

MODYFIKACJE BIAŁEK KOMÓRKI ROŚLINNEJ WYWOŁANE DZIAŁANIEM REAKTYWNYCH FORM TLENU (RFT) I AZOTU (RFA) I ICH ROLA W REAKCJACH OBRONNYCH ROŚLIN

MODIFICATIONS OF PLANT CELL PROTEINS DUE TO THE ACTION OF
REACTIVE OXYGEN (ROS) AND NITROGEN (RNS) SPECIES AND THEIR
ROLE IN PLANT DEFENSE REACTIONS

Edyta PIETROWSKA, Urszula MAŁOLEPSZA

Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie: Reaktywne formy tlenu (RFT) i azotu (RFA) są wytwarzane w komórkach roślin jako produkty uboczne metabolizmu tlenowego i azotowego, a do ich wzmożonej syntezy dochodzi w odpowiedzi na działanie różnego rodzaju stresów. Wyniki badań prowadzonych nad funkcją RFT i RFA w komórkach dostarczają coraz więcej danych, które powodują, że poza ich szkodliwym oddziaływaniem, coraz częściej dostrzegana jest ich pozytywna rola jako wtórnych przekaźników biorących udział w kontroli i regulacji wielu procesów fizjologicznych. Z przekazywaniem sygnału, w którym zaangażowany jest tlenek azotu (NO) i RFT związana jest nie tylko dobrze udokumentowana aktywacja cykazy guanylanowej, ale także potranslacyjne modyfikacje białek. RFT i RFA powodują modyfikacje struktury i funkcji białek przez utlenienie, nitrację bądź nitrozylację niektórych reszt aminokwasowych. Ostatnio szczególnie wiele uwagi poświęca się modyfikacjom reszt cysteiny w procesie S-nitrozylacji. Uważa się, że S-nitrozotiole, w tym głównie niskocząsteczkowy S-nitrozoglutation (GSNO), mogą być formami magazynowania NO oraz jego transporterami na dalsze odległości, a także ważnym elementem szlaków sygnałowych w odpowiedzi komórek roślin na atak patogenów. Podobnie do nitrozylacji, konformację białka może zmieniać nitrowanie reszt tyrozyny, co prowadzi do modulacji struktury i zmiany aktywności katalitycznej białka. Modyfikacje białek, pod wpływem działania RFT i RFA, powodujące ich aktywację lub unieczynnienie odgrywają ważną rolę w różnych procesach biologicznych, np. w reakcji na stres oraz programowanej śmierci komórki.

Słowa kluczowe: tlenek azotu, reaktywne formy tlenu, S-nitrozylacja, nitracja, oksydacyjne modyfikacje białek

Summary: Reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species are produced in plant cells as by-products of oxygen and nitrogen metabolism and at an increased rate during various stresses. There is a number of data proving that besides their toxic function they act as secondary signaling molecules taking part in control and regulation of many physiological processes. The signal transduction pathway in which nitric oxide (NO) and ROS are involved is not only related to activation of guanylate cyclase, but also to post-translational modifications of proteins. ROS and RNS reactions with proteins leading to oxidation, nitration or nitrosylation of amino acid residues result in modifications of protein structure and function. Recently, much attention has been paid to modification of cysteine residues in the S-nitrosylation process. It is believed that S-nitrosothiols, mostly S-nitrosoglutathione (GSNO), may act as storage forms of NO and its long-distance transporters. Moreover, S-nitrosothiols are important component of signaling pathways in response to pathogen attack. Nitration of the tyrosine residue may also change the conformation of proteins in a process known as nitration, which leads to modulation of the structure, as well as to alterations of the catalytic activity of the protein. Modifications of proteins, triggered by the action of ROS and RNS, causing their activation or inactivation, play an important role in various biological processes, such as response to stress and programmed cell death.

Key words: nitric oxide, reactive oxygen species, S-nitrosylation, nitration, oxidative modification of proteins

Wykaz stosowanych skrótów: **AC** – anhidraza węglanowa, **AOX** – oksydaza alternatywna, **COX** – oksydaza cytochromu c, **GAPDH** – dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego, **Grx** – glutaredoksyna, **GSH** – glutation, **GSNO** – S-nitrozoglutation, **GSNOR** – reduktaza S-nitrozoglutationu, **GSSG** – disulfid glutationu (utleniony glutation), **nsHb** – niesymbiotyczne hemoglobiny, **PCD** – programowana śmierć komórki, **PR** – białka związane z patogenezą, **Prx** – peroksyredoksyna, **RFA** – reaktywne formy azotu, **RFT** – reaktywne formy tlenu, **SA** – kwas salicylowy, **SNO** – S-nitrozotiole, **SO₂H** – kwas sulfonowy, **SO₃H** – kwas sulfonowy, **SOH** – kwas sulfenowy, **Srx** – sulfiredoksyna, **symHB** – symbiotyczne hemoglobiny, **TBAR** – kwas 2-tiobarbiturowy, **TBARs** – związki reagujące z kwasem 2-tiobarbiturowym, **TR** – reduktaza tioredoksyny, **Trx** – tioredoksyna

WSTĘP

Reaktywne formy tlenu (RFT) i azotu (RFA) biorą udział w transdukcji sygnału, ale także wchodzi w reakcje z najważniejszymi cząsteczkami komórek, modyfikując ich strukturę i funkcje biologiczne oraz prowadząc do powstawania produktów, które niejednokrotnie mają toksyczne właściwości [37, 52]. Wpływ wolnych rodników tlenowych i azotowych na komórki zależy w dużym stopniu od ich stężenia i czasu działania. Występując w komórkach roślinnych w niskim stężeniu, są one zaangażowane w szlaki sygnałowe prowadzące do zmian w przepływie jonów, aktywacji kinaz białkowych oraz zmian w ekspresji genów [11, 12]. Pełnią również ważną rolę w procesie wytwarzania energii, peroksydacji lipidów, powodują nitrację, nitrozylację oraz utlenianie białek i DNA, a ich nadprodukcja prowadzi do występowania stresu oksydacyjnego [33] lub nitrozacyjnego [31, 47]. Przekazu-

ją informacje o konieczności modyfikacji metabolicznych, ułatwiających, a nawet umożliwiających przetrwanie stresów i likwidację powstających uszkodzeń [46]. Podwyższone stężenie RFT i RFA prowadzi do niekontrolowanej reakcji utleniania różnych składników komórkowych, co powoduje aktywację lub inaktywację enzymów, białek transportujących, receptorów, kanałów jonowych i czynników transkrypcyjnych, a w ten sposób regulacje specyficznych procesów rozwojowych roślin w odpowiedzi na stresi biotyczne i abiotyczne.

Tlenek azotu (NO) może reagować z białkami, zwłaszcza tymi zawierającymi centra żelazowo-siarkowe, grupy hemowe i jony metali przejściowych, takich jak: żelazo, miedź, cynk, co prowadzi do tworzenia kompleksów metalo-nitrozylowych, które są kofaktorami białek [6]. Cząsteczka NO, z uwagi na łatwość przenikania przez błony biologiczne, może migrować do różnych organelli komórkowych, w tym np. do mitochondrium, wpływając na intensywność oddychania poprzez hamowanie aktywności oksydazy cytochromu c (COX) na zasadzie współzawodnicstwa z cząsteczką tlenu o miejsce wiązania z jonami miedzi w grupie prostetycznej tego enzymu [42]. Powoduje to zwiększoną redukcję ubichinonu i nadprodukcję anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$). Roślinny łańcuch transportu elektronów zawiera alternatywną oksydazę (AOX), która chroni komórkę przed nadmiarem RFT w mitochondriach. NO nie hamuje aktywności AOX (w przeciwieństwie do aktywności COX) i dodatkowo reguluje ekspresję genów tego enzymu [32, 35]. W wyniku reakcji $O_2^{\cdot-}$ z nadtlenkiem wodoru (H_2O_2) powstaje rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), najbardziej „agresywna” pochodna tlenu [17], zwłaszcza w stosunku do komórkowego DNA [23], która nie tylko może niszczyć np. strukturę deoksyrybozy, ale również uszkadzać zasady purynowe i pirymidynowe. Ponadto, $\cdot OH$ szybko wchodzi w reakcję z wszystkimi składnikami komórki znajdującymi się w jego otoczeniu, reaguje z wolnymi cukrami i poliolami, a głównym produktem tej reakcji jest szkodliwy kwas mrówkowy [29]. Efektem działania $\cdot OH$ jest również utlenianie lipidów błony komórkowej, prowadzące do powstania cytotoksycznych aldehydów lipidowych, a w konsekwencji do uszkodzenia i śmierci komórki [23]. Ostatnio coraz częściej badane są bezpośrednie potranslacyjne modyfikacje strukturalne reszt aminokwasów wchodzących w skład łańcuchów polipeptydowych. Szczególnie znaczenie przypisuje się modyfikacjom reszt cysteiny (S-nitrozylacja) oraz tyrozyny (nitracja) przez NO i jego pochodne, które postrzegane są jako modyfikacje o znaczeniu sygnałowym [47, 4].

S-NITROZYLACJA

Grupy tiolowe (-SH) i wiązania disiarczkowe w znaczący sposób decydują o trójwymiarowej strukturze białka. Odwracalne wiązanie przez nie NO może po-

translacyjnie modyfikować aktywność białek przez ich nitrozylację i denitrozylację, co z kolei może mieć zasadnicze znaczenie w sygnalizacji komórkowej, w której pośredniczy NO [3, 15, 51]. Uważa się, że funkcja NO w wielu procesach jest związana z reakcją S-nitrozytacji. Wskazuje się, że modyfikacje reszt tiolowych przez RFT i RFA są jednym z najbardziej prawdopodobnych mechanizmów, poprzez które sygnalizacja redoks może być kontrolowana na poziomie molekularnym [31, 42].

NO wchodząc w reakcje z grupami tiolowymi lub azotynami alkilowymi tworzy S-nitrozotiole i nitrozobiałka, które są transporterami NO na dalsze odległości [47, 50].



Wykazano, że w roślinach ponad 100 różnych białek ulega odwracalnej nitrozytacji zarówno w warunkach *in vitro* i/lub *in vivo*, a nitrozylowanym białkom przypisywane jest szerokie spektrum funkcji wiążących się z ich wpływem na wszystkie główne procesy komórkowe [15].

Grupa tiolowa cysteiny jest bardzo wrażliwa na modyfikacje przez RFT i RFA. Powstawanie nitrozotiole jest możliwe dzięki temu, że NO reagując z tlenem lub kationami metali o właściwościach utleniających, tworzy reaktywny jon nitrozoniowy NO^+ , który łącząc się z grupą $-\text{SH}$ cysteiny, przekształca się w grupę nitrozotiolową $-\text{SNO}$. Reakcja ta jest możliwa tylko wtedy, gdy w sąsiedztwie cysteiny znajdują się odpowiednie sekwencje XYcysteina (kwas asparaginowy lub kwas glutaminowy), gdzie X może być każdym z następujących aminokwasów: glicyna, seryna, treonina, cysteina, tyrozyna lub glutamina, a Y mogą być takie aminokwasy jak: lizyna, arginina, histydyna, kwas asparaginowy lub kwas glutaminowy [14]. Nitrozotiole mogą być również tworzone na drodze transnitrozytacji, polegającej na bezpośrednim przeniesieniu NO^+ z białka S-nitrozylowanego na grupę tiolową białka docelowego. W proces ten zaangażowane są niskocząsteczkowe S-nitrozotiole, głównie GSNO [4].



S-nitrozylację często porównuje się do regulacji aktywności enzymów przez fosforylację/defosforylację, gdyż jest to proces odwracalny, szybki i zachodzący w ściśle określonym miejscu, ponieważ nitrozytacji ulega tylko jedna reszta cysteiny [47].

Niesymbiotyczne hemoglobiny klasy 1 (AHb1) u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) były pierwszymi zidentyfikowanymi białkami roślinnymi podlegającymi S-nitrozytacji, co prowadziło do usuwania NO i jednoczesnego tworzenia S-nitrozohemoglobiny [24, 4]. Inne białka roślinne podlegające S-nitrozytacji to, między innymi, białka chloroplastowe (np. duża podjednostka *Rubisco*), niektóre

z enzymów szlaku glikolizy (np. dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego; GAPDH [4]), białka cytoszkieletu (np. α -tubulina, β -tubulina i inne [8, 51]; tab.1). S-nitrozylacja może być skutkiem oddziaływań innych cząsteczek będących pochodnymi NO, takich jak nadtlenoazotyn (ONOO⁻) lub kompleksy metal-NO. Białka S-nitrozylowane są w dynamicznej równowadze z białkami denitrozylowanymi, w dużym stopniu dzięki działaniu glutationu (GSH), który reagując z SNO tworzy GSNO [28]. Wzrost stężenia GSNO podczas chorób roślin, wskazuje że związek ten jest źródłem NO w odpowiedzi komórek na infekcje patogenami, dlatego mechanizmy kontrolujące stężenie GSNO mogą mieć istotny wpływ na zawartość NO w komórkach roślinnych [34]. S-nitrozotiole, a w szczególności GSNO, wydają się pełnić funkcje wewnątrzkomórkowego magazynu NO [14, 50]. Synteza GSNO odgrywa bardzo ważną rolę w kontrolowaniu stężenia wolnych cząsteczek NO; ponadto GSNO postrzegany jest jako związek sygnałowy zaangażowany w odporności systemicznej typu SAR [26, 34].

ONOO⁻ posiada zdolność utleniania metioniny zarówno w procesach jedno-, jak i dwuelektronowych [23]. Jednoelektronowe utlenienie metioniny prowadzi do fragmentacji aminokwasu i wydzielenia etylenu. W wyniku dwuelektronowego utlenienia tego aminokwasu powstaje sulfotlenek metioniny. Modyfikacje reszt metioniny powstające w wyniku reakcji z ONOO⁻ powodują inaktywację białek i enzymów [21].

Wśród białek podlegających S-nitrozylacji w komórkach roślin wymieniane są także białka regulatorowe, np.: NPR1, główny regulator ekspresji genów obrony roślin oraz białko wiążące kwas salicylowy, SABP3 (ryc.1, tab.1) [34]. NPR1 jest białkiem cytoplazmatycznym zawierającym co najmniej dziesięć reszt cysteiny. Występuje w cytoplazmie głównie w postaci wysokocząsteczkowego oligomeru stabilizowanego wiązaniami disiarczkowymi [28]. W odpowiedzi komórki na atak patogenu i rosnące stężenie SA jako cząsteczki sygnałowej następuje zmiana potencjału redoks, co prowadzi do redukcji wiązań disiarczkowych w białku NPR1 przez tioredoksyny aktywowane przez SA oraz GSNOR i w konsekwencji do uwalniania monomerów. Monomery transportowane są do jądra komórkowego (ryc.1) [48], gdzie aktywują ekspresję genów zaangażowanych w odporność roślin na choroby infekcyjne; prawdopodobnie aktywacja ta następuje poprzez promowanie ponownego rozpoczęcia transkrypcji docelowych genów związanych z obroną (np. kodujących białka związane z patogenezą, PR) lub uwalnianie polimerazy RNA II. Główną rolę w utrzymaniu równowagi między monomerami i oligomerami NPR1 podczas aktywacji przez SA odgrywa S-nitrozylacja cysteiny 156, która sprzyja tworzeniu form oligomerycznych dzięki formowaniu wiązań disiarczkowych między monomerami [45]. Zablockowanie aktywności reduktazy GSNO (GSNOR), a przez to nadmierna S-nitrozylacja NPR1, wyłącza sygnalizację poprzez promowanie formacji oligomerów NPR1 [34].

SA pełni w roślinach rolę cząsteczki sygnałowej zaangażowanej w transdukcję sygnału w reakcjach obronnych lokalnych i systemicznych. W roślinach zidentyfikowano białka wiążące SA, takie jak SABP, SABP2, SABP3. SABP jest białkiem określanym jako katalaza cytozolowa, odwracalnie wiążąca SA. SABP2 to specyficzne białko o wysokim powinowactwie do SA, również zidentyfikowane w cytozolu [43]. Białko SABP3 występuje w chloroplastach, posiada zdolność wiązania SA oraz wykazuje aktywność anhidrazy węglanowej (AC). Jest to białko o silnych właściwościach antyoksydacyjnych; jest również enzymem niezbędnym w biosyntezie lipidów w chloroplastach, gdyż dostarcza CO₂ do syntezy kwasów tłuszczowych [50]. S-nitrozylacja cysteiny 280 hamuje aktywność tego enzymu oraz jego zdolność do wiązania SA. Najnowsze badania wykazały, że S-nitrozylacja białka SABP3 jest niezbędna w późniejszych stadiach odporności roślin na choroby [4, 34, 45].

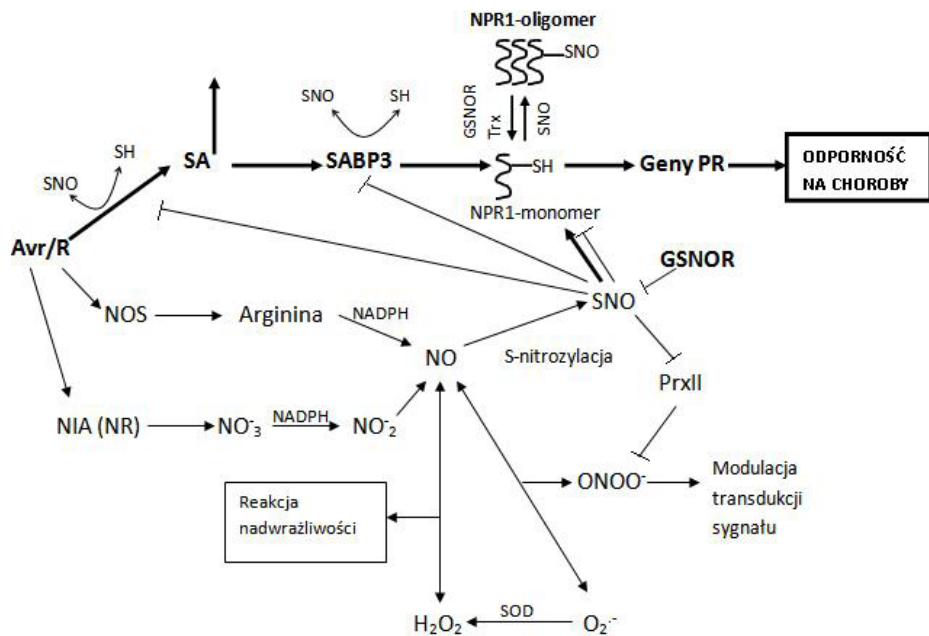
Wykazano również, że S-nitrozylacja modyfikuje aktywność różnych enzymów odgrywających ważną rolę w podstawowych, często odrębnych procesach fizjologicznych roślin, np. GAPDH oraz tioredoksyny (Trx), enzymów które po modyfikacji mogą być zaangażowane w indukowanie śmierci komórki, co wskazuje, że NO i SNO są ważnymi mediatorami w reakcji nadwrażliwości (ryc.1) [31].

Zupełnie nowe światło na znaczenie procesu S-nitrozylacji białek w komórkach roślinnych rzucają wyniki badań nad regulacją aktywności metakaspaz zawierających cysteinę w centrum katalitycznym [24]. NO może odgrywać ważną rolę jako regulator procesu PCD ponieważ poprzez S-nitrozylację miejsca katalitycznego metakaspaz powoduje hamowanie ich aktywności, a w konsekwencji zatrzymanie przebiegu PCD [9, 10, 19].

Stężenie S-nitrozotioili w komórkach roślin jest ściśle kontrolowane. Niedawno wykryto w roślinach kilka enzymów, które pośredniczą w denitrozylacji cysteiny. Dominującą rolę w tym procesie przypisuje się GSNOR [31]. Enzym ten katalizuje zależną od NADH redukcję GSNO do półproduktów, którymi są S-amino-l-glutation, a następnie S-hydroksyloamina, aż do produktów końcowych tej reakcji czyli disiarczku glutationu (GSSG) i amoniaku (NH₃) [34]. Uważa się, że enzym ten wywiera głęboki wpływ na interakcję gospodarz-patogen w odporności czynnej roślin [10]. Wyciszenie genu GSNOR u *A. thaliana* (*AtGSNOR1*) powodowało wzrost stężenia S-nitrozotioili, co skutkowało systemiczną odpornością nabytą (SAR) na *Hyaloperonospora parasitica* [28].

TABELA 1. Białka zaangażowane w reakcje obronne roślin, podlegające modyfikacjom przez RFA i/lub RFT
 TABLE 1. RNS or/and RFT modified proteins engaged in plant defense reactions

BIĄŁKO PODLEGAJĄCE MODYFIKACJI	RODZAJ MODYFIKACJI	ROŚLINA	WARUNKI W JAKICH DOSZŁO DO MODYFIKACJI	LITERA- TURA
Niesymbiotyczne hemoglobiny klasy I (AHb1)	S-nitrozylacja	<i>A. thaliana</i>	Niedotlenienie Stres azotowy	[4], [24]
Białka chloroplastowe np. duża podjednostka karboksylazy/oksygenazy 1,5-rybulozodifosforanu (Rubisco)	S-nitrozylacja	<i>B. juncea</i>	Stres chłodu	[4]
Enzymy szlaku glikolizy np. dehydrogenaza aldehydu 3-fosfogliczynowego (GAPDH)	S-nitrozylacja cysteiny 149	<i>A. thaliana</i> <i>N. tabacum</i> <i>O. sativa</i>	Stres oksydacyjny Stres osmotyczny Śmierć komórki indukowana H ₂ O ₂	[4], [31]
Białka cytoszkreletu α-tubulina i β-tubulina	S-nitrozylacja nitracja	<i>A. thaliana</i>	Rozwój rośliny Stres biotyczny Stres oksydacyjny	[51]
Białko regulatorowe SABP3	S-nitrozylacja cysteiny 280	<i>A. thaliana</i>	Odporność na choroby Stres biotyczny w odpowiedzi na <i>P. syringae</i>	[4], [8], [34], [45]
Białko regulatorowe TGAI	S-nitrozylacja cysteiny 172 lub cysteiny 287 S-glutationylacja Oksydacyjna modyfikacja białka	<i>N. attenuata</i>	Odporność na choroby Stres biotyczny	[4], [8]
Białko regulatorowe NPR-1	S-nitrozylacja cysteiny 156	<i>A. thaliana</i> , <i>N. attenuata</i>	Odporność na choroby Stres biotyczny	[4], [8], [34], [45]
Tioredoksyna (Trx)	S-nitrozylacja	<i>O. sativa</i>	Śmierć komórki indukowana H ₂ O ₂	[31]
Peroksyredoksyna II E (PrxII E)	S-nitrozylacja cysteiny 121	<i>A. thaliana</i>	Stres biotyczny HR w odpowiedzi na <i>P. syringae</i>	[4], [31]
Metakaspaza 9	S-nitrozylacja cysteiny 147	<i>A. thaliana</i>	Programowana śmierć komórki	[4], [9], [10], [19]



RYCINA 1. Udział tlenu azotu i jego pochodnych w indukcji reakcji obronnych i odporności roślin. Na podstawie [34, 49], zmodyfikowane.

Rozpoznanie elicytorów specyficznych, będących produktami genów awirulencji (Avr) przez receptor roślinny kodowany przez gen odporności (R), wyzwała kaskadę sygnałową prowadzącą do uruchomienia reakcji obronnych. W wyniku rozpoznania patogenu/elicytora, w komórce dochodzi do kumulacji kwasu salicylowego (SA), który wiąże się z białkiem regulatorowym SABP3. W przekazywaniu sygnału zależnego od SA pośredniczy również białko NPR1. W stanie nieaktywnym występuje ono w cytoplazmie w postaci oligomeru, którego podjednostki połączone są mostkami disiarczkowymi. W następstwie rozpoznania patogenu/elicytora dochodzi do monomeryzacji białka NPR1 przy udziale tioredoksyny (Trx) i reduktazy nitrozoglutationu (GSNOR). Monomery są transportowane do jądra, gdzie uruchamiają transkrypcję odpowiednich genów (PR) warunkujących odporność na choroby. W wyniku kontaktu z patogenem/elicytorem dochodzi również do aktywacji enzymów odpowiedzialnych za syntezę tlenu azotu (NO), tj. reduktazy azotanowej (NR) oraz enzymów o aktywności syntazy tlenu azotu (NOS). NO w reakcji z nadtlentkiem wodoru (H₂O₂) wyzwała reakcję nadwrażliwości, która jest charakterystycznym przejawem biochemiczno-fizjologicznej odpowiedzi roślin na patogen. W wyniku reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym (O₂⁻) powstaje jon nadtlenoazotynowy (ONOO⁻), który w komórce roślinnej może być rozkładany przez peroksyredoksynę II (PrxII). Nitrozyllacja PrxII hamuje jej zdolność do detoksykacji ONOO⁻, który może modulować przekazywanie sygnału w komórce, np. przez oksydacyjne modyfikacje białek. Reakcja nitrozyllacji powoduje powstanie w komórce S-nitrozotioili pełniących rolę sygnalizacyjną. Nitrozyllacja białka SABP3 hamuje jego aktywność, natomiast nitrozyllacja białka NPR1 sprzyja formowaniu oligomerów i wyłącza sygnalizację tego białka. Działanie S-nitrozotioili może być hamowane przez GSNOR katalizującą rozkład tych związków.

Działanie tlenu azotu i jego pochodnych w indukcji reakcji obronnych i odporności roślin: pozytywne bezpośrednie – grube linie zakończone strzałkami; pośrednie – cienkie linie zakończone strzałkami). Działanie negatywne – cienkie linie zakończone prostokątną kreską

FIGURE 1. The role of nitric oxide and its derivatives in induction of defense reactions and plant resistance. Details in the text. According to [34,49], modified.

Recognition of specific effectors (products of Avr genes) by a receptor encoded by the plant resistance gene (R) triggers a signaling cascade leading to the defense reactions. As a result of the pathogen/elicitor recognition salicylic acid (SA) accumulates in the cell and binds to the regulatory protein SABP3. Transmission of the SA-dependent signal is mediated by NPR1 protein present in an inactive state in the cytoplasm in the form of an oligomer whose subunits are linked via disulfide bonds. After pathogen/elicitor recognition, NPR1 protein undergoes monomerisation by thiorredoxin (Trx) and S-nitrosoglutatione reductase (GSNOR). The monomers are transported to the nucleus where transcription of selected genes (e.g. PR) starts, which leads to disease resistance. After pathogen/elicitor recognition the enzymes responsible for the synthesis of nitric oxide (NO), such as nitric oxide synthase (NOS) and nitrate reductase (NR), become activated. NO reacts with H_2O_2 which triggers a hypersensitivity reaction – a characteristic manifestation of biochemical and physiological responses of plants to pathogen/elicitor challenge. NO may also react with superoxide anion (O_2^-) to form peroxynitrite ion ($ONOO^-$) which in a plant cell may be degraded by peroxiredoxin II (PrxII). When PrxII undergoes nitrosylation its ability to detoxify $ONOO^-$ is inhibited and $ONOO^-$ can modulate signal transduction in the cell, e.g., by oxidative modification of proteins. Nitrosylation reaction leads to the formation of the S-nitrosothiols involved in signal transduction. SABP3 protein nitrosylation inhibits its activity and NPR1 protein nitrosylation promotes formation of oligomers and switches off signaling of this protein. S-nitrosothiols action can be inhibited by GSNOR catalyzing decomposition of these compounds. Influence of NO and its derivatives on induction of defense reactions and plant resistance: positive direct effects are denoted by solid lines ending in arrows, whereas indirect effects are denoted by slim lines ending in arrows. Negative influence is depicted by slim lines ending in bars

OKSYDACYJNE MODYFIKACJE BIAŁEK

RFT i RFA są zaangażowane w procesy transdukcji sygnału, jednak gdy stężenie utleniaczy przekracza potencjał antyoksydacyjny komórki dochodzi do zaburzenia równowagi redoks, co staje się przyczyną modyfikowania białek, lipidów i kwasów nukleinowych, a w rezultacie uszkodzenia szeregu struktur komórkowych [19, 20, 36]. Istnieją dwie koncepcje dotyczące mechanizmu działania RFT w komórce: jako czynnika zmieniającego konformację białka docelowego lub zmieniającego wewnątrzkomórkowy potencjał oksydoredukcyjny [7]. H_2O_2 jest najbardziej stabilną formą wśród RFT, posiada zdolność swobodnego przemieszczania się przez błony biologiczne, a ponadto wykazano, że przenika przez akwaporyny błony komórkowej [25]. H_2O_2 może oddziaływać z różnymi składnikami komórki, np. modyfikować strukturę białek poprzez reagowanie z grupami tiolowymi reszt aminokwasów [17, 29].

Reakcje RFT i RFA z białkami prowadzą do modyfikacji reszt aminokwasowych, modyfikacji grup prostetycznych oraz agregacji lub fragmentacji cząsteczek białkowych, co może być przyczyną zmian patologicznych [6]. Dodatkowo przy obniżonej skuteczności działania układów antyoksydacyjnych i proteolitycznych, dochodzi do gromadzenia utlenionych produktów białkowych [22, 40].

Inaktywacja białek w obecności H_2O_2 może zachodzić, między innymi, poprzez: utlenianie metali w ich centrach aktywnych (np. Cu, Zn lub Fe w dysmutazie ponadtlenkowej), nieodwracalne utlenianie grup -SH w łańcuchach bocznych aminokwasów (cysteina) do kwasów sulfinowego i cysteinowego [23], utlenianie grup -OH w łańcuchach bocznych aminokwasów (histrydina, arginina, lizyna) do grup ketonowych lub aldehydowych, utlenianie aminokwasów w rdzeniu łańcucha polipeptydowego białka, co prowadzi do powstawania fragmentów łańcucha polipeptydowego z N-terminalnymi grupami ketonowymi lub aldehydowymi [18, 39].

Wyjątkowo wrażliwe na atak RFT są reszty aminokwasów aromatycznych. W wyniku utleniania reszt tyrozylowych poprzez włączanie dodatkowej grupy hydroksylowej do pierścienia aromatycznego powstaje 3,4-dihydroksyfenyloalanina lub dochodzi do tworzenia wiązań krzyżowych pomiędzy pierścieniami aromatycznymi dwóch cząsteczek tego aminokwasu, co prowadzi do powstania 2,5-dityrozyny [40]. Co więcej, białka mogą być również utleniane w reakcjach z produktami peroksydacji lipidów, takimi jak 4-hydroksy-2-nonenal oraz w wyniku koniugacji z cukrami o właściwościach redukujących lub ich utlenionymi produktami [39].

W wyniku dwuelektronowego utlenienia reszty cysteiny i innych związków tiolowych takich jak GSH czy albumina przez ONOO⁻ powstają wiązania disiarczkowe, wywierające duży wpływ na topologię białek. Tworzenie tych wiązań może być istotnym mechanizmem prowadzącym do inaktywacji wielu enzymów, np. hydroksylaz tyrozyny i tryptofanu. Modyfikacje grup tiolowych cysteiny prowadzą ponadto do tworzenia kwasów sulfenowych (SOH), sulfinowych (SO₂H), sulfonowych (SO₃H) (ryc. 2). Grupy sulfenowe są bardzo niestabilne, co sprzyja formowaniu kwasu sulfinowego i sulfonowego [34]. W stresie oksydacyjnym oprócz tworzenia pochodnych sulfinowych i sulfonowych dochodzi również do powstawania nadmiaru wiązań disiarczkowych lub mieszanych disiarczków, co może powodować niewłaściwe fałdowanie białek i ich agregację [16].

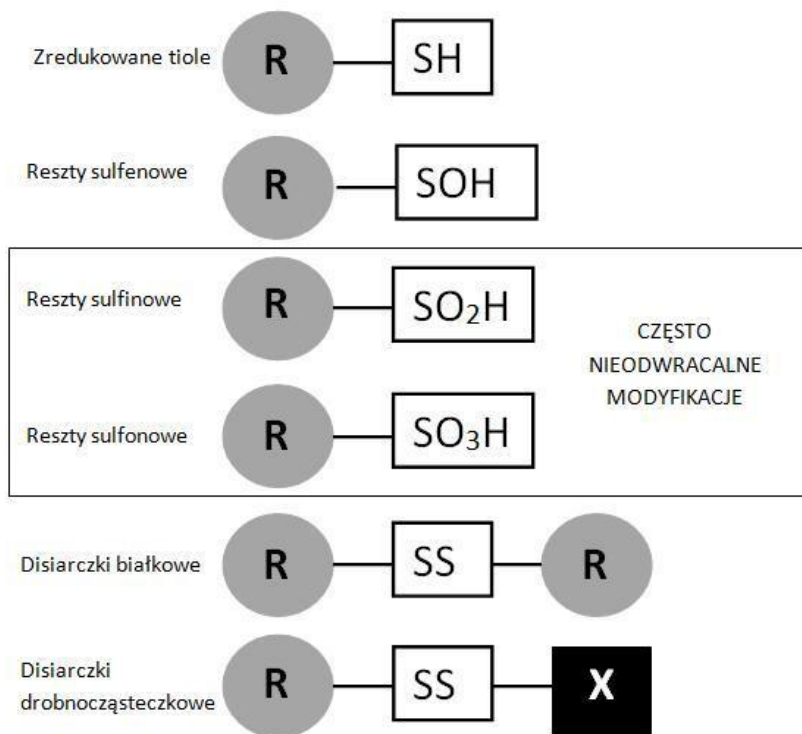
Modyfikacje oksydacyjne białek mogą zmieniać funkcje białek zawierających reszty cysteiny w centrach aktywnych lub w miejscach regulatorowych. Mogą się one tworzyć w obrębie jednej cząsteczki powodując jej zmiany konformacyjne, mogą też dotyczyć oddziaływań między cząsteczkami prowadząc do ich agregacji. Większość tych modyfikacji jest odwracalna. Wiązania disiarczkowe i produkty S-nitrozylacji są redukowane odpowiednio przez tioredoksyny (Trx), glutaredoksyny (Grx) i peroksyredoksyny (Prx). Grx mogą także katalizować S-glutationylację niektórych białek w obecności rodników tiolowych [27, 16, 7].

Ważną rolę w detoksykacji ONOO⁻ w komórkach roślin przypisuje się ostatnio peroksyredoksynie II E (PrxIIIE), co potwierdza udział tego białka w regulacji współdziałania NO i RFT [27]. S-nitrozylacja białka PrxIIIE znosi zdolność tego enzymu do detoksykacji ONOO⁻ [45], co sugeruje, że S-nitrozylacja PrxIIIE pod-

czas reakcji obronnej roślin, regulująca funkcję antyoksydacyjną tego enzymu, może przyczynić się do inicjowania reakcji HR [31].

Trx to wielofunkcyjne białka cytozolowe powszechnie występujące we wszystkich typach komórek. Szczególnie ważną rolę w odpowiedzi roślin na atak patogenu przypisuje się Trx-h5 [4, 50]. Podczas infekcji wzmożona synteza SA indukuje Trx-h5 do redukcji wiązania disiarczkowego oligomeru białka NPR1, co zapobiega jego oligomeryzacji i powoduje uwolnienie monomerów [49] (ryc.1).

Prx to peroksydazy grup tiolowych wykorzystujące Trx jako donory wodoru. Redukują H_2O_2 i wodoronadtlenki lipidowe. PrxIII jest homodimerem występującym wyłącznie w mitochondriach. Cysteina w centrum aktywnym tego enzymu jest utleniana do cysteina-OH i tworzy disiarczek z sąsiednią cysteiną, który jest redukowany przez Trx2 [1].



RYCINA 2. Modyfikacje oksydacyjne białek. R – organiczna grupa funkcyjna, np. grupa tiolowa, X- drobnocząsteczkowy związek chemiczny, np. glutation

FIGURE 2. Oxidative modifications of proteins. R – organic functional group such as thiol group, X – small molecule compound such as glutathione

Reakcja powstawania kwasów sulfinowych i sulfonowych była do niedawna uważana za modyfikację nieodwracalną, jednak ostatnio w komórkach roślinnych, podobnie jak w komórkach zwierzęcych, zidentyfikowano sulfiredoksyny (Srx) – enzymy odpowiedzialne za zależną od ATP redukcję tych kwasów [7, 30]. Srx są również zdolne do redukcji sulfonowych kwasów tłuszczowych.

Inną modyfikacją potranslacyjną białek, występującą w warunkach fizjologicznych, o znaczeniu regulatorowym i sygnalizacyjnym, jest S-glutationylacja. Ta odwracalna modyfikacja reszt cysteinowych polega na sprzężeniu GSH z białkami z wytworzeniem mieszanych disiarczków (białko-S-SG) i jest porównywana z fosforylacją białek [7]. Jej najważniejszą rolą w stresie oksydacyjnym jest prawdopodobnie ochrona białek przed nieodwracalnymi zmianami oksydacyjnymi polegającymi na dalszym utlenianiu siarki w cysteinie, nawet kosztem okresowego zmniejszenia aktywności enzymatycznej wynikającego np. ze zmian konformacyjnych białka [16]. Wśród białek ulegających modyfikacji poprzez S-glutationylację wymieniane są np. fosfatazy i kinazy białkowe, a u zwierząt czynniki transkrypcyjne NF- κ B [13].

NITRACJA

Coraz więcej dowodów wskazuje, że pochodne NO wywierają istotny, modyfikujący wpływ na struktury komórkowe [15]. ONOO⁻, który łatwo przenika przez błony biologiczne i posiada silne właściwości utleniające i nitrujące [4, 38], wykazuje wszechstronne cytotoksyczne działanie poprzez jedno- i dwuelektronowe utlenianie lub nitrację i nitrozylację wielu cząsteczek. Generuje, między innymi, powstawanie nitrotyrozyny [44, 48]. Potranslacyjne nitrowanie tyrozyny polega na dodaniu grupy nitrowej w pozycji orto (w odniesieniu do grupy hydroksylowej) w pierścieniu aromatycznym. ONOO⁻ wywołuje ponadto peroksydację lipidów oraz uszkodzenia oksydacyjne DNA [49]. Nitrowanie reszt tyrozylowych może zmienić konformację białka w sposób podobny do S-nitrozylacji i wpłynąć na jego aktywność katalityczną, lokalizację lub interakcję białko-białko [19]. Ponadto protonacja ONOO⁻ może być źródłem NO₂ oraz bardzo reaktywnego rodnika \cdot OH i wtórnych produktów metabolizmu NO wytworzonych w obecności utleniaczy [4].

Jedną z najlepiej udokumentowanych funkcji NO w organizmach żywych jest jego regulujący wpływ na szlak sygnalizacyjny z udziałem cGMP poprzez modyfikację aktywności cytoplazmatycznej cyklicznej guanylanowej [51]. Enzym ten jest silnie aktywowany przez oddziaływanie NO z żelazem w jego centrum aktywnym, czego skutkiem jest wzmożona produkcja cGMP, a w ślad za tym aktywacja wielu szlaków sygnałowych uruchamianych przez cykliczną ADP-rybozę czy zmiany stężenia Ca²⁺ [47]. Wykazano, że w komórkach roślinnych, podobnie jak w zwierzęcych, NO moduluje aktywność kinaz białkowych, które odgrywają kluczową rolę w transdukcji sygnału, w tym kaskady MAPK, kinazy białkowej c. Do zależnej od NO regulacji

aktywności kinaz białkowych dochodzi przez ich nitrozylację lub poprzez modulację czynników sygnałowych, takich jak cGMP, Ca^{2+} lub fosfatazy białkowe [15].

Wykazano, że ONOO^- może również inicjować wolnorodnikowe utlenianie lipidów, co w rezultacie prowadzi do powstania wodoronadtlenków lipidów, a nawet znitrowanych kwasów tłuszczowych [21]. W warunkach fizjologicznych znitrowane kwasy tłuszczowe pełnią rolę cząsteczek sygnałowych. ONOO^- uszkadza także DNA, szczególnie poprzez reakcję z deoksyguaniną, która prowadzi do tworzenia 8-oksoguaniny oraz 8-nitroguaniny, tj. związku aktywowującego jądro enzym – polimerazę poli(ADP-rybozy) – ostatecznie powodując śmierć komórek [49].

Uważa się jednak, że głównym obiektem oddziaływania ONOO^- są białka, a jego bezpośrednie reakcje z tymi cząstkami dotyczą tylko trzech reszt aminokwasowych: cysteiny, metioniny i tryptofanu. Inne reszty aminokwasowe, przede wszystkim reszty tyrozyny, fenyloalaniny i histydyny, są modyfikowane przez produkty rodnikowe rozkładu ONOO^- w obecności CO_2 : $\cdot\text{OH}$, NO_2 , $\text{CO}_3\cdot^-$. Konsekwencją tych reakcji jest utlenianie, nitracja (reszty tyrozyny i tryptofanu) lub nitrozylacja reszt aminokwasowych (reszt cysteiny) [2]. Rodniki $\text{CO}_3\cdot^-$ reagują z resztą tyrozyny poprzez oderwanie wodoru z grupy hydroksylowej, natomiast w odróżnieniu do rodników $\cdot\text{OH}$, nie są przyłączane do pierścienia aromatycznego. Dzięki temu może powstawać więcej rodników tyrozylowych, które następnie ulegają rekombinacji z $\cdot\text{NO}_2$ tworząc nitrotyrozynę [5].

W reakcji nitracji grupa NO_2^- zostaje przyłączona do pierścienia aromatycznego tyrozyny w wyniku czego powstaje nitrotyrozyna [41]. Mimo, że dołączona jest grupa NO_2^- a nie NO , nitracja uważana jest za modyfikację wywołaną przez NO , ponieważ powstaje w wyniku działania ONOO^- – pochodnej NO [14, 47]. Przez długi czas nitrowanie tyrozyny uważano za swoisty marker aktywności ONOO^- *in vivo*. Późniejsze doświadczenia wykazały jednak, że nitrowanie tyrozyny może zachodzić bez udziału ONOO^- . Tworzenie 3-nitrotyrozyny może mieć miejsce podczas utleniania NO_2^- do $\cdot\text{NO}_2$ w obecności H_2O_2 [4, 49]. Reaktywność ONOO^- zależy od warunków środowiskowych i wymaga obecności akceptorów pary elektronowej takich jak CO_2 , metale i protony [33]. Zdolność ONOO^- do utleniania aminokwasów siarkowych i do nitrowania aminokwasów aromatycznych zależy od dostępności CO_2 w miejscu reakcji. ONOO^- oraz produkty jego izomeryzacji lub reakcji z CO_2 mogą utleniać różne związki chemiczne [21]. O ile sam ONOO^- bardzo silnie utlenia resztę metioniny do sulfotlenku, o tyle zdolność do przeprowadzenia takiej reakcji przez pochodną powstającą z ONOO^- i CO_2 ($\text{O}=\text{NOOCO}_2$ lub O_2NOCO_2) jest znacznie mniejsza [40]. Powstający związek silniej nitruje reszty aminokwasów aromatycznych niż sam ONOO^- . W środowisku, w którym występuje niskie stężenie CO_2 , przeważa utlenianie metioniny, natomiast przy wysokim nasyceniu CO_2 dominuje nitrowanie tyrozyny i tryptofanu [44]. Aktywność ONOO^- przejawia się nie tylko utlenianiem aminokwasów siarkowych i nitrowaniem aminokwasów aromatycznych, ale prowadzi także do tworzenia grup karbonylowych i do fragmentacji białek [47].

ONOO⁻ może również reagować z tryptofanem tworząc nitrotryptofan. Reszta tryptofanu może być także modyfikowana przez rodnikowe produkty rozkładu ONOO⁻. Niestety rola tej modyfikacji w komórkach nie jest jeszcze poznana [49].

Sugeruje się, że nitracja jest mechanizmem transdukcji sygnału, a wzrost ilości znitrowanych białek odnotowano w różnych gatunkach roślin w warunkach stresowych [4]. Jednak mimo intensywnie prowadzonych badań, jak dotąd jest niewiele danych potwierdzających rolę procesu nitracji białek w regulacji aktywności enzymów w komórkach roślinnych [24].

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich kilku lat wiele uwagi poświęca się badaniom nad bezpośrednimi modyfikacjami składników komórek roślinnych, w tym głównie białek, powodowanymi przez RFT i RFA. Coraz więcej dowodów potwierdza, że szczególne znaczenie w regulowaniu wielu procesów fizjologicznych w roślinach, w tym odpowiedzi obronnych na atak patogenów, mają modyfikacje reszt cysteiny (S-nitrozylacje) i tyrozyny (nitracje), zmieniające aktywność licznych białek. Są one postrzegane jako modyfikacje o znaczeniu sygnałowym. Wyniki wielu badań wyraźnie wskazują na S-nitrozotiole jako na ważny element szlaków sygnałowych w odpowiedzi komórek roślinnych na atak patogenów, a wzrost stężenia GSNO podczas infekcji rośliny sugeruje, że związek ten może być źródłem NO w tym procesie. W komórkach zwierząt kluczowym enzymem odpowiedzialnym za zachowanie homeostazy S-nitrozotiole jest GSNOR. Ostatnio pojawia się coraz więcej doniesień przemawiających za tym, że enzym ten może odgrywać podobną rolę w komórkach roślinnych. Sugeruje się, że modulacja aktywności GSNOR w roślinach ma znaczący wpływ na ich zdolność do obrony przed patogenami. Wydaje się, że wiele nowych danych dotyczących kontrolowania szlaków transdukcji sygnałów z udziałem RFT i RFA oraz ich pochodnych w komórkach roślin może dostarczyć dokładne poznanie zaangażowania w nich tioredoksyn, peroksyredoksyn, glutaredoksyn oraz sulfiredoksyn.

PODZIĘKOWANIA

Praca współfinansowana z projektu „Stypendia wspierające innowacyjne badania naukowe doktorantów” przyznane na realizację prac badawczych dla uczestników studiów doktoranckich, finansowanych w ramach działania 2.6 Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego, ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego oraz ze środków Budżetu Państwa, w ramach projektu nr Z/2.10/II/2.6/1/09 oraz projektu pt. „Doktoranci – Regionalna Inwestycja w Młodych Na-

ukowców D-RIM” współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytet VIII, Poddziałanie 8.2.1., a także ze środków Uniwersytetu Łódzkiego, grant Nr 506/819

LITERATURA

- [1] AHSAN MK, LEKLI I, RAY D, YODOI J, DAS DK. Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: an implication of redox gene therapy in the heart. *ARS* 2009; **11**: 2741-2758.
- [2] Alvarez B, RADI R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 2003; **25**: 295-311.
- [3] ARASIMOWICZ M, FLORYSZAK-WIECZOREK J. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. *Plant Sci* 2007; **172**: 876-887.
- [4] ASTIER J, RASUL S, KOEN E, MANZOOR H, BESSON-BARD A, LAMOTTE O, JEANDROZ S, DURNER J, LINDERMAYR C, WENDEHENNE D. S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Sci* 2011; **181**: 527- 533.
- [5] AUGUSTO O, BONINI MG, AMANSO AM., LINARES E, SANTOS CCX. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* 2002; **32**: 841-859.
- [6] BARTOSZ G. Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- [7] BARTOSZ G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol* 2009; **77**: 1303-1315.
- [8] BAUDOIN E. The language of nitric oxide signaling. *Plant Biol* 2011; **13**: 233-242.
- [9] Belenghi B, ROMERO-PUERTAS MC, VERCAMMEN D, BRACKENIER A, INZÉ D, DELLEDDONNE M, VAN BREUSEGEM F. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol Chem* 2007; **282**(2): 1352-1358.
- [10] BENHAR M, FORRESTER MT, STAMLER JS. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**: 721- 732.
- [11] BENITEZ-ALFONSO Y, JACKSON D, MAULE A. Redox regulation of intercellular transport. *Protoplasma* 2011; **248**: 131-140.
- [12] BHATTACHARJEE S. The language of reactive oxygen species signaling in plants. *J Bot* 2012; 2012: 1-22.
- [13] BILSKA A, KRZYCZYK A, WŁODEK L. Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Postępy Hig Med Dośw* 2007; **61**: 438-453.
- [14] CHAKI M, FERNÁNDEZ-OCAÑA AM, VALDERRAMA R, CARRERAS A, ESTEBAN FJ, LUQUE F, GÓMEZ-RODRÍGUEZ MV, BEGARA-MORALES JC, CORPAS FJ, BARROSO JB. Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower–mildew interaction. *Plant Cell Physiol* 2009; **50**(2): 265-279.
- [15] COURTOIS C, BESSON A, DAHAN J, BOURQUE S, DOBROWOLSKA G, PUGIN A, WENDEHENNE D. Nitric oxide signalling in plants: interplay with Ca²⁺ and protein kinases. *J Exp Bot* 2008; **59**(2): 155-163.
- [16] DALLE-DONNE I, MILZANI A, GAGLIANO N, COLOMBO R, GIUSTARINI D, ROSSI R. Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *ARS* 2008; **10**: 445-73.
- [17] DESIKAN R, HANCOCK J, NEILL S. Reactive oxygen species as signaling molecules. In: Smirnov N. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2005; 169-196.
- [18] DĘBSKA K, BOGATEK R, GNIAZDOWSKA A. Karbonylacja białek i jej znaczenie dla procesów fizjologicznych u roślin. *Postępy Biochem.* 2012; **58**: 34-43.
- [19] FERREIRA LC, CATANEAO AC. Nitric oxide in plants: a brief discussion on this multifunctional molecule. *Sci Agr* 2010; **67**(2): 236-243.
- [20] FOYER CH, NOCTOR G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 2005; **17**: 1866-1875.
- [21] GĘBICKA L, DIDIK J. Nadtlenoazotyn jako czynnik wywołujący stres oksydacyjny. *Postępy Biochem* 2010; **56**(2): 103-106.

- [22] GĘBICKI JM, BARTOSZ G. Rola białek jako przekaźników uszkodzeń indukowanych przez reaktywne formy tlenu. *Postępy Biochem* 2010; **56**: 115-123.
- [23] GILL SS, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 2010; **48**: 909-930.
- [24] GNIAZDOWSKA A, KRASUSKA U, CZAJKOWSKA K, WIERZBICKI M, BOGATEK R. Tlenek azotu i hemoglobiny roślinne. *Postępy Biol Komórki* 2009; **36**(2): 233-250.
- [25] GRACIA-MEDRANO RME, DE L. MIRANDA-HAM M. Analysis of elicitor induced cell viability changes in *Lycopersicon esculentum* Mill. suspension culture by different methods. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 2003; **39**: 236-239.
- [26] GRZEGORZEWSKA W, JAWORSKI K, SZMIDT-JAWORSKA A. Rola tlenu azotu w odpowiedzi roślin na stres abiotyczny. *Postępy Biol Komórki* 2009; **36**(4): 663-678.
- [27] HARRI Y, MITTLER R. The ROS signaling network of cells. In Del Rio LA, Puppo A eds. *Reactive oxygen species in plant signaling*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2009; 165-174.
- [28] HONG JK, YUN BW, KANG JG, RAJA MU, KWON E, SORHAGEN K, CHU C, WANG Y, LOAKE GJ. Nitric oxide function and signaling in plant disease resistance. *J Exp Bot* 2008; **59**(2): 147-154.
- [29] KRASUSKA U, GNIAZDOWSKA A, BOGATEK R. Rola ROS w fizjologii nasion. *Kosmos. Probl Nauk Biol* 2011; **60**(1/2): 113-128.
- [30] IGLESIAS-BAENA I, BARRANCO-MEDINA S, LAZARO-PAYO A, LOPEZ-JARAMILLO FJ, SEVILLA F, LAZARO JJ. Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulfenic form of 2-Cys peroxiredoxin. *J Exp. Bot* 2010; **61**: 150-9-1521.
- [31] LIN A, WANG Y, TANG J, XUE P, LI C, LIU L, HU B, YANG F, LOAKE GJ, CHU C. Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. *Plant Physiol* 2012; **158**: 451-464.
- [32] LOVE AJ, JOEL J, MILNER, SADANANDAM A. Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. *Trends Plant Sci* 2008; **13** (11): 589-595.
- [33] ŁUGOWSKI M, SACZKO J, KULBACKA J, BANAŚ T. Reaktywne formy tlenu i azotu. *Pol Merkuriusz Lek* 2008; 31 (185): 313-317.
- [34] MALIK SI, HUSSAIN A, YUN B-W, SPOEL SH, LOAKE GJ. GSNOR-mediated denitrosylation in the plant defense response. *Plant Sci* 2011; **181**: 540-544.
- [35] MILLAR AH, DAY DA. Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett* 1996; **389**: 155-158.
- [36] MITTLER R, POULOS TL. Ascorbate peroxidase. In Smirnoff N. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005; 87-100.
- [37] MÖLLER IM, JENSEN PE, HANSSON A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2007; **58**: 459-481.
- [38] MUR LAJ, CARVER TLW, PRATS E. NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J Exp Bot* 2006; **57**(3): 489-505.
- [39] OLKO A, KUJAWSKA M. Podwójna rola H₂O₂ w odpowiedzi roślin na działanie warunków stresowych. *Kosmos. Probl Nauk Przyr* 2011; **60**(1/2): 161-171.
- [40] PONCZEK MB, WACHOWICZ B. Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami. *Postępy Biochem* 2004; **51**(2): 140-145.
- [41] SCHÖNEICH C, SHAROV VS. Massspectrometry of protein modifications by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 2006; **41** (10): 1507- 1520.
- [42] SHIVA S, DARLEY-USMAR VM. Control of the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway under pathological and physiological conditions. *Life* 2001; **55**(10-11): 585-590.
- [43] SLAYMAKER DH, NAVARRE DA, CLARK D, DEL POZO O, MARTIN GB, KLESSIG DF. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**(18): 11640-11645.

- [44] SOHAL RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**: 37-44.
- [45] SPOEL SH, LOAKE GJ. Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2011; **14**: 358-364.
- [46] STARCK Z. Roślina *in vivo* – sztuka funkcjonalności wzorowanej na procesach zachodzących u zwierząt. *Wiad Bot* 2011; **55**(1/2): 9-25.
- [47] SZUBA A, WOJTASZEK P. Modyfikacje strukturalne białek wywołane przez tlenek azotu. *Postępy Biochem* 2010; **56**(2): 107-114.
- [48] TADA Y, SPOEL SH, PAJEROWSKA-MUKHTAR K, MOU Z, SONG J, WANG C, ZUO J, DONG X. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 2008; **321**: 952-955.
- [49] VANDELLE E, DELLEDONNE M. Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Sci* 2011; **181**: 534-539.
- [50] WANG YQ, FEECHAN A, YUN BW, SHAFIEI R, HOFMANN A, TAYLOR P, XUE P, YANG FQ, XIE ZS, PALLAS JA, CHU CC, LOAKE GJ. S-Nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *J Biol Chem* 2009; **284**(4): 2131-2137.
- [51] YEMETS AI, KRASYLENKO YA, LYTVYN DI, SHEREMET YA, BLUME YB. Nitric oxide signalling via cytoskeleton in plants. *Plant Sci* 2011; **181**: 545-554.
- [52] ZABŁOCKA A, JANUSZ M. Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Postępy Hig Med Dośw* 2008; **62**: 118-124.

Redaktor prowadzący – Janusz Maszewski

Otrzymano: 31.07.2012

Przyjęto: 20.08.2012

Urszula Małolepsza

Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin

Uniwersytet Łódzki

ul. Banacha 12/16

90-237 Łódź

tel.: (0-42) 635-44-19

e-mail: ulmal@biol.uni.lodz.pl

