

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Histochemická detekce aktivity
S-nitrosoglutathionreduktasy v rostlinách**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jana Václavková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Termín odevzdání práce:	6. 5. 2011

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 6. 5. 2011

Děkuji Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za odborné vedení mé bakalářské práce, za trpělivost, za poskytnutí literatury, informací a odborných konzultací potřebných k vypracování této bakalářské práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Jana Václavková
Název práce	Histochemická detekce aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy v rostlinách
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	Reaktivní formy dusíku (RNS) jsou důležité v buněčné signalizaci, jsou tvořeny v mnoha fyziologických a patologických procesech. RNS zahrnují oxid dusnatý a další příbuzné molekuly jako peroxynitrit a S-nitrosothioly. Jedním z mechanismů účinku NO v buňkách je S-nitrosace cysteinových residuí za vzniku S-nitrosylovaných proteinů, nebo nízkomolekulárních S-nitrosothiolů. Nejrozšířenějším S-nitrosothiolem je S-nitrosoglutathion, který je odbouráván S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR). S-(hydroxymethyl)glutathion, spontánní adukt glutathionu a formaldehydu, je dalším významným substrátem pro GSNOR. Vznik S-(hydroxymethyl)glutathionu a jeho následná degradace GSNOR je mechanismem detoxifikace formaldehydu. Vyskytuje se téměř u všech živých organismů a chrání je proti nitrosativnímu stresu. V této práci byla zavedena histochemická metoda detekce aktivity GSNOR založená na skutečnosti, že GSNOR oxiduje S-hydroxymethylglutathion za současné redukce NAD^+ na NADH. Vzniklé NADH redukuje nitrotetrazoliovou modř na formazán, který tvoří modrý precipitát.
Klíčová slova	reaktivní formy dusíku, S-nitrosothioly, S-nitrosoglutathion, S-hydroxymethylglutathion, S-nitrosoglutathionreduktasa, alkoholdehydrogenasa třídy III, histochemická detekce, nitrotetrazoliová modř
Počet stran	58
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Jana Václavková
Title	Histochemical detection of S-nitrosogluthathione reductase activity in plants
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2011
Abstract	<p>Reactive nitrogen species (RNS) are important in cell signalling and are formed in a variety of physiological and pathological processes. RNS include nitric oxide and other related molecules such as peroxy nitrite and S-nitrosothiols. One of the actions of NO in cells is S-nitrosation reaction of cysteine residues to form S-nitrosylated proteins or low molecular weight S-nitrosothiols. The most common S-nitrosothiol is S-nitrosogluthathione, which is catabolized by S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR). S-hydroxymethylglutathione, spontaneous adduct of formaldehyde and glutathione, is also important substrate for GSNOR. GSNOR plays role in formaldehyde detoxifying metabolic pathways, because it degrades S-hydroxymethylglutathione. GSNOR is found in almost all living organisms and protects them from nitrosative stress. In this work the histochemical assay to detect GSNOR activity was implemented, it is based on the fact that GSNOR oxidizes S-hydroxymethylglutathione and reduces NAD^+ to NADH, which consecutively reduces nitroblue tetrazolium to a blue formazan precipitate.</p>
Keywords	Reactive nitrogen species, S-nitrosothiols, S-nitrosogluthathione, S-hydroxymethylglutathione, S-nitrosogluthathione reductase, class III alcohol dehydrogenase, histochemical assay, nitroblue tetrazolium
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

Cíle práce	7
I. Teoretická část	8
1. Reaktivní formy dusíku	8
2. S-nitrosylace a S-nitrosothioly – relativně stabilní metabolity oxidu dusnatého	9
2.1. Bioaktivita S-nitrosylovaných proteinů	11
2.2. S-nitrosoglutathion	12
3. S-nitrosoglutathionreduktasa	13
3.1. Charakterizace S-nitrosoglutathionreduktasy u živočichů	16
3.1.1. S-nitrosoglutathionreduktasa u člověka	18
3.2. Charakterizace S-nitrosoglutathionreduktasy u rostlin	20
3.2.1. Aktivita S-nitrosoglutathionreduktasy ve stresových podmínkách u rostlin	21
4. Další enzymy s S-nitrosoglutathionreduktasovou aktivitou	25
5. Přehled publikovaných histochemických metod detekce aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy	26
II. Experimentální část	29
6. Materiál a metody	29
6.1. Chemikálie	29
6.2. Rostlinný materiál	29
6.3. Metody	29
6.3.1. Příprava S-nitrosoglutathionu	29
6.3.2. Příprava čerstvého formaldehydu z paraformaldehydu	30
6.3.3. Úprava rostlinného materiálu pro histochemii	30
6.3.4. Histochemická detekce GSNOR – původní metoda	30
6.3.5. Histochemická detekce GSNOR – upravená metoda	31
6.3.6. Kvantifikace formazanu po histochemické detekci GSNOR v semenáčcích <i>A. thaliana</i>	31
6.3.7. Příprava rostlinných extraktů	32
6.3.8. Spektrofotometrické měření aktivity GSNOR	33
6.3.9. Stanovení množství proteinů metodou Bradfordové	33
6.3.10. Nativní elektroforéza a detekce GSNOR na gelech	33

7. Výsledky a diskuse	34
7.1. Aktivita S-nitrosoglutathionreduktasy u <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
7.2. Aktivita S-nitrosoglutathionreduktasy u <i>Arabidopsis thaliana</i> při teplotním stresu	39
7.3. Aktivita S-nitrosoglutathionreduktasy u hrachu (<i>Pisum sativum</i>)	43
Závěr	51
Literatura	52
Seznam použitých zkratk	57

CÍLE PRÁCE

I. Teoretická část

Vypracovat literární rešerši shrnující význam enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy v regulaci S-nitrosace a S-nitrosothiolů v rámci mechanismů účinku oxidu dusnatého v buňkách a vypracovat přehled publikovaných histochemických metod detekce aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy.

II. Experimentální část

Zavést protokoly histochemické detekce aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy v rostlinách a optimalizovat metodu na vybraných modelových rostlinách.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1. Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species, RNS) jsou důležité v buněčné signalizaci. Jsou tvořeny v mnoha fyziologických a patologických procesech. Většina RNS je krátce žijící forma radikálů a je obtížné přesně změřit jejich množství (Moore & Mani, 2002). Termínem RNS se označuje oxid dusnatý (NO) a další příbuzné molekuly jako peroxodusitan (ONOO⁻), S-nitrosothioly, S-nitrosoglutathion (Corpas et al., 2008).

Oxid dusnatý ($\bullet\text{N}=\text{O}$) je rozšířeným vnitrobuněčným a mezibuněčným poslem se širokým spektrem regulačních funkcí mnoha fyziologických a patologických procesů v různých typech organismů. Poprvé byl popsán u savců, u nichž se účastní procesů vasorelaxace, neurotransmise, cytotoxicity, regulace imunitního systému a dalších buněčných a tkáňových pochodů. Později byla potvrzena i úloha NO při regulaci rostlinných fyziologických procesů i obranných reakcí ve stresových podmínkách. NO se u rostlin účastní klíčení, růstu, kvetení, pohybu průduchů, metabolismu buněčných organel, zrání, senescence a programované buněčné smrti. Ve stresových podmínkách se podílí na rostlinné odpovědi a mechanismech odolnosti na různé formy biotického a abiotického stresu (Piterková et al., 2008). U savců je NO produkován zejména enzymy NO syntasami (NOS, EC 1.14.13.39), byly popsány tři isoformy tohoto enzymu: endoteliální NOS, neuronální NOS a indukibilní forma NOS (iNOS). U rostlin bylo popsáno celkem šest enzymů, které mohou katalyzovat syntézu NO v rostlinných buňkách (enzym podobný NOS, nitrátreduktasa (EC 1.7.1.1), nitrit:NO reduktasa, xanthinoxidasa (EC 1.17.3.2), křenová peroxidasa (EC 1.11.1.7) a cytochrom P450). K syntéze NO v rostlinách mohou přispívat také neenzymové procesy. Při nízkém pH v apoplastu dusitan neenzymově dismutuje na NO a dusičnan. Při fyziologickém pH může být dusitan chemicky redukován kyselinou askorbovou na NO a kyselinou askorbová se oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou. Dalším neenzymovým mechanismem může být světlem zprostředkovaná přeměna NO₂ na NO katalyzovaná karotenoidy. NO společně s dalšími reaktivními formami dusíku a kyslíku zprostředkovává buněčné účinky hormonů na molekulární úrovni. NO produkováný nitrátreduktasou způsobí uzavření stomat vyvolané kyselinou abscisovou, auxin kyselina indolactová indukuje syntézu NO v kořenech okurky, činnost NO a ethylenu při dozrávání a senescenci rostlinných pletiv je antagonistická, cytokininy indukují syntézu NO v různých rostlinách, polyaminy indukují zvýšenou syntézu NO u *Arabidopsis thaliana*. NO také reguluje syntézu kyseliny salicylové, kyseliny jasmonové a ethylenu během odpovědi na vnější stresové faktory. Typickou reakcí NO

v aerobním prostředí je relativně pomalá oxidace molekulárním kyslíkem na NO_2 , tato reakce je však méně významná zejména v buněčných kompartmentech s nízkou koncentrací kyslíku (Piterková et al., 2008).

Biochemie oxidu dusnatého zahrnuje nitrosoniový kation (NO^+), NO radikál ($\text{NO}\cdot$) a nitroxylový anion (NO^-) lišící se oxidačním stavem dusíku, některými fyzikálními vlastnostmi a chemickou reaktivitou. Vlastnosti NO, mechanismus enzymatické syntézy, způsob transportu a cílené působení NO v biologických systémech vedou k eliminaci toxicity. Funkcí NO je regulační interakce s cílovými proteiny. Chemie oxidu dusnatého úzce souvisí s jeho kyslíkovými analogy kyslíkem (O_2), superoxidovým aniontovým radikálem ($\cdot\text{O}_2^-$) a peroxidem vodíku (H_2O_2). NO reaguje s $\cdot\text{O}_2^-$ za vzniku peroxodusitanu (ONOO^-), hlavní toxické reaktivní formy dusíku (Stamler et al., 1992). Peroxodusitan dále reaguje s proteiny, lipidy a DNA za vzniku příslušných nitrosoderivátů a nitroderivátů. Další významnou reakcí NO je tvorba nitrosylových komplexů s atomy kovů. NO se může vázat na atomy železa v aktivním místě cytochrom c oxidasy, v komplexech nehemového železa Fe-S proteinů mitochondriálního dýchacího řetězce a Fe^{2+} hemových kofaktorů enzymu, nejdůležitějším příkladem této vazby je regulace aktivity guanylátcyklasy. NO může v prostředí buněčných membrán reagovat s lipofilními látkami jako jsou radikálové meziprodukty peroxidace membránových lipidů. V rostlinách se vyskytuje řada látek s vysokou reaktivitou k NO (například fenolické látky ve vakuolách), k jejichž reakci s NO však dochází pouze ve stresových podmínkách. Navázání NO na receptor způsobí syntézu sekundárních přenašečů, například cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) a cyklické adenosindifosfátribosy (cADPR), která vede ke změnám hladiny cytosolického vápníku. Signální funkce NO jsou také zprostředkovány kovalentními modifikacemi proteinů jako nitrosylace cysteinů, nitrace tyrosinů a fosforylace prostřednictvím MAP kinas (Piterková et al., 2008).

