

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Metody analýzy S-nitrosothiolů v biologickém
materiálu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Petra Gajdošíková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2019

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

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za věnovaný čas, odborné vedení, trpělivost a cenné rady při psaní této bakalářské práce. Také děkuji katedře biochemie za vstřícný přístup a rady během práce na experimentální části.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petra Gajdošíková
Název práce	Metody analýzy S-nitrosothiolů v biologickém materiálu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

S-nitrosylace patří mezi nejdůležitější posttranslační modifikace proteinů, která má důležitou roli v rámci signálních drah oxidu dusnatého. Těmto posttranslačním modifikacím podléhají nejen proteiny, ale i nízkomolekulární thioley jako je redukovaný glutathion. Teoretická část této práce shrnuje poznatky o NO, hlavně jeho biologických funkcích. Dále je zaměřena především na biosyntézu, stabilitu, degradaci a reaktivitu S-nitrosothiolů, se zaměřením na S-nitrosoglutathion. Součástí teoretické části je také přehled používaných metod analýzy S-nitrosothiolů. V experimentální části byla provedena chemická syntéza S-nitrosoglutathionu, dále stanovení S-nitrosothiolů spektrofotometrickou a fluorimetrickou metodou, a také zavedení metody chemiluminiscenční detekce. Proběhlo testování těchto metod, a poté jejich porovnání včetně vyhodnocení nejdůležitějších parametrů. Pro analýzu S-nitrosothiolů byly použity extrakty semenáčků hrachu setého a dospělých jedinců včely medonosné.

Klíčová slova	S-nitrosothioley, S-nitrosylace, oxid dusnatý
Počet stran	51
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname Petra Gajdošíková

Title Methods of S-nitrosothiol analysis in biological material

Type of thesis Bachelor

Department Department of biochemistry

Supervisor doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.

The year of presentation 2019

Abstract

S-nitrosylation is considered as one of the most important post-translational protein modifications and play a crucial role in nitric oxide signaling pathways. Both proteins and low-molecular weight thiols, such as reduced glutathione may undergo these post-translational modifications. The theoretical part of this thesis summarizes information about NO, especially its biological functions. Biosynthesis, stability, degradation and reactivity of S-nitrosothiols is also described with a focus on S-nitrosoglutathione. There is also a summary of the analytical methods used. In the experimental part, the chemical synthesis of S-nitrosoglutathione, determination of S-nitrosothiols by spectrophotometric, spectrofluorimetric and chemiluminescence-based methods were performed. These methods were tested and compared. For the analysis of S-nitrosothiols, extracts of pea seedlings and extracts of adult honey bee were used.

Keywords S-nitrosothiols, S-nitrosylation, nitric oxide

Number of pages 51

Number of appendices 0

Language Czech

OBSAH

1	Úvod	7
2	Současný stav řešené problematiky	8
2.1	Oxid dusnatý	8
2.1.1	Biosyntéza NO	8
2.1.2	Biologické funkce NO	10
2.2	S-nitrosothioly	10
2.2.1	Biosyntéza	11
2.2.2	Stabilita a katabolismus	13
2.2.3	Reaktivita	17
2.2.4	Biologické funkce	18
2.3	Úloha S-nitrosace proteinů u rostlin	20
2.4	Metody analýzy S-nitrosothiolů	22
2.4.1	Spektrofotometrické stanovení	23
2.4.2	Fluorimetrické stanovení	24
2.4.3	Chemiluminiscenční stanovení	25
3	Experimentální část	27
3.1	Chemikálie	27
3.2	Přístroje a vybavení	27
3.3	Biologický materiál	27
3.4	Experimentální metody	28
3.4.1	Extrakce	28
3.4.2	Příprava S-nitrosoglutathionu	28
3.4.3	Spektrofotometrické stanovení SNO Savillovou metodou	28
3.4.4	Fluorimetrické stanovení SNO metodou s DAN	29
3.4.5	Chemiluminiscenční stanovení dusitanů a SNO	29
4	Výsledky a diskuze	32
4.1	Kalibrace Savillovy metody	32
4.2	Kalibrace chemiluminiscenční metody	34
4.3	Kalibrace fluorimetrické metody	36
4.4	Stanovení SNO v etiolovaných semenáčcích hrachu setého (<i>P. sativum</i>)	37
4.5	Stanovení SNO v tělních částech včely medonosné (<i>A. mellifera</i>)	39
4.6	Porovnání použitých metod, výhody a nevýhody	44
5	Závěr	45
	Seznam citované literatury	46
	Seznam použitých zkratk	51

Cíle práce

V rámci teoretické části je cílem vypracovat literární rešerši ohledně biologických funkcí S-nitrosothiolů, včetně jejich biosyntézy, chemických vlastností, odbourávání a úlohy v redoxních signálních drahách oxidu dusnatého a přehledu používaných metod analýzy S-nitrosothiolů.

Cílem v experimentální části je zavedení stanovení S-nitrosothiolů metodou chemiluminiscenční detekce a testování metod pro analýzu obsahu S-nitrosothiolů ve vzorcích rostlin a hmyzu. Dále porovnání těchto metod a zhodnocení jaké jsou jejich výhody a nevýhody.

1 Úvod

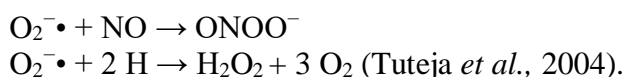
Oxid dusnatý (NO) je plynná signální molekula vyskytující se ve formě volného radikálu. Vzhledem k jeho malé velikosti a lipofilnímu charakteru může volně procházet buněčnými membránami a je důležitým biologicky aktivním poslem. Jakožto volný radikál reaguje primárně se superoxidem za tvorby reaktivních forem dusíku, které mají velký význam v signálních dráhách NO prostřednictvím posttranslačních modifikací cílových proteinů. Nitrace proteinových tyrosinů a histidinů a nitrosylace cysteinových thiolů patří mezi nejvýznamnější posttranslační modifikace proteinů spojené s NO.

S-nitrosothioly vznikají biochemickými procesy zvanými S-nitrosace a S-nitrosylace, při kterých dochází k přenosu nitrosoniové, nebo nitrosylové skupiny na thiolovou skupinu cysteinu za vzniku kovalentní vazby S-NO. S-nitrosylace je reverzibilní a místně specifická posttranslační modifikace proteinů, která patří mezi tzv. redoxní signální dráhy. Tento proces je považován za všudypřítomný mechanismus NO-dependentní buněčné signalizace a díky určitým chemickým vlastnostem S-nitrosothiolů se jedná o zajímavý alternativní mechanismus regulace v rámci signálních drah NO. Tvorbou S-nitrosothiolů je NO chráněn před oxidací a zároveň je limitována jeho schopnost difúze. Za fyziologických podmínek tato posttranslační modifikace ovlivňuje funkci velkého počtu proteinů. S-nitrosylaci nepodléhají jen proteiny, ale i nízkomolekulární thioly z nichž nejvýznamnější je S-nitrosoglutathion (GSNO). Denitrosace, tedy odstranění NO skupiny v postranním řetězci proteinů je důležitým aspektem NO signalizace. Tento proces podléhá enzymové katalýze, která může být regulována. Prozatím bylo popsáno několik enzymů, které zprostředkovávají denitrosaci cysteinu, z nichž jsou nejvýznamnější dva enzymové systémy: S-nitrosoglutathionreduktasa a thioredoxinový systém.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Oxid dusnatý

NO jakožto plynná signální molekula, se vyskytuje ve formě volného radikálu ($\text{NO}\bullet$) s jedním nepárovým elektronem a má velice krátkou dobu života. Vzhledem k jeho malé velikosti, jednoduchosti a lipofilnímu charakteru, může $\text{NO}\bullet$ volně procházet přes buněčné membrány a stává se tak důležitým biologicky aktivním poslem. Jakožto volný radikál reaguje primárně se superoxidem (O_2^-) za tvorby reaktivních forem dusíku (RNS) jako je například peroxynitrit (ONOO^-) a oxidy dusíku (NO_x , N_2O_3) (Goldstein a Merenyi, 2008). Za podmínek oxidativního stresu se může superoxidový radikál ($\text{O}_2^- \bullet$) chovat jako redukční činitel, který předává svůj přebytečný elektron NO za vzniku ONOO^- , nebo jako oxidační činitel, který je redukován na H_2O_2 . Díky velkému množství enzymu superoxidodismutasy (EC 1.15.1.1) v buňce probíhá za normálních podmínek převážně druhá reakce. Jestliže je NO produkován ve velkém množství, značné množství O_2 reaguje s NO za vzniku ONOO^- :



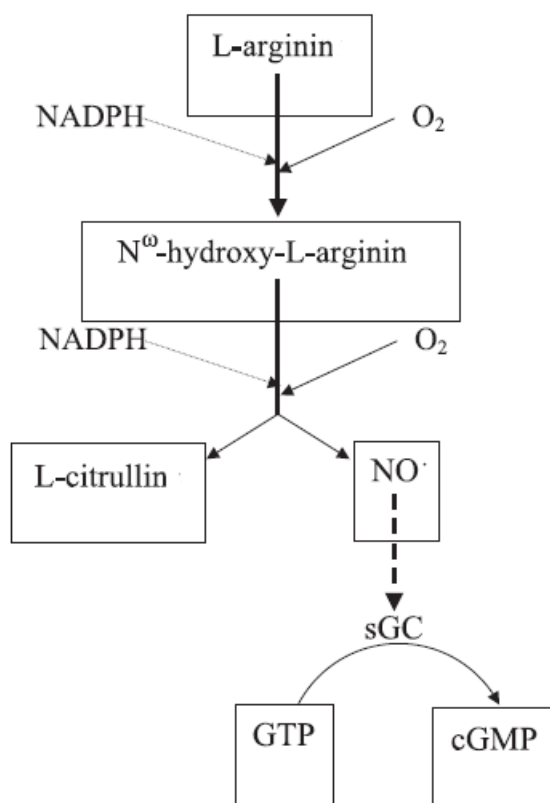
$\text{NO}\bullet$ může reagovat s peroxylovým radikálem ($\text{RO}\bullet$), hydroxylovým radikálem ($\text{OH}\bullet$) nebo NO^- za vzniku alkyl peroxynitritu (ROONO), kyseliny dusité (HNO_2) nebo oxidu dusného (N_2O). Za přístupu kyslíku může $\text{NO}\bullet$ reagovat s O_2 za vzniku hnědě zbarveného plynu $\text{NO}_2\bullet$, který je daleko více reaktivní než $\text{NO}\bullet$. $\text{NO}_2\bullet$, ONOOH , N_2O_3 a HNO_2 mohou způsobovat nitraci, nitrosaci a deaminaci DNA bazí, čímž se DNA stává nestabilní (Tuteja *et al.*, 2004).

Vzniklé RNS mají velký význam v signálních drahách NO prostřednictvím posttranslačních modifikací cílových proteinů. Nitrace proteinových tyrosinů a histidinů a nitrosylace cysteinových thiolů patří mezi nejvýznamnější posttranslační modifikace proteinů spojené s NO (del Río, 2015; Yu *et al.*, 2014).

2.1.1 Biosyntéza NO

NO může být v buňce vytvořen pomocí celé řady enzymových, nebo neenzymových reakcí v závislosti na místě vzniku a povaze podnětu pro tvorbu NO. Biosyntéza NO s využitím enzymu NO-synthasy (NOS, EC 1.14.13.39) probíhá u zvířat a bakterií, zatímco u rostlin nebyla přítomnost tohoto enzymu jednoznačně prokázána (Mur *et al.*, 2013). Biosyntéza NO začíná u aminokyseliny L-argininu a zahrnuje začlenění

molekulárního kyslíku do nestabilního intermediátu N^ω-hydroxy-L-argininu a následně do L-citrullinu (Obr.1). Při této oxidační reakci se přeměňuje energie ve formě NADPH za vzniku NADP⁺ a konečnými produkty reakce jsou L-citrullin a NO (Schmidt *et al.*, 1996). Byly rozpoznány tři hlavní isoformy enzymu NOS, neuronální (nNOS), endotelová (eNOS) a indukovatelná (iNOS) (Alderton *et al.*, 2001). NOS enzymy obsahují dvě katalytické domény. N-terminální oxygenasovou doménou, která obsahuje vazebná místa pro L-arginin, hem a tetrahydrobiopterin a C-terminální reduktasovou doménou, která obsahuje vazebná místa pro FAD, FMN a NADPH. Tato dvě katalytická místa jsou spojena vazebným místem pro kalmodulin (Kavya *et al.*, 2006). U rostlin bylo popsáno několik enzymů, které hrají roli v syntéze NO. Jedním z těchto enzymů je nitrátreduktasa (EC 1.6.6.1), která přenáší elektrony z NAD(P)H na dusičnan přes tři redoxní centra zahrnující dvě prostetické skupiny (FAD a hem) a Mo-pterinové centrum (Yamasaki *et al.*, 2000).



Obr. 1 Reakce vedoucí ke vzniku oxidu dusnatého (NO•) u živočichů. Rozpustná guanylátcyklasa (sGC), která katalyzuje přeměnu GTP na cyklický GMP (cGMP), představuje významný cíl NO• v živočišných buňkách (převzato a upraveno podle Pagliaro, 2003).

2.1.2 Biologické funkce NO

NO se podílí na regulaci řady fyziologických procesů u rostlin, jako je vývoj vegetativních orgánů, dormance a klíčení semen nebo senescence (Piterková *et al.*, 2011; Šírová *et al.*, 2011). Reguluje fotofosforylaci, hraje důležitou roli v signálních drahách rostlinných hormonů i regulátorů a účastní se apoptózy (Adámková a Petřivalský, 2012; Moricová *et al.*, 2014). Dále reguluje aktivitu enzymů, mezi které patří mitochondriální cytochrom c oxidasa (EC 1.9.3.1) či cytosolická akonitasa (EC 4.2.1.3).

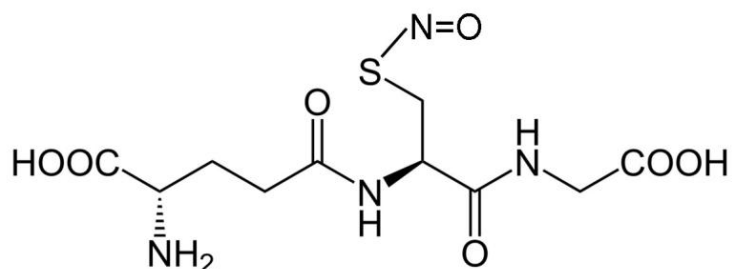
U živočichů je v periferním nervovém systému NO produkován sítí nervů, které zprostředkovávají vasodilataci a regulují určité gastrointestinální, respirační a genitourinární funkce. NO je také tvořen během obrany organismu proti cizímu hostiteli a při imunitních reakcích, kde přispívá k ochraně proti nádorovým buňkám, bakteriím a virům (Nussler a Billiar, 1993). Signální účinky NO jsou založeny na jeho interakci s reaktivními partnery, mezi které patří např. reaktivní formy kyslíku (ROS), přechodné kovy v metaloproteinech, thioly a lipidové radikály a tím dochází ke změně jejich biologické aktivity. NO se může vázat na atom železa hemu v aktivním místě guanylátcyklasy (EC 4.6.1.2), čímž se tento enzym stává aktivním a katalyzuje tvorbu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) z GTP (Obr. 1). cGMP snižuje hladinu intracelulárního Ca^{2+} , uvolňuje svaly, rozšiřuje cévy a také snižuje krevní tlak (Tuteja *et al.*, 2004).

2.2 S-nitrosothioly

S-nitrosothioly (SNO) vznikají biochemickými procesy zvanými S-nitrosace a S-nitrosylace, kdy dochází k přenosu nitrosionové, nebo nitrosylové skupiny na thiolovou skupinu cysteinu za vzniku kovalentní vazby S-NO. S-nitrosylace je reverzibilní a místně specifická posttranslační modifikace proteinů, která patří mezