14**, 1937-1951.

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 response. *BMC Plant Biology* **5**, 35-36.

Winka D. A., Mitchel J. B. (1998): Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* **25**, 434-456.

Wünsche H., Baldwin I. T., Wu J. (2011): *S*-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) mediates the biosynthesis of jasmonic acid and ethylene induced by feeding of the insect herbivore *Manduca sexta* and is important for jasmonate-elicited responses in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4605-4616.

Yamasaki H., Sakihama Y. (2000): Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase : in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* **468**, 89-92.

Yu L. M. (1995): Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* **92**, 4088-4094.

Yu M., Yun B.-W., Spoel S. H., Loake G. J. (2012): A sleigh ride through the SNO: reevaluation of plant immune function by protein S-nitrosylation. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 424-430.

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

Zhao H., Kalivendi S., Zhang H., Joseph J., Nithipatikom K., Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B. (2003): Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radical Biology and Medicine* **34**, 1359-1368.

Ziogas V., Tanou G., Filippou P., Diamantidis G., Vasilakakis M., Fotopoulos V., Molassiotis A. (2013): Nitrosative responses in citrus plants exposed to six abiotic stress conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* **68**, 118-126.

Železná M. (2014): *Úloha S-nitrosoglutathionreduktasy v obranné reakci rostlin vyvolané působením elicitinů*. Diplomová práce, UPOL Olomouc, Česká republika.

Seznam použitých zkratek

AA/BIS	akrylamid- <i>N,N</i> -bisakrylamid
AOS	allene oxide synthase (gen)
APF	2 - [6-(4'-amino)fenoxy-3 <i>H</i> -xanthen-3-on-9-yl]benzoová kyselina
APX	askorbátperoxidasa
biotin-HPDP	(3 <i>aS</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>aR</i>)-hexahydro-2-oxo- <i>N</i> -[6-[1-oxo-3-(2-pyridinyldithio propyl)]amino]hexyl]-1 <i>H</i> -thieno[3,4- <i>d</i>]imidazole-4-pentanamide
BSA	hovězí sérový albumin
CAT	katalasa
CTR1	negativní regulátor etylénové dráhy
CBB R-250	Coomasie brilliant blue
cPTIO	2-4-karboxyfenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxid
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát
DHE	dihydroethidium
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
EIN2; EIN3	pozitivní regulátor etylénové dráhy
<i>End/Hel</i>	endochitinasa/hevein-like (gen)
ERF1	transkripční faktor
GD-FALDH	glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSSG	S-nitrosoglutathion (oxidovaná forma)
H ₂ DCF DA	2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HA	hydroxylamin
HMGSH	S-(hydroxymethyl)glutathion
HPF	2-[6-(4'-hydroxy)fenoxy-3 <i>H</i> -xanthen-3-on-9-yl]benzoová kyselina
HR	hypersenzitivní reakce
hROS	vysoce reaktivní formy kyslíku
JA	jasmonic acid, kyselina jasmonová
JAZ	ZIM-doména jasmonátu
MAPK	mitogen-aktivovaná proteinkinasa
MMTS	methylmethanthiosulfonát
<i>MYC 2, JIN1</i>	jasmonate intensive (gen), transkripční faktor
N6022	3-(5-(4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylphenyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)propionová kyselina
NBT-BCIP	nitroterazolium Blue chlorid ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem
NBD-PC	nitrobenzoxadiazolem-značený fosfatidylcholin
NiNOR	nitrit-NOreduktasa
NO	oxid dusnatý
NO ⁺	nitrosoniový ion
NO ₂ ·	radikál oxidu dusičitého
NO ₂ ⁻	dusitanový anion, nitrit
NO ₃ ⁻	dusičnanový anion, nitrát
NOA	NO-associated enzym; NADPHoxidasa
NOS	syntasy oxidu dusnatého
NPR	Non-Expresser of Patogenesis-Related Genes
NR	nitrátoreduktasa
nsHbs	non-symbiotic hemoglobins (nesymbiotické hemoglobiny)
ORA59	transkripční faktor
PAL	phenylalanine ammonia lyase (gen)

pI	isoelektrický bod
PMSF	phenylmethylsulfonylfluorid
Ponceau S	3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(sulfo-fenylazo)fenylazo]-2,7-naftalendisulfonová kyselina
PP	fosfatasa
PR-1	patogenesis related protein (s patogenesí související protein)
RBOHD	respiratory burst oxidase homologues; NADPHoxidasa
RNS	reactive nitrogen species (reaktivní formy dusíku)
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
RS-NO	S-nitrosothioly
SA	salicylic acid, kyselina salicylová
SABP3	protein 3 vázající kyselinu salicylovou
SAR	systémově získaná rezistence
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SOD	superoxiddismutasa
SNP	nitroprussid sodný (sodium nitroprusside)
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylendiamin
TGA	transkripční faktor
TTBS	tween s TBS
v/v	objem na objem
XOR	xanthionoxidoreduktasa
WT	divoký druh ("wild type")