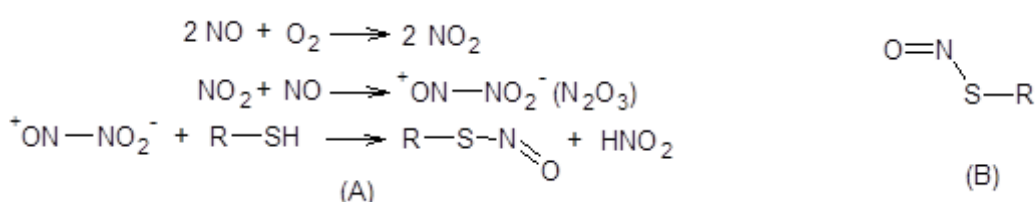
RNS mohou v proteinech reagovat nitrační reakcí s tyrosinovými residui za vzniku nitrotyrosinu nebo S-nitrosační reakcí cysteinových residuí za vzniku S-nitrosylovaných proteinů (tj. S-nitrosothiolů, RSNOs). RNS mohou způsobit i nitraci jiných aminokyselin, například tryptofanu, lipidů, například γ -tokoferolu, nenasycených mastných kyselin a sacharidů, například glukosy. RNS mohou také vstupovat do N-nitrosačních reakcí za tvorby karcinogenních nitrosaminů (Moore & Mani, 2002).

2. S-nitrosylace a S-nitrosothioly – relativně stabilní metabolity oxidu dusnatého

Jednou z důležitých signálních drah oxidu dusnatého je i dráha uskutečňující se přes S-nitrosylace proteinů, posttranslační modifikaci, která reguluje aktivitu enzymů, protein-protein interakce a signál přenášející dráhy (Godoy et al., 2006). Relativně

stabilními biologickými metabolity NO jsou S-nitrosothioly (SNOs). S-nitrosothioly mohou být syntetizovány specifickými redoxními reakcemi vyvolanými NO, jedná se o transnitrosační reakce, nebo reakce katalyzované metaloproteiny. S-nitrosothioly mohou být seskupeny v membránách, vmezeřeny mezi lipofilními proteiny, nebo uzavřeny ve váčcích, v nichž je zachována jejich aktivita. Endogenní SNOs se přirozeně vyskytují v proteinech, v nichž atom síry cysteinu nebo homocysteinu reaguje s NO za vzniku S-NO vazby. Při této reakci je síra atakována elektrofilní molekulou, následuje deprotonizace, elektrofilem je nitrosonium (NO^+). Syntéza, transport, aktivace a katabolismus SNOs jsou regulovány. Koncentrace SNOs přirozeně se vyskytujících v savčích tkáních je řádově v nmol/l až $\mu\text{mol/l}$. Syntéza SNOs z NO v biologických systémech vyžaduje přítomnost akceptoru elektronu (Gaston et al., 2003). Jedná se o jednoelektronovou oxidaci sulfhydrylové skupiny proteinu (Obr. 1). Je nutné zjišťovat míru S-nitrosylace proteinů v nepoškozených buňkách, protože oxidativní modifikace sulfhydrylové skupiny proteinu S-nitrosylačním *in vitro* činidlem, může také způsobit S-thiolaci, nebo ireverzibilní oxidativní poškození proteinových sulfhydrylů (Yanbin et al., 1999). S-nitrosothioly nejsou vždy syntetizovány pouze elektrofilním atakem thiolátu nitrosoniem (NO^+). Bylo zjištěno, že nitroxylové ekvivalenty (NO^-) mohou atakovat relativně elektro pozitivní skupiny -SH skupiny cysteinu. SNOs vznikají v důsledku aktivace některé ze tří isoform enzymu NO synthasy (NOS), přesněji v důsledku vytvoření NO^- aniontu NO synthasou, nebo po současném vzniku NO a superoxidu NO synthasou za přítomnosti glutathionu (Gaston et al., 2003). Přítomnost NOS aktivity v rostlinných buňkách nebyla ale přesvědčivě experimentálně prokázána (Piterková et al., 2008). Chemické reakce s N_2O_3 a ostatními intermediáty hrají významnou roli při fyziologické tvorbě SNOs v biologických membránách a uzavřených mezi hydrofobními částmi proteinů, ale stále častěji se za nejdůležitější cesty tvorby SNOs v mnoha buněčných systémech považují reakce zprostředkované, nebo katalyzované proteiny (Gaston et al., 2003). S-nitrosothioly jsou *in vitro* degradovány množstvím enzymových systémů, například xanthinoxidasa (EC 1.17.3.2), γ -glutamyltranspeptidasa (EC 2.3.2.2), thioredoxinreduktasa (EC 1.8.1.9), Cu/Zn superoxididismutasa (EC 1.15.1.1.), glutathionperoxidasa (EC 1.11.1.9) a S-nitrosoglutathionreduktasa (EC 1.1.1.284). V důsledku aktivity těchto enzymů dochází k transnitrosačním reakcím, jsou to reakce, kdy skupina NO je přenesena z jedné molekuly na druhou. Přenos mezi thiolovými skupinami je mnohem častější než přenos na skupiny obsahující dusík nebo uhlík. Mezi nízkomolekulárními SNOs a SNOs v proteinech uvnitř buněk a v mezibuněčných prostorech existuje rovnováha. Koncentrace SNOs je pravděpodobně regulována specifickými enzymy katabolizujícími S-nitrosoglutathion (GSNO). Proteinové SNOs

v cytosolu mohou být snadno redukovány thioredoxinem nebo glutathionem, které mohou být enzymaticky denitrosylovány. Aby nebyly S-nitrosothioly degradovány, jsou skladovány a chráněny v buněčných membránách, uzavřeny mezi lipofilními proteiny, ve váčcích a v mezibuněčných prostorech. Kaspázy, enzymy zodpovědné za spuštění apoptózy, jsou v inaktivním stavu S-nitrosylovány a uzavřeny v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Při apoptóze jsou uvolněny do cytoplasmy, kde jsou denitrosylovány. Denitrosylace vede k aktivaci enzymů a spuštění apoptózy. SNOs mohou být také degradovány fotolyticky, nebo reakcí s anorganickou rtuť, nebo mědí. Tyto anorganické reakce, zejména reakce se rtuť, však mají v buněčných systémech pouze malý fyziologický význam (Gaston et al., 2003).



Obr. 1: (A) S-nitrosylace thiolů (převzato z Gaston et al., 2003), (B) obecný vzorec S-nitrosothiolu

2.1. Bioaktivita S-nitrosylovaných proteinů

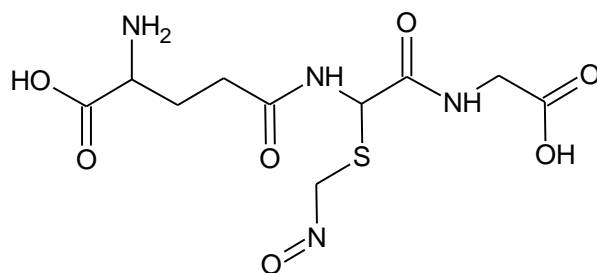
S-nitrosylované proteiny v buňkách jsou velmi dynamickými strukturami (Yanbin et al., 1999). S-nitrosylační reakce způsobují specifické fyziologické a patofyziologické děje tím, že modifikují funkci proteinu (Gaston et al., 2003). Aktivita S-nitrosylovaného proteinu může vzrůst (např. thioredoxin), nebo může být inhibována (např. methioninadenosyltransferasa, kaspázy). K S-nitrosylaci thiolů proteinů dochází specifickými redoxními reakcemi s NO, transnitrosační reakcí s nízkomolekulárními SNOs, nebo transferovou reakcí s jinými proteiny. Za určitých podmínek však mohou SNOs sloužit jako donory NO. SNOs jsou v tomto případě homolyticky štěpeny, přičemž vznikají NO radikály, které postupně difundují do bioaktivních míst. Bioaktivita SNOs je mnohdy stereospecifická. Deriváty L-isomeru S-nitrosocysteinu jsou vysoce aktivní, ale deriváty D-isomeru S-nitrosocysteinu jsou inaktivní. Z obou isomerů jsou uvolňovány homolytickým štěpením NO radikály ve stejném poměru. Tato stereospecifita byla zkoumána, pozorování ukazují na přítomnost specifických S-nitrosothiolových receptorů. S-nitrosylace vede k regulaci exprese genů a proteinů, je ovlivněna aktivita řady jaderných regulačních proteinů: jaderný faktor κB (NF- κB), hypoxii indukující faktor 1 (HIF-1), stimulující proteiny Sp1 a Sp3 a prokaryotický transkripční faktor OxyR. Regulace S-nitrosylace v jádře je pravděpodobně závislá na množství SNOs. Fyziologická koncentrace SNOs udržuje rychlost transkripce

fyziologických genů. Vystavení nitrosativnímu stresu nebo vyšší koncentraci SNOs indukuje zvýšení exprese genů a proteinů zodpovědných za odpověď na stres. Velmi vysoká koncentrace SNOs může způsobit zpětnou inhibici transkripce proteinů zodpovědných za stres (Gaston et al., 2003).

2.2. S-nitrosoglutathion

Nejrozšířenějším S-nitrosothiolem je nízkomolekulární derivát glutathionu S-nitrosoglutathion (GSNO, $C_{10}H_{16}N_4O_7S$, 2S-2-amino-5-[[2R-1-(karboxymethylamino)-3-nitrososulfanyl-1-oxopropan-2-yl]amino]-5-oxopentanová kyselina), (Obr. 2). GSNO je tripeptid, za fyziologických podmínek může spontánně uvolňovat oxid dusnatý (PubChem Public Chemical Database, CID 104858). Působí proti kardiovaskulárním chorobám, infarktu myokardu, městnavému srdečnímu selhání, reguluje tlak krve a způsobuje vasodilataci (Bauer et al., 1995). Inhibuje aktivační fázi srážení krevních destiček (Langford et al., 1994). Chrání poškození mozku a páteře ischemií, mrtvicí, zánětem, poraněním a redoxní nerovnováhou v okolí poraněné tkáně. GSNO také inhibuje mechanismy sekundárního poranění mozku (Khan et al., 2009). Způsobuje rozšiřování průdušek, GSNO chrání lidský organismus proti astmatu, u jedinců trpících astmatem byla zjištěna snížená hladina GSNO (Que et al., 2009). V závislosti na dávce ovlivňuje apoptózu tymocytů, v nízké koncentraci, pod 0,6 mM, indukuje apoptózu, ve vysoké koncentraci apoptózu blokuje. Inhibují aktivaci faktoru NF- κ B (Sandau & Brüne, 1996). Donory NO, a tedy i GSNO, inhibují cysteinové proteasy (Ascenzi et al., 2001). Je substrátem pro GSNOR, která hraje důležitou roli v metabolismu S-nitrosothiolů.

GSNO je jednou z nejvýznamnějších forem NO *in vivo* a je používán pro výzkum účinků NO v nepoškozených buňkách. GSNO může způsobovat S-nitrosylaci, nebo S-glutathionylaci reaktivních sulfhydrylových skupin cysteinů v proteinech. Za S-glutathionylaci proteinů jsou zodpovědné reaktivní intermediáty vznikající rozkladem GSNO. Tyto modifikace proteinů jsou nezávislé na uvolnění oxidu dusnatého. Degradací GSNO vzniká oxidovaný glutathion (GSSG) a glutathionsulfenová kyselina. Oxidativní modifikace sulfhydrylové skupiny proteinů S-glutathionylací *in vivo* i *in vitro* se vyskytuje u proteinu karbonáthydrolyasy III, kreatinkinasy, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy, aktinu, glykogenfosforylasy b. S-glutathionylované formy proteinů nemají významnější roli při transnitrosylačních reakcích (Yanbin et al., 1999). Proto také S-glutathionylačním reakcím nebude v této práci dále věnována pozornost.



Obr. 2: Strukturní vzorec S-nitrosoglutathionu.

3. S-nitrosoglutathionreduktasa

Enzym S-nitrosoglutathionreduktasa byl původně v klasifikaci EC (Enzyme Commission) označen systémovým číslem EC 1.2.1.1. jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa a byl řazen do skupiny aldehyddehydrogenas využívajících NAD, či NADP jako akceptor elektronů. Tato klasifikace byla provedena na základě nesprávně popsaného mechanismu reakce, proto bylo systémové číslo EC 1.2.1.1. v roce 2005 z klasifikace EC vymazáno. Enzym odpovídající číslu EC 1.2.1.1, glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa, byl nahrazen dvěma enzymy: EC 1.1.1.284, S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasou, a EC 4.4.1.22, S-(hydroxymethyl)glutathionsynthasou. S-(hydroxymethyl)glutathionsynthasa byla izolována z bakterie *Paracoccus denitrificans* a urychluje spontánní reakci syntetizující S-(hydroxymethyl)glutathion z glutathionu a formaldehydu. Při detoxifikaci formaldehydu jsou glutathion a formaldehyd substráty pro S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasu. Enzym GSNOR popsáný také jako alkoholdehydrogenasa třídy III (ADH3, χ -ADH), často označovaný i jako NAD- a glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa nebo NAD-dependentní formaldehyddehydrogenasa. Zejména ve starších člancích však bývá nesprávně označována jako NAD-dependentní formaldehyddehydrogenasa, nebo glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa. Systematický název je S-(hydroxymethyl)glutathion:NAD⁺ oxidoreduktasa (EC 1.1.1.284). Nejaktuálněji používaným názvem enzymu EC 1.1.1.284 je S-nitrosoglutathionreduktasa (zkratka GSNOR), ale nebyl Mezinárodní komisí pro biochemii a molekulární biologii NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) zatím schválen. V současnosti je však ve vědeckých člancích téměř výhradně používán.

GSNOR má evolučně konzervovanou strukturu od bakterií po člověka (Liu et al., 2001). Rostlinný enzym u *Arabidopsis thaliana* vykazuje podobné kinetické a molekulární vlastnosti jako savčí enzym. GSNOR má isoelektrický bod v oblasti $pI = 5,3 - 5,6$. Důležitou vlastností enzymu je křížová reakce s protilátkami proti krysí ADH3. Struktura enzymu odvozená z cDNA sekvence řadí GSNOR do komplexního

systému alkoholdehydrogenas a ukázalo se, že u všech žijících forem se vyskytuje alkoholdehydrogenasa proteinového typu třídy III. Alkoholdehydrogenasa třídy III je strukturně odlišná od alkoholdehydrogenas katabolizujících ethanol u obratlovců a rostlin, u rostlin je tato struktura více konzervovaná než u obratlovců. Také vlastnosti rostlinné a živočišné dehydrogenasy katabolizující ethanol se liší, odlišnosti esenciálních residuí aktivních míst mohou vysvětlovat odlišnou enzymovou kinetiku. Hlavní funkcí rostlinné alkoholdehydrogenasy katabolizující ethanol je redukce acetaldehydu v průběhu hypoxie, hlavní funkcí alkoholdehydrogenasy katabolizující ethanol u obratlovců je detoxikace alkoholů. Všechny alkoholdehydrogenasy, jejichž substráty jsou alkoholy se středně dlouhým řetězcem, včetně GSNOR, mají společnou sekvenci aminokyselin Pro-Xaa-Ile/Val-Xaa-Gly-His-Glu-Xaa-Xaa-Gly, kde Xaa je libovolná aminokyselina. (Martínez, 1996).

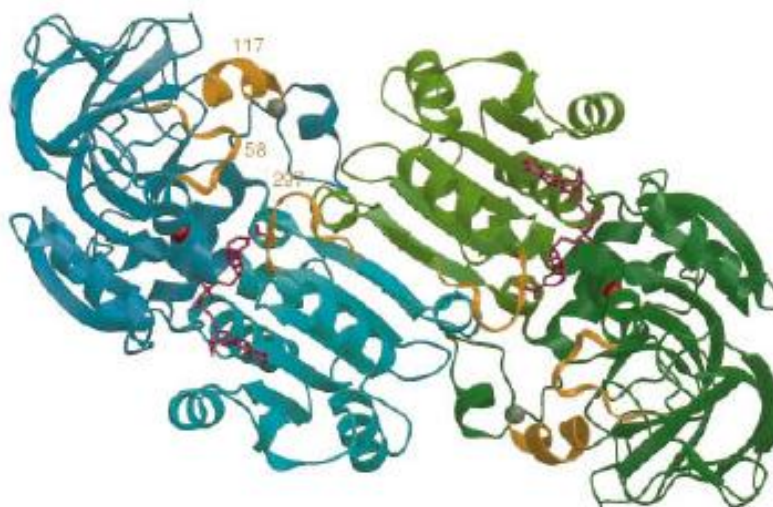
GSNOR patří do rodiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas. Katalyzuje redoxní reakce, oxidaci a redukci. Substrát S-(hydroxymethyl)glutathion (HMGS) spontánně vzniká z glutathionu a formaldehydu, u některých bakterií je syntéza substrátu urychlována enzymem S-(hydroxymethyl)glutathionsynthasou (EC 4.4.1.22). GSNOR se účastní metabolických drah zodpovědných za detoxifikaci formaldehydu, produkt této reakce je dále hydrolyzován enzymem S-formylglutathionhydrolasou (EC 3.1.2.12). GSNOR také specificky redukuje S-nitrosoglutathion (Godoy, 2006).

GSNOR byla dříve označena také jako GSNO lyasa, nebo GSNO terminasa. V játrech krysy byla objevena NADH/NADPH dependentní GSNO metabolizující aktivita, tato aktivita byla označena jako GSNO terminasa (Jensen et al., 1998). GSNO lyasa homolyticky štěpí GSNO na NO a glutathion (Liu et al, 2001). Kinetickou analýzou byla pro katabolismus GSNO určena fyziologická hodnota Michaelisovy konstanty u eukaryotických buněk kolem 20 μM (Liu et al, 2001). Katalytická aktivita (k_{cat}/K_M) pro substrát S-nitrosoglutathion je 94 300 $\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ a výrazně převyšuje hodnotu katalytické aktivity pro všechny další substráty, což svědčí o tom, že katabolismus GSNO je jedním z nejdůležitějších důvodů pro expresi GSNOR (Gaston et al., 2003).

Enzym GSNOR organismy využívají pro kontrolu hladiny S-nitrosylovaných proteinů. GSNO je také NADPH-dependentním oxidačním substrátem jiných enzymů, například thioredoxinového systému, glutathionperoxidasy, γ -glutamyltranspeptidasy a xanthinoxidasy, což signalizuje, že S-nitrosoglutathionreduktasová aktivita je často spojena s jinými enzymatickými aktivitami (Tavares et al., 2009).

Krystalová struktura byla u lidské GSNOR vyřešena v binárním komplexu s NAD^+ (Obr. 3). GSNOR katalyzuje oxidaci alkoholů s dlouhým řetězcem, ω -hydroxymastné kyseliny, S-hydroxymethylglutathion. Struktura enzymu je asymetrická a je tvořena

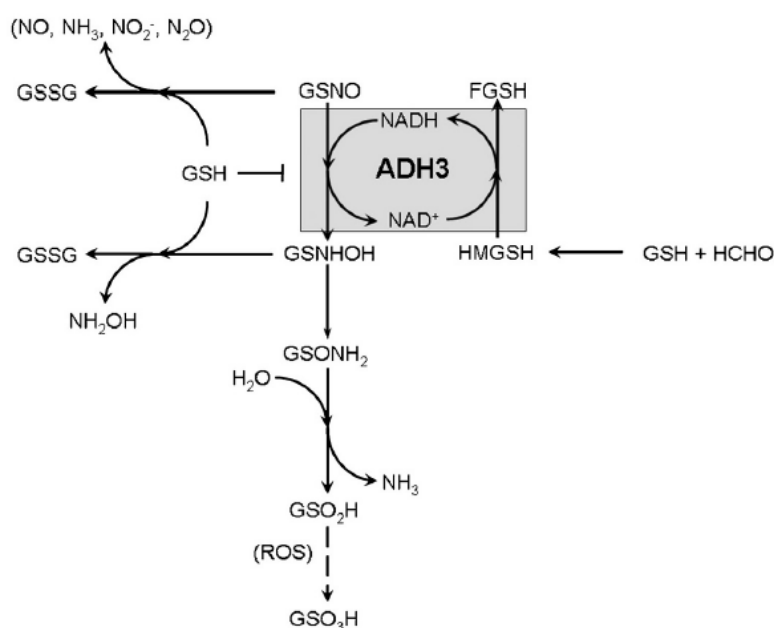
dvěma podjednotkami. Katalytická doména obou podjednotek má polootevřenou konformaci. Polootevřená konformace a klíčové změny některých základních částí strukturně umožňují schopnost GSNOR vázat S-hydroxymethylglutathion a 10-hydroxydekanoát. Zinečnatý kation v katalytickém místě enzymu je vázán koordinační vazbou na glutamát Glu68. Residuum His47 může fungovat jako katalytická báze pro transfer protonu a současně váže adenosin fosfát NAD(H). Modelování vazby substrátu a enzymu ukázalo, že residua Asp57 a Arg115 se podílí na vazbě s glutathionem a že Arg115 se podílí na vazbě s ω -hydroxymastnými kyselinami, a byla identifikována další residua, která se mohou podílet na vazbě se substrátem (Yang et al., 1997).



Obr. 3: Struktura molekuly lidské GSNOR ($\alpha\gamma$ ADH). Osa dimeru je kolmá k rovině papíru. Jednotlivé podjednotky odpovídají zelené a modré části struktury. Blízko ke středu se nacházejí dvě domény vázající koenzym, které jsou znázorněny světle zelenou a světle modrou barvou; tmavě zelenou a tmavě modrou barvou jsou znázorněny katalytické domény. Červeně jsou značeny katalyticky působící zinečnaté ionty, šedou barvou jsou značeny strukturální zinečnaté ionty. Purpurové struktury jsou navázané molekuly koenzymu NAD⁺. Klíčové struktury lokalizované blízko vstupu do vazebných míst substrátu jsou oranžové (převzato z Yang et al., 1997).

GSNOR specificky odbourává S-nitrosoglutathion (GSNO), hlavní rezervoár neproteinových S-nitrosothiolů, a chrání organismy proti nitrosativnímu stresu. Preparáty purifikované alkoholdehydrogenasy třídy III vykazují dvakrát větší GSNOR aktivitu než formaldehyddehydrogenasovou aktivitu, což byla původně předpokládaná hlavní role ADH3 (Godoy et al., 2006). GSNOR je vysoce specifická pro GSNO, látky jako S-nitrosocystein a S-nitrosohomocystein nejsou substráty GSNOR. Studii GSNOR

purifikované z bakterie *Escherichia coli* bylo zjištěno, že redukce GSNO je závislá na NADH, ale ne na kyslíku (Liu et al., 2001). GSNOR redukuje S-nitrosoglutathion na intermedie, které reagují s glutathionem za vzniku hlavního produktu reakce, glutathiondisulfidu (GSSG), nebo se přesmykují na glutathionsulfinamid (GSONH₂). GSONH₂ postupně spontánně hydrolyzuje na kyselinu sulfinovou, která může být při oxidativním stresu oxidována na kyselinu sulfonovou (Obr 4), (Staab et al. 2008).



Obr. 4: Redukce S-nitrosoglutathionu (GSNO) katalyzovaná GSNOR, zde označenou ADH3. Meziproduktem reakce je glutathion-N-hydroxysulfenamid (S-hydroxylamino-glutathion, GSNHOH), který reaguje s glutathionem (GSH) za vzniku oxidované formy glutathionu (glutathiondisulfidu, GSSG) a hydroxylaminu (NH₂OH). Část GSNO je pomalou neenzymatickou reakcí rozkládána na GSSG a reaktivní formy dusíku, míra této neenzymatické reakce závisí na lokální koncentraci kyslíku v buňce. Pokud je v buňce vyčerpána zásoba GSH, enzymatická redukce GSNO je rychlá a intermedie GSNHOH se spontánně přesmykuje na glutathionsulfinamid (GSONH₂). GSONH₂ je hydrolyzován na kyselinu sulfinovou (GSO₂H), která může být při oxidativním stresu, způsobeném reaktivními kyslíkovými radikály (ROS), oxidována na kyselinu sulfonovou (GSO₃H). NADH pro redukci GSNO je zajišťováno oxidativními drahami ADH3, například oxidací S-hydroxymethylglutathionu (HMGSH), (převzato z Staab et al. 2008).

3.1. Charakterizace S-nitrosoglutathionreduktasy u živočichů

Dlouho se předpokládalo, že hlavní funkcí tohoto enzymu je detoxifikace formaldehydu, ale na základě *in situ* analýz a měření aktivity enzymu bylo toto tvrzení

vyvráceno. Na základě stanovení biochemické aktivity bylo zjištěno, že lidský i krysí enzym upřednostňuje jiné substráty než formaldehyd, např. GSNO (Godoy et al., 2006). S-nitrosoglutathionreduktasová aktivita je široce rozšířená u savců. Delece genu pro GSNOR u myši vedlo ke zvýšení vnitrobuněčné hladiny GSNO a proteinových SNOs. Mutantní buňky kvasinek jsou náchylnější k nitrosativnímu stresu, ale rezistence k oxidativnímu stresu nebyla delecí GSNOR genu ovlivněna (Liu et al., 2001). Skutečnost, že GSNOR aktivita je dvakrát vyšší než HMGSH aktivita byla prokázána u živočicha z kmene strunatců, kopinatce *Branchiostoma floridae* (Godoy et al., 2006). Bylo to zjištěno u mutanta *B. floridae* ADH3 se zvýšenou expresí genu kódujícího GSNOR. Na ustáleném stavu mezi produkcí NO a tvorbou SNOs se podílejí synthasy oxidu dusnatého (NOS). U kopinatce *B. floridae* je GSNOR i NOS lokalizována ve střevě, střevo je hlavním orgánem pro syntézu a degradaci NO. Exprese NOS je důležitá u vyvíjejících se larev. U obratlovců byl *in vivo* stanoven příspěvek GSNOR k metabolismu NO u myši, u nichž se neexprimoval gen pro GSNOR. Hlavní funkční změnou u těchto myši byl nárůst hladiny nitrobuněčných S-nitrosylovaných proteinů za normálních podmínek. Tento nárůst hladiny nitrobuněčných SNO-proteinů je mnohem výraznější po působení endotoxinů, nebo po bakteriální infekci. Během obranné reakce jsou silně indukovány synthasy oxidu dusnatého a S-nitrosothioly jsou současně zahrnuty v odpovědi na infekci. NO je také součástí obranného systému měkkýšů a *Drosophily*. Překrývající se signály ADH3 a NOS kopinatce mohou být zodpovědné za antimikrobiální aktivitu GSNO ve střevech, kde dochází k první interakci hostitele a patogenu a hostitel je proto náchylný k bakteriální infekci (Godoy et al., 2006).

U savců bylo popsáno šest tříd alkoholdehydrogenas ADH1 – ADH6. Pořadí transkripce genů pro alkoholdehydrogenasy je u všech savců stejné, geny se transkribují v pořadí jejich umístění v genomu, tj. ADH4, ADH1, ADH6, ADH5, ADH2, ADH3. Gen pro GSNOR (ADH3) se transkribuje jako poslední. U primátů se vyskytuje pouze ADH1 – ADH5, přičemž alkoholdehydrogenasa třídy I se vyskytuje v několika isoformách (Höög & Östberg, 2011). Alkoholdehydrogenasa třídy I (ADH1) je hlavním enzymem odbourávajícím ethanol. Alkoholdehydrogenasa třídy II (ADH2) také může odbourávat primární alkoholy, ale její aktivita je v tomto případě velmi nízká. ADH2 vykazuje retinoldehydrogenasovou aktivitu v játrech, odbourává benzochinony, degraduje produkty peroxidace lipidů, má redoxní funkci při metabolismu noradrenalinu. Hlavní funkce ADH2 však stále není známa. Alkoholdehydrogenasa třídy III je již zmiňovaná S-nitrosoglutathionreduktasa. ADH1 je inhibována pyrazolem, aktivita ADH2 není pyrazolem ovlivňována (Höög & Östberg, 2011). Pokles aktivity GSNOR o 50 % byl zjištěn u kukuřice, přičemž koncentrace pyrazolu byla 100 mM a

u psa, přičemž koncentrace pyrazolu byla 300 mM. V obou případech jde o kompetitivní inhibici vzhledem k formaldehydu (Wipperman et al., 1999). Alkoholdehydrogenasa třídy IV (ADH4) je žaludeční alkoholdehydrogenasou, účastní se metabolismu ethanolu a metabolismu retinoidů mimo játra. Alkoholdehydrogenasy třídy V a VI (ADH5, ADH6) byly zatím identifikovány pouze na úrovni DNA a mRNA, dosud nebyl izolován protein a není nic známo o jejich aktivitě (Höög & Östberg, 2011).

3.1.1. S-nitrosoglutathionreduktasa u člověka

GSNOR se u člověka vyskytuje v mozku, játrech a plicích (Staab, 2008). Dále se vyskytuje v pankreatu, zde je však aktivita GSNOR výrazně vyšší u pacientů s rakovinou než u zdravých jedinců (Jelski et al., 2007). Na buněčné úrovni je lokalizována v cytoplasmě a v jádře (Staab, 2008). Ve stopovém množství se jako jediná ze savčích alkoholdehydrogenas vyskytuje v centrálním nervovém systému (Höög & Östberg, 2011). Strukturně se jedná o dimer (Yang et al., 1997; Staab et al., 2008). Předpokládalo se, že molekulová hmotnost lidského purifikovaného enzymu je přibližně 90 kDa, ale experimentálně byla stanovena molekulová hmotnost 250 kDa, bylo to způsobeno tím, že GSNOR byla izolována v komplexu s alkoholdehydrogenasou (EC 1.1.1.1) a aldehyddehydrogenasou (EC 1.2.1.3). Tato data dokazují, že GSNOR existuje ve formě komplexu s ostatními proteiny, nebo se může vyskytovat ve formě oligomerů až do konečného stupně purifikace (Goodman & Tephly, 1971). GSNOR má řadu substrátů (Tab. 1), v přírodě se však vyskytují jen některé, a to kyselina 12-hydroxydodekanová, S-hydroxymethylglutathion a S-nitrosoglutathion. Při těchto enzymových reakcích dochází zpravidla k navázání substrátu na síru –SH skupiny glutathionu. Zatím není známo, jak se redukuje známé kofaktory nikotinamidhypoxanthindinukleotid a 3-acetylpyridinadenindinukleotid při enzymatické oxidaci S-hydroxymethylglutathionu. GSNOR je aktivována zejména formaldehydem a NADH. Aktivita enzymu je inhibována 12-oxododekanovou kyselinou, dodekanovou kyselinou, dusičnanem stříbrným (AgNO_3), rtuťnatými kationty (Hg^{2+}), ADP-ribosou, 4-methylpyrazolem, formaldehydem, S-formylglutathionem, jodacetátem, p-hydroxymerkuribenzoátem, methylglyoxalem, NAD^+ , NADH, NADPH a $\alpha\text{-NAD}^+$. Vliv na aktivaci a inhibici enzymu mají také mastné kyseliny, ale není jisté, zda tato aktivace, či inhibice má fyziologický význam (Staab et al., 2008).

Tab. 1: Přehled substrátů enzymu GSNOR, kofaktorů a produktů enzymatické reakce (převzato databáze BRENDA, duben 2011)

Substrát	Kofaktor	Produkt
kyselina 12-hydroxydodekanová + glutathion	NAD ⁺	S-(11-karboxy)undekanyl- glutathion
3-ethoxy-2-hydroxybutyraldehyd + glutathion	NAD ⁺	S-(3-ethoxy-2- hydroxybutyryl)-glutathion
S-hydroxymethylglutathion	NAD ⁺	S-formylglutathion
S-hydroxymethylglutathion	NADP ⁺	S-formylglutathion
S-nitrosoglutathion	NAD ⁺	S-amino-L-glutathion
S-nitrosoglutathion	NADH	GSH + NAD ⁺ + NO
S-nitrosoglutathion	NAD(P)H + H ⁺	neznámý produkt
S-hydroxymethylglutathion	3-acetylpyridin- adenindinukleotid	S-formylglutathion
S-hydroxymethylglutathion	nikotinamid- hypoxanthindinukleotid	S-formylglutathion
S-hydroxymethylglutathion formaldehyd +	thio-NAD ⁺ NAD ⁺	S-formylglutathion neznámý produkt
S-hydroxymethylglutathion glyoxal + glutathion	NAD ⁺	S-oxoacetylglutathion
hydroxypyruvaldehyd + glutathion	NAD ⁺	S-hydroxypyruvylglutathion
methylglyoxal + glutathion	NAD ⁺	S-pyruvylglutathion
n-oktanol	NAD ⁺	n-oktanal

Michaelisova konstanta (K_M) pro substrát S-nitrosoglutathion při teplotě 25°C a pH = 7,5 má hodnotu $K_M = 11 \mu\text{M}$ a u mutantu R368L (mutant, u něhož je arginin 368 substituován leucinem) $K_M = 0,16 \text{ mM}$. Inhibiční konstanta (K_i) pro substrát S-nitrosoglutathion a inhibitor dodekanovou kyselinu má hodnotu 0,148 a u mutantu R368L $K_i = 0,161$. Číslo přeměny enzymu pro substrát S-nitrosoglutathion při teplotě 25°C, pH = 7,5 je $29,3 \text{ s}^{-1}$ a u mutantu R368L je rovno $203,3 \text{ s}^{-1}$ (Sanghani et al., 2006). Obecně je její enzymatická aktivita vysoká v rozmezí pH = 6,5 – 9,5; přičemž při pH = 6,5 dosahuje 70 % maximální aktivity a při pH = 9,5 dosahuje 80 % maximální aktivity (Goodman & Tephly, 1971). Pokud je enzym skladován v neporušené tkáni, je při zamražení na -20°C stabilní. V zamražené tkáni z neporušených lidských jater byl enzym stabilní 2 roky, došlo pouze k nepatrnému poklesu aktivity. Čím je enzym více přečištěný, tím je při zamražení méně stabilní. Čistý enzym se při zamražení na -20°C

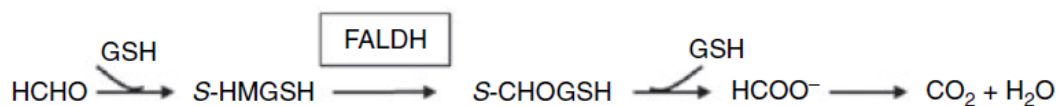
plně inaktivuje a při 0°C se po měsíci skladování aktivita enzymu snižuje na 50 % (Uotila & Koivusalo, 1974).

3.2. Charakterizace S-nitrosoglutathionreduktasy u rostlin

S-nitrosoglutathionreduktasa je nejčastěji studována u různých genotypů rostlin huseníčku Thalova (*Arabidopsis thaliana*), hrachu setého (*Pisum sativum*), slunečnice roční (*Helianthus annuus*), kukuřice seté (*Zea mays*), rajčat (*Solanum spp.*), tabáku (*Nicotiana spp.*). Dále byla popsána i u rýže (*Oryza sativa*), (Barroso et al., 2006); petunie (*Petunia hybrida*), (Garabagi & Strommer, 2004); révy vinné (*Vitis vinifera*), (Tesniere & Abbal, 2009); zelence chocholátého (*Chlorophytum comosum*) a sójy (*Glycine max*), (Giese et al., 1994).

GSNOR je u *Arabidopsis thaliana* kódována jednokopiovým genem, dříve onačeným jako *ADH2* (Rustérucchi et al., 2007). Odpovídající mRNA má velikost 1,4 kb a je přítomna ve všech rostlinných orgánech. Analýzou cDNA izolované z *Arabidopsis thaliana* byla zjištěna nukleotidová sekvence a z ní byla odvozena aminokyselinová sekvence. Tato analýza ukázala velkou podobnost struktury alkoholdehydrogenas třídy III u různých organismů. GSNOR u *Arabidopsis thaliana* má typickou strukturu alkoholdehydrogenas třídy III, z 69 – 89 % identickou s GSNOR hrachu a s lidskou GSNOR. Při srovnání residuí v aktivních místech jednotlivých alkoholdehydrogenas třídy III byly zjištěny rozdíly ve třech z 23 esenciálních residuí a dvě z těchto tří změn byly nalezeny v rostlinných sekvencích. (Martínez, 1996).

Hladiny S-nitrosothiolů jsou *in vivo* kontrolovány syntézou oxidu dusnatého, který je v rostlinách syntetizován různými drahami, a to jak enzymatickými, tak neenzymatickými, a přeměnou S-nitrosoglutathionu (GSNO), která je především uskutečňována S-nitrosoglutathionreduktasou (Rustérucchi et al., 2007). Kromě již zmiňované úlohy při redukci GSNO je GSNOR u všech živých organismů od bakterií po člověka hlavním enzymem metabolizujícím intracelulární formaldehyd. Formaldehyd je toxická sloučenina, která může pocházet z mnoha biologických pochodů a z různých zdrojů životního prostředí. Hlavním zdrojem formaldehydu v rostlinách je disociace 5,10-methylentetrahydrofolátu a oxidace methanolu, který je uvolňován především demethylací pektinů. Formaldehyd může také vznikat dalšími oxidativními demethylačními reakcemi, dekarboxylací glyoxylátu a cytochrom P-450-dependentními oxidacemi herbicidů. GSNOR katalyzuje NAD-dependentní tvorbu S-formylglutathionu z S-hydroxymethylglutathionu, který je spontánně vytvářen z formaldehydu a glutathionu (Espunya et al., 2006). Tato reakce (Obr. 5) byla využita v experimentální části této práce při histochemické detekci GSNOR.



Obr. 5: Metabolická dráha detoxikace formaldehydu (převzato z Espunya et al., 2006). S-formylglutathion (S-CHOGSH) je tvořen z S-hydroxymethylglutathionu (S-HMGSH) reakcí katalyzovanou S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR), dříve nazývanou formaldehyddehydrogenasa (FALDH).

GSNOR je rozdílně exprimována v jednotlivých orgánech dospělých rostlin *Arabidopsis thaliana*, největší množství GSNOR bylo zjištěno v kořenech a v listech v prvních fázích vývoje. GSNOR je distribuována přes epidermis a kortex v kořenech, přes mezofyl v listech a v obou těchto orgánech přes cévní systém. Mutantní rostliny *Arabidopsis thaliana* s modifikovanou hladinou GSNOR mají zřetelně redukovanou délku kořene, a to jak u rostlin nadexprimujících GSNOR, tak u rostlin GSNOR deficientních. Tento fenotypický projev souvisí s celkovým poklesem hladiny intracelulárního glutathionu (GSH) a se změnou prostorové distribuce GSH v kořenovém meristému. Transgenní kořeny jsou částečně necitlivé k exogennímu GSH, nejsou schopny reagovat na oxidačně-redukční změny glutathionu a nedokáží udržovat rovnováhu mezi koncentrací redukováného a oxidovaného glutathionu (Espunya et al., 2006).

3.2.1. Aktivita S-nitrosoglutathionreduktasy ve stresových podmínkách u rostlin

Aktivitu GSNOR významně ovlivňuje mechanické poranění a rostlinné hormony, které fungují jako signály při odpovědi na vnější stresové faktory. Fytohormony jsou vylučovány v signálních procesech spouštěných jako odpověď na různé typy stresu a aktivují různé obranné geny. Etylen, kyselina abscisová, kyselina jasmonová a kyselina salicylová jsou vylučovány ve stresových podmínkách jako jsou poranění, anaerobióza, sucho, chlad a zasolení (Díaz et al., 2003).

Metabolismus endogenního oxidu dusnatého a ostatních reaktivních dusíkatých radikálů (včetně substrátů GSNOR) v abiotických stresových podmínkách je zatím jen málo prozkoumán. V listech rostlin hrachu, které byly vystaveny následujícím abiotickým stresovým podmínkám: vysoká intenzita světla, nízká teplota, vysoká teplota, stálé světlo, stálá tma a mechanické poranění, byl analyzován obsah NO, S-nitrosothiolů, dusitanů a dusičnanů, enzymové aktivity L-arginin dependentních synthas oxidu dusnatého (NOS), GSNOR a profil nitrace tyrosinu (NO₂-Tyr), (Corpas et al., 2008). Bylo zjištěno, že při nízké teplotě dochází k velkému nárůstu aktivity NOS a

GSNOR doprovázenému zvýšením obsahu celkového NO a S-nitrosothiolů a zvýšila se imunoreaktivita s protilátkou proti NO₂-Tyr. Celkový obsah dusitanů a dusičnanů se vlivem zmíněných typů stresu nemění. Mechanické poranění, vysoká teplota a světlo aktivují metabolismus RNS v rostlinách hrachu. Nitrace proteinových tyrosinů je pravděpodobným markerem nitrosativního stresu a předpokládá se, že nízká a vysoká teplota, stálé světlo a vysoká intenzita světla jsou abiotickými stresovými podmínkami, jež indukují nitrosativní stres u rostlin hrachu. Nitrace proteinových tyrosinů, obsah NO a S-nitrosothiolů, aktivity GSNOR a L-arginin dependentní NOS jsou různě regulovány v závislosti na typu abiotického stresu. Aktivita GSNOR se výrazně zvyšovala (o 25 – 67 %) v důsledku působení všech zmíněných stresových podmínek s výjimkou vysoké intenzity světla, která nemá na aktivitu GSNOR vliv. Nízká teplota způsobila největší zvýšení aktivity GSNOR, tj. o 67 % (Corpas et al., 2008). Aktivita GSNOR je důležitá pro aklimatizaci rostlin na vysokou teplotu a pro normální vývoj a plodnost v optimálních podmínkách. Citlivost rostlin na vysokou teplotu je způsobena donory NO a u mutantních rostlin, které jsou citlivé na vysokou teplotu, může být tato citlivost eliminována vycytáváním NO. Vyšší hladina GSNO zvyšuje citlivost na vysokou teplotu v důsledku porušení dráhy, která citlivě reaguje na reaktivní formy kyslíku, nebo dusíku. Při působení vysoké teploty na rostlinu je tedy aktivita GSNOR snížena. Pro zajištění správného růstu rostliny po teplotním stresu je pravděpodobně potřeba větší aktivita GSNOR, u rostlin pěstovaných na světle jsou nejspíše přítomny sloučeniny, které kompenzují redukovanou aktivitu GSNOR a limitují akumulaci přebytečných nitrososloučenin. Neznamená to však, že GSNOR reguluje termotoleranci, nebylo dokázáno, že by se NO účastnil signální dráhy spouštěné při teplotním stresu (Lee et al., 2008). U rostlin hrachu vystavených toxické koncentraci kadmia byla výrazně snížena aktivita GSNOR i exprese genu pro GSNOR. Při stresu kadmíem dochází k extrémnímu snížení obsahu GSNO, k poklesu hladiny NO (pozorován zejména v cévních svazcích) a obsah rozpustného glutathionu v listech hrachu byl redukován o více než 50 %. Snižuje se i poměr redukovaného glutathionu ku oxidovanému glutathionu (GSH/GSSG). Kadmium také indukuje oxidativní stres zvyšováním produkce ROS a navozuje senescenci listů. Přirozená senescence listů je spojena s poklesem hladiny NO, pokles hladiny NO je také jednou z příčin navození senescence kadmíem. Současný pokles aktivity GSNOR a hladiny GSNO se vysvětluje tím, že aktivita GSNOR je indukována substrátem, S-nitrosoglutathionem. (Barroso et al., 2006).

Biotický stres u rostlin aktivuje oxidativní poškození spojené s produkcí reaktivních kyslíkových intermediátů O₂⁻ a H₂O₂, následuje zvýšení hladiny kyseliny salicylové, uvolnění cytosolických Ca²⁺ iontů a spuštění obranných mechanismů. NO se spolu

s reaktivními formami kyslíku (ROS) podílí na aktivaci hypersenzitivní reakce, která vyžaduje rovnováhu mezi produkcí NO a ROS (Díaz et al., 2003). Gen *ADH2*, kódující GSNOR u *Arabidopsis thaliana*, je aktivován kyselinou salicylovou. U tabáku i *Arabidopsis* je gen *ADH2* citlivý na regulaci kyselinou jasmonovou, ale není ovlivňován kyselinou abscisovou. Při poranění rostliny dochází ke snížení exprese genu *ADH2*, silnější represe genu byla pozorována u lokálně poraněných listů než u listů systémových. Pokles hladiny GSNOR je pozorován 2 hodiny po poranění a exprese genu se opět zvýšila na bazální úroveň 48 hodin po poranění. Při poranění rostliny nebyl pozorován signál zprostředkovaný NO, ale nelze ho vyloučit. Negativní regulace aktivity GSNOR při poranění ukazuje, že dochází ke změnám v metabolismu NO, tyto změny jsou součástí obranné reakce. U rostlin tabáku je hladina GSNOR a s ní spojená enzymatická aktivita snížena působením kyseliny jasmonové (JA) a zvýšena v důsledku odpovědi na kyselinu salicylovou (SA). SA se váže na endogenní katalasu, a tím inhibuje její aktivitu. V důsledku toho dochází ke zvýšení koncentrace H₂O₂ a lokálnímu zvýšení oxidativního stresu. Inhibice katalasy a askorbátperoxidasy může vést k poškození volnými radikály a může iniciovat peroxidaci lipidů, která je jedním z následků oxidativního stresu. Při peroxidaci lipidů může být uvolňován formaldehyd a další reaktivní produkty peroxidace, které mohou být enzymem GSNOR eliminovány. Přidání exogenní SA vedlo k buněčné smrti. Pozitivní regulace genu *ADH2* kyselinou salicylovou potvrzuje roli GSNOR při ochraně proti oxidativnímu a nitrosativnímu stresu, ROS i NO stimulují akumulaci SA. Význam poklesu hladiny GSNOR při zranění a přítomnosti JA je obtížně vysvětlitelný. Bylo zjištěno, že jasmonát redukuje syntézu fotosyntetického enzymu RUBISCO a ostatních proteinů spojených s bazálními buněčnými funkcemi. Negativní regulace genu *ADH2* může hrát roli při patogenezi. Pokles hladiny GSNOR může bránit spotřebě GSNO na počátku infekce patogenem. GSNO je substrátem pro GSNOR a zatím nebylo zjištěno, jakým způsobem je regulován poměr NO/GSNO (Díaz et al., 2003).

Rostliny *Arabidopsis thaliana* se sníženým množstvím GSNOR vykazují zvýšenou bazální rezistenci proti houbovému patogenu oomycetě *Perenospora parasitica* Noco2 (virulentní genotyp), ale nadexprese genu nemá významný vliv na bazální rezistenci rostliny (Rustérucci et al., 2007). Odpověď rostliny na infekci patogenem *Pseudomonas syringae*, který infikuje rostliny přes poranění a stomata a množí se v intercelulárních prostorech, byla u GSNOR-deficientních rostlin i u rostlin nadexprimujících GSNOR téměř shodná s odpovědí u rostlin geneticky nemodifikovaných. Tento rozdíl v odpovědi na dva odlišné patogeny může být důsledkem bazální efektivity, která závisí na patogenu, nebo důsledkem ovlivnění GSNOR v rozdílném místě signální dráhy. Nižší množství GSNOR je spojeno s vyšší

hladinou nitrobuněčných S-nitrosothiolů a konstitutivní aktivací s patogenezí spojeného genu *PR-1*. Rostliny nadexprimující GSNOR konstitutivní expresi genu *PR-1* nevykazují. Hypersenzitivní reakce a obranné geny *PR-1* a *GST* jsou rychle indukovány při napadení patogenem, linie nadexprimující GSNOR exprimuje stejné množství genu *PR-1* jako linie geneticky nemodifikovaná. Interakce rostliny a patogenu, nazývaná hypersenzitivní reakce (HR) způsobuje lokální buněčnou smrt. Inhibitory akumulace oxidu dusnatého inhibují hypersenzitivní reakci a dochází k rozvoji choroby a bakteriálního růstu u *Arabidopsis thaliana*. Efektivní indukce HR vyžaduje rovnováhu mezi ROS a produkcí NO. GSNOR je lokalizována ve floému, a proto může signální transportní drahou přes cévní systém regulovat systémovou získanou rezistenci (Rustérucci et al., 2007). Systémová získaná rezistence (SAR) je forma indukované rezistence, která je spouštěna v systémových zdravých tkáních lokálně infikované rostliny. Bylo popsáno několik signálních molekul, které by mohly být zodpovědné za systémovou získanou rezistenci: methylsalicylát, kyselina jasmonová, faktor odvozený od glycerollipidů a skupina peptidů, která je zapojena v bazální obranné reakci mezi buňkami. SAR signál je zesilován současně s obrannými reakcemi závislými na kyselině salicylové a je jemně regulován auxiny (Vlot et al., 2008). SAR je snižena u rostlin nadexprimujících GSNOR a zvýšená u GSNOR-deficientní linie rostlin, je to spojeno se změnami obsahu SNOs. NO a SNOs pozitivně ovlivňují bazální rezistenci rostliny a také rezistenci zprostředkovanou geny. U rostlin nadexprimujících GSNOR byl ve srovnání s původní, geneticky nemodifikovanou linií *Arabidopsis thaliana* zaznamenán prudký vzestup aktivity GSNOR (19× větší aktivita enzymu), ale jen mírný pokles hladiny SNOs (pokles na 80 % původního množství SNOs). U GSNOR deficientní line byla zjištěna nižší aktivita GSNOR (pokles aktivity enzymu na 55 % aktivity) a vyšší hladina SNOs (2,08× vyšší hladina) vzhledem k původní linii *Arabidopsis thaliana*. Předpokládaná role GSNOR v kontrole intracelulární hladiny SNOs řadí GSNOR mezi klíčové enzymy v regulaci buněčné homeostázy (Rustérucci et al., 2007).

Rustérucci et al. (2007) zjistili, že jejich výsledky jsou v rozporu s výsledky publikovanými v článku Feechan et al., 2005 a uvádí, že rozdíly mohou být způsobeny odlišnými metodami modifikace intracelulární hladiny GSNOR (metoda modifikace exprese genů pro GSNOR a metoda inserce T-DNA) a také tím, že obranná reakce velmi výrazně závisí na stáří rostliny. V článku Feechan et al., 2005 stáří rostliny nebylo uvedeno (Rustérucci et al., 2007). Naměřená množství SNOs před i po inokulaci rostliny patogenem byla v obou případech téměř stejná, s poklesem hladiny GSNOR rostla koncentrace SNOs a naopak. Měření koncentrace kyseliny

salicylové (SA) ukázalo, že s rostoucí aktivitou GSNOR rostla koncentrace SA (Feechan et al., 2005), což bylo také v rozporu s výsledky Rustérucci et al., 2007.

4. Další enzymy s S-nitrosoglutathionreduktasovou aktivitou

S-nitrosoglutathionreduktasová aktivita byla prokázána i u enzymu lidské karbonylreduktasy 1 (hCBR1). Karbonylreduktasa je NADPH-dependentní enzym, patří do třídy dehydrogenas a reduktas s krátkým řetězcem a se širokou substrátovou specifitou (Bateman et al., 2008). Karbonylreduktasa 1 (EC 1.1.1.184) je známá také jako aldehydreduktasa 1, NADPH-dependentní karbonylreduktasa, prostaglandin-9-ketoreduktasa, xenobiotická ketonreduktasa, NADPH₂-dependentní karbonylreduktasa, karbonylreduktasa, nespecifická NADPH-dependentní karbonylreduktasa, aldehydreduktasa 1, nebo karbonylreduktasa (NADPH₂). Systematický název je sekundární alkohol:NADP⁺ oxidoreduktasa. Patří do rodiny alkoholdehydrogenas. Redukuje karbonylové sloučeniny (např. chinony, aromatické aldehydy, ketoaldehydy, daunorubicin a prostaglandiny E a F) na odpovídající alkoholy (ExpASy Proteomics Server, EC 1.1.1.184; NC-IUBMB Enzyme Nomenclature, EC 1.1.1.284). V novějších výzkumech je hCBR1 spojována s detoxifikací reaktivních aldehydů (např. 4-oxonon-2-enal) a jejich glutathionovými konjugáty. Zdá se, že tyto sloučeniny hrají klíčovou roli při neurodegenerativních onemocněních spojených s oxidačním stresem jako jsou Parkinsonova a Alzheimerova nemoc. Enzym hCBR1 má navíc vazebné místo pro glutathion (GSH), které je zodpovědné za zvýšenou afinitu k molekulám konjugovaným s glutathionem. Předpokládá se, že vazebné místo pro glutathion je v blízkosti aktivního místa enzymu. Rentgenostrukturní analýzou byla zkoumána interakce GSH a hCBR1, byla vyřešena krystalová struktura hCBR1 v komplexu s inhibítorem podobným substrátu enzymu. Dále se zkoušelo zavést GSH do krystalů hCBR1 již obsahujících NADP a inhibitor podobný substrátu. Bylo zjištěno, že S-nitrosoglutathion je pro hCBR1 ideálním substrátem s Michaelisovou konstantou $K_m = 30 \mu\text{M}$ a $k_{\text{cat}} = 450 \text{ min}^{-1}$, kinetické konstanty jsou srovnatelné s nejlépe prozkoumanými substráty hCBR1. Předpokládá se, že hCBR1 alespoň částečně ovlivňuje regulaci hladiny NO a GSNO v tkáních (Bateman et al., 2008). U rostlin nebyla karbonylreduktasa zatím popsána.

Enzymem s S-nitrosoglutathionreduktasovou aktivitou je i bakteriální nitroreduktasa (NtrA). U grampozitivní patogenní bakterie *Staphylococcus aureus* je enzym NtrA kódován genem SA0UHSC_00833. Bakterie kmene *Staphylococcus* jsou citlivé k derivátům nitrofuranu jako jsou nitrofurazon a nitrofurantoin, ty se používají v medicíně k léčbě infekcí způsobených *S. aureus*. Specifické mikrobiální enzymy, nitroreduktasy, katalyzují redukci zmíněných léčiv, redukce léčiv je nezbytná pro jejich

aktivaci. Aktivace nitroaromatických sloučenin je používána při léčbě rakoviny, aktivované sloučeniny jsou schopny zničit nádor. U mikroorganismů vystavených nitrosativnímu stresu vzniká S-nitrosoglutathion reakcí NO s intracelulárním glutathionem. Vytvořený GSNO podporuje nitrosaci proteinových thiolů. Inaktivace nitroreduktasy vede ke snížení odolnosti *Staphylococcus aureus* k S-nitrosoglutathionu a zvyšuje se jeho rezistence k nitrofuranům. Tato nitroreduktasa je bifunkční enzym (vykazuje S-nitrosoglutathionreduktasovou a nitroreduktasovou aktivitu), i GSNOR je bifunkční enzym (vykazuje formaldehyddehydrogenasovou a S-nitrosoglutathionreduktasovou aktivitu). Na základě fylogenetických analýz bylo navrženo zařazení NtrA do nové rodiny nitroreduktas, které pravděpodobně hrají *in vivo* dvojí roli – napomáhají aktivaci nitrofuranů a chrání buňku před transnitrosylací. Vyšetření genů metodou microarray ukázalo, že gen stafylokoka kódující nitroreduktasu je indukován GSNO. (Tavares et al., 2009). Také nitroreduktasa nebyla u rostlin zatím popsána.

5. Přehled publikovaných histochemických metod detekce aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy

Enzymové histochemické metody *in situ* jsou používány pro lokalizaci buněk exprimujících aktivní enzym na úrovni buněk v rostlině, pletivu, nebo živočišné tkáni. Výhodou metod prováděných na celé rostlině je možnost určit prostorovou a časovou distribuci biomolekul v jednotlivých buňkách neporušeného organismu, jde o rychlou a levnou analýzu (Díaz et al., 2004).

Histochemická detekce ADHIII (GSNOR) využívá skutečnosti, že GSNOR oxiduje S-hydroxymethylglutathion za současné redukce NAD⁺ na NADH. Vzniklé NADH redukuje nitrotetrazoliovou modř (NBT) na formazán, který tvoří modrý precipitát. Tato metoda byla dříve použita pro *in situ* detekci enzymu na elektroforetických gelech a pro histochemickou analýzu enzymu v živočišných tkáních. Metoda může být aplikována na důkaz aktivity jakékoliv dehydrogenasy za použití specifických substrátů (Díaz et al., 2004). Může být použito i jiné barvivo, které je redukováno NADH, např. nitrotetrazoliová violet (Kurzbaum et al., 2010).

Histochemická metoda s využitím NBT pro detekci enzymu na řezech tkáně krysy byla popsána pro alkoholdehydrogenasu. Vzorčky tkáně krysy byly zamrazeny v pevném oxidu uhličitém a řezy byly připraveny v kryostatu při – 25°C. Následně byly řezy inkubovány ve fosfátovém pufru o pH = 7,4 obsahujícím NAD⁺, nikotinamid, síran hořečnatý a NBT po dobu 1 hodiny při 38°C. Do inkubační směsi byly přidány 5% roztoky řady různých alkoholů s lineárním i rozvětveným řetězcem. V místě enzymatické aktivity v tkáni vznikalo redukováno NAD, které způsobovalo redukci NBT

na nerozpustný precipitát formazánu. Růžové zbarvení monoformazánu indikuje nízkou aktivitu alkoholdehydrogenasy, modré zbarvení diformazánu indikuje výraznou aktivitu enzymu. Množství formazánu se hodnotí vizuálně a malé odchylky není možné pozorovat. Jako kontrolní sloužily vzorky inkubované v pufru obsahujícím všechny složky kromě roztoku alkoholu a vzorky inkubované v pufru obsahujícím všechny složky kromě NAD. Z použitých alkoholů byl nejvhodnějším substrátem pro alkoholdehydrogenasu furfurylalkohol, z alkoholů s lineárním řetězcem pak n-hexanol (Ferguson, 1965).

Metoda vyvinutá pro detekci ADHIII v celých rostlinách *Arabidopsis* kombinuje dříve publikované metody pro detekci aktivity alkoholdehydrogenas *in situ* na elektroforetických gelech (Uotila & Koivusalo, 1987) a pro histochemickou lokalizaci aktivity β -glukuronidasy v semenáčcích *Arabidopsis* (Jefferson et al., 1987). Detekce ADHIII v celých rostlinách *Arabidopsis* byla provedena tak, že semenáčky *Arabidopsis thaliana* byly inkubovány v roztoku obsahujícím 0,1 M fosforečnan sodný o pH = 7,5, Triton X-100, pyruvát sodný, NAD⁺, PMS, NBT, dále byl přidán glutathion a formaldehyd spontánně tvořící S-hydroxymethylglutathion, substrát GSNOR (Díaz et al., 2004). Pyruvát sodný v inkubační směsi slouží k eliminaci oxidace vznikajícího NADH na NAD⁺ laktátdehydrogenasou, PMS je akcelerátor elektronového transportu z NADH na NBT. Po vložení do inkubační směsi byly semenáčky *Arabidopsis* umístěny na 10 minut do vakua, což usnadní penetraci roztoku do rostlin a současně rostliny nepoškodí. Semenáčky byly ve směsi inkubovány přibližně 40 minut při teplotě 42°C ve tmě. Pro odstranění nespecifického zbarvení byly rostliny nakonec několikrát promyty 70% ethanolem. Jako kontrolní vzorky byly použity semenáčky inkubované ve směsi obsahující pouze formaldehyd (bez glutathionu) a semenáčky inkubované ve směsi obsahující pouze glutathion (bez formaldehydu). Na těchto kontrolních vzorcích byla detekována oxidace formaldehydu, případně glutathionu jinými enzymatickými systémy jako jsou mitochondriální aldehyddehydrogenasy nebo glutathionreduktasy, projevuje se zde také endogenní přítomnost glutathionu a formaldehydu v buňkách rostliny. Metoda může být aplikována na studium změn aktivity ADHIII v důsledku odpovědi na elicitory nebo biotický a abiotický stres (Díaz et al., 2004). Tato metoda byla pro detekci GSNOR v semenáčcích *Arabidopsis thaliana* využita také v článku Espunya et al., 2006.

Metoda pro detekci dehydrogenas v kořenech rostlin pěstovaných hydroponicky, nebo na agarovém médiu (Kurzbaum et al., 2010) by pravděpodobně s určitými úpravami mohla být použitelná i pro specifickou detekci GSNOR. Metoda byla zavedena na rostlinách kukuřice (*Zea mays*). Kukuřice byla pěstována na Hoaglandově minimálním médiu (HMM) a sedmidenní rostliny byly přesazeny na HMM navíc

obsahujícím 0,005% tetrazoliovou violet. V místě lokalizace aktivních dehydrogenas bylo detekováno fialové zbarvení. Důležité bylo udržovat po celou dobu pokusu sterilní podmínky z důvodu eliminace respirace a dehydrogenasové aktivity mikroorganismů (Kurzbaum et al., 2010).

Další možnou metodou histochemické detekce je imunolokalizace. Řezy zalité v parafinu se inkubují nejprve s primárními protilátkami na GSNOR a poté se sekundární protilátkou značenou peroxidasou. Hnědé zbarvení, vzniklé v důsledku aktivity peroxidasy, specificky indikuje přítomnost GSNOR (Espunya et al., 2006).

Mimo histochemické metody je aktivita GSNOR nejčastěji detekována elektroforetickými metodami a následným western blottingem, nebo spektrofotometricky. Spektrofotometricky se měří enzymatická aktivita GSNOR v buněčných extraktech v 0,1 M fosforečnanu sodném o pH = 8 při 25°C za použití S-hydroxymethylglutathionu jako substrátu GSNOR, přičemž se monitoruje produkce NADH při 340 nm ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Jedna jednotka aktivity odpovídá 1 μmol koenzymu redukováného za minutu (Martínez et al., 1996). Spektrofotometricky se aktivita GSNOR také stanovuje monitorováním oxidace NADH při 340 nm. Extrakty se inkubují při 25°C v reakční směsi obsahující 20 mM Tris-HCl pufr o pH = 8, NADH a EDTA, reakce se startuje přidáním GSNO (substrátu) do reakční směsi (Sakamoto et al., 2002).

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6. Materiál a metody

7. Výsledky a diskuse

ZÁVĚR

V teoretické části práci byla vypracována literární rešerše přehledně shrnující publikované poznatky o S-nitrosothiolech, S-nitrosylačních reakcích, sloučeninách s nimi souvisejících a především o enzymu S-nitrosoglutathionreduktase. Byla popsána její úloha u živočichů, včetně člověka, a u rostlin. Byl zpracován přehled publikovaných metod histochemické detekce aktivity GSNOR.

V experimentální části práce byla histochemicky detekována aktivita GSNOR v semenáčcích *Arabidopsis thaliana* a *Pisum sativum*. V semenáčcích *Arabidopsis thaliana* byla histochemicky detekována aktivita GSNOR také při teplotním stresu. Výsledky histochemické detekce aktivity GSNOR byly porovnány s výsledky kvantifikace formazanu extrahovaného ze vzorků zkoumaných rostlin. V extraktech hrachu byla aktivita GSNOR detekována také spektrofotometricky a byla provedena metoda diskontinuální nativní elektroforézy na polyakrylamidovém gelu, pro detekci GSNOR na elektroforetických gelech byla použita metoda pro histochemickou detekci GSNOR v celých rostlinách *Arabidopsis thaliana*.

Při dalším pokračování v této práci by bylo vhodné optimalizovat histochemické metody detekce GSNOR v semenáčcích *Arabidopsis thaliana* přidáním inhibitorů fotosyntézy a respirace do inkubační směsi. Při kvantifikaci formazanu po histochemické detekci GSNOR v semenáčcích *Arabidopsis thaliana* by bylo ideální kvantifikovat množství formazanu samostatně v listech a v kořenech. Histochemická metoda detekce GSNOR (podle Díaz et al., 2004) nebyla vhodná pro detekci v řezech semenáčků hrachu, lepší by bylo optimalizovat metodu vycházející z modifikace metody pro histochemickou detekci aminoaldehyddehydrogenasy s využitím inhibitorů enzymatických systémů redukcí NBT, tyto enzymy způsobují nespecifičnost histochemické detekce.

LITERATURA

Ascenzi P., Salvati L., Bolognesi M., Colasanti M., Polticelli F., Venturini G. (2001) Inhibition of cysteine protease activity by NO-donors. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2**, 137 – 153.

Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F. J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M. C., Valderrama R., Sandalio L. M., del Río L. A. (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J. Exp. Bot.* **57**, 1785 – 1793.

Bateman R. L., Rauh D., Tavshanjian B., Shokat K. M. (2008) Human Carbonyl Reductase 1 Is an S-Nitrosoglutathione Reductase. *J. Biol. Chem.* **283**, 35756 – 35762.

Bauer J. A., Booth B. P., Fung H. L. (1995) Nitric oxide donors: biochemical pharmacology and therapeutics. *Adv. Pharmacol.* **34**, 361 – 381.

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

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 Physiol.* **49**, 1711 – 1722.

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 Lett.* **543**, 136 – 139.

Díaz M., Fernandez M. R., Martinez M. C. (2004) Histochemical assay to detect class III ADH activity in situ in *Arabidopsis* seedlings. *Biotech. Histochem.* **79**, 91 – 94.

Espunya M. C., Díaz M., Moreno-Romero J., Martínez M. C. (2006) Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell Environ.* **29**, 1002–1011.

Feechan A., Kwon E., Yun B.-W., Wang Y., Pallas J. A., Loake G. J. (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8054 – 8059.

Ferguson M. M. (1965) Observations on the histochemical distribution of alcohol dehydrogenase. *Q. J. Microsc. Sci.* **106**, 289 – 297.

Garabagi F., Strommer J. (2004) Distinct Genes Produce the Alcohol Dehydrogenases of Pollen and Maternal Tissues in *Petunia hybrida*. *Biochem. Genet.* **42**, 199 – 208.

Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A. (2003) S-Nitrosylation Signaling in Cell Biology. *Mol. Interv.* **3**, 253 – 263.

Giese M., Bauer-Doranth U., Langebartels C., Sandermann H., Jr (1994) Detoxification of Formaldehyde by the Spider Plant (*Chlorophytum comosum* L.) and by Soybean (*Glycine max* L.) Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiol.* **104**, 1301 -1309.

Godoy L., González-Duarte R., Albalat R. (2006) S-nitrosogluthathione reductase activity of amphioxus ADH3: insights into the nitric oxide metabolism. *Int. J. Biol. Sci.* **2**, 117 – 124.

Goodman J. I., Tephly T. R. (1971) A comparison of rat and human liver formaldehyde dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **252**, 489 – 505.

Höög J.-O., Östberg L. J. (2011) Mammalian alcohol dehydrogenases – A comparative investigation at gene and protein levels. *Chem. Biol. Interact., v tisku* doi:10.1016/j.cbi.2011.01.028.

Choi H. S., Kim J. W., Cha Y.-N., Kim C. (2006) A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *J. Immunoass. Immunoch.* **27**, 31- 44.

Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901 – 3907.

Jelski W., Chrostek L., Szmitkowski M. (2007) The activity of class I, II, III, and IV of alcohol dehydrogenase isoenzymes and aldehyde dehydrogenase in pancreatic cancer. *Pancreas* **35**, 142 – 146.

Jensen D. E., Belka G. K., du Bois, G. C. (1998) S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem. J.* **331**, 659 – 668.

Khan M., Im Y. B., Shunmugavel A., Gilg A. G., Dhindsa R. K., Singh A. K., Singh I. (2009) Administration of S-nitrosoglutathione after traumatic brain injury protects the neurovascular unit and reduces secondary injury in a rat model of controlled cortical impact. *J. Neuroinflamm.* **6**, 32.

Kurzbaum E., Kirzhner F., Armon R. (2010) A simple method for dehydrogenase activity visualization of intact plant roots grown in soilless culture using tetrazolium violet. *Plant Root* **4**, 12 – 16.

Langford E., Brown A. S., de Belder A., Smith R. E. A., Martin J. F., Wainwright R. J., Thomas M. R., Radomski M. W., Moncada S. (1994) Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet* **344**, 1458 – 1460.

Lee U., Wie C., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E. (2008) Modulation of Nitrosative Stress by S-Nitrosoglutathione Reductase Is Critical for Thermotolerance and Plant Growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 786 – 802.

Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J. S. (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490 – 494.

Martínez M. C., Achkor H., Persson B., Fernández M. R., Shafqat J., Farrés J., Jörnvall H., Parés X. (1996) *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase. Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class P and liver class I alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **241**, 849 – 857.

Moore K. P., Mani A. R. (2002) Measurement of Protein Nitration and S-Nitrosothiol Formation in Biology and Medicine. *Methods Enzymol.* **359**, 256 – 268.

Petřivalský M., Brauner F., Luhová L., Gagneul D., Šebela M. (2007) Aminoaldehyde dehydrogenase activity during wound healing of mechanically injured pea seedlings. *J. Plant Physiol.* **164**, 1410-1418.

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

Que L. G., Yang Z., Stamler J. S., Lugogo N. L, Kraft M. (2009). S-Nitrosoglutathione Reductase. An Important Regulator in Human Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 226 – 231.

Rustérucchi C., Espunya M. C., Díaz M., Chabannes M, Martínez M. C. (2007) S-Nitrosoglutathione Reductase Affords Protection against Pathogens in Arabidopsis, Both Locally and Systemically. *Plant Physiol.* **143**, 1282 – 1292.

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

Sandau K., Brüne B. (1996) The Dual Role of S-nitrosoglutathione (GSNO) During Thymocyte Apoptosis. *Cell. Signal.* **8**, 173 – 177.

Sanghani P. C., Davis W. I., Zhai L., Robinson H. (2006) Structure–Function Relationships in Human Glutathione-Dependent Formaldehyde Dehydrogenase. Role of Glu-67 and Arg-368 in the Catalytic Mechanism. *Biochemistry* **45**, 4819 – 4830.

Staab C. A., Hellgren M., Höög J.-O. (2008) Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3950 – 3960

Stamler J. S., Singel D. J., Loscalzo J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**, 1898 – 1902.

Tavares A. F. N., Nobre L. S., Melo A. M. P., Saraiva L. M. (2009) A Novel Nitroreductase of *Staphylococcus aureus* with S-Nitrosoglutathione Reductase Activity. *J. Bacteriol.* **191**, 3403 – 3406.

Tesniere C., Abbal P. (2009) Alcohol dehydrogenase genes & proteins in grapevine. In *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology* (Roubelakis-Angelakis K. A., ed.), pp. 141 – 160, Springer, The Netherlands

Uotila L., Koivusalo M. (1974) Formaldehyde dehydrogenase from human liver. Purification, properties, and evidence for the formation of glutathione thiol esters by the enzyme. *J. Biol. Chem.* **249**, 7653 – 7663.

Uotila L., Koivusalo M. (1987) Multiple forms of formaldehyde dehydrogenase from human red blood cells. *Hum. Hered.* **37**, 102 – 106.

Vlot A. C., Klessig D. F., Park S.-W. (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 436 – 442.

Wippermann U., Fliegmann J., Bauw G., Langebartels C., Maier K., Sandermann H. (1999) Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase: protein sequence and catalytic properties. *Planta* **208**, 12 – 18.

Yanbin J., Akerboom T. P. M., Sies H., Thomas J. A. (1999) S-nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitrosoglutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* **362**, 67 – 78.

Yang Z.-N., Bosron W. F., Hurley T. D. (1997) Structure of Human Chi Chi Alcohol Dehydrogenase: A Glutathione-dependent Formaldehyde Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **265**, 330 – 343.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADH	alkoholdehydrogenasa
<i>ADH2</i>	gen kódující S-nitrosoglutathionreduktasu
ADH3, ADHIII, χ -ADH	alkoholdehydrogenasa třídy III
ADP	adenosindifosfát
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa
cADPR	cyklická adenosindifosfátribosa
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
Col	ekotyp Columbia
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
EC	Enzyme Commission
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FALDH	formaldehyddehydrogenasa
GSH	glutathion
GSNHOH	glutathion-N-hydroxysulfenamid
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSO ₂ H	kyselina sulfinová
GSO ₃ H	kyselina sulfonová
GSONH ₂	glutathionsulfinamid
GSSG	glutathiondisulfid – oxidovaný glutathion
GST	gen pro glutathion-S-transferasu
hCBR1	karbonylreduktasa 1
HIF-1	hypoxii indukující faktor I
HMGSH	S-(hydroxymethyl)glutathion
HMM	Hoaglandovo minimální médium
HR	hypersenzitivní reakce
iNOS	inducibilní forma NOS
JA	kyselina jasmonová
MAP	mitogenem aktivovaný protein (mitogen activated protein)
MES	morfolinoethansulfonová kyselina
MS médium	Murashige/Skoogovo médium
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	nikotinamidadenindinukleotid, redukována forma

NADP	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát, redukovaná forma
NBT	nitrotetrazoliová modř
NF-κB	jaderný faktor κB
NO ₂ -Tyr	nitrovaný tyrosin
NOS	synthasy oxidu dusnatého
NtrA	nitroreduktasa
P-450	rodina cytochromů
PMS	methosulfát fenazinu
PMSF	fenylmethansulfonfyl fluorid
PR-1	gen spojený s patogenezí 1 (patogenesis related gene 1)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RSNOs, SNOs	S-nitrosothioly (S-nitrosylované proteiny)
SA	kyselina salicylová
SAR	systemová získaná rezistence
S-CHOGSH	S-formylglutathion
Sp1	stimulující protein 1
Sp3	stimulující protein 3
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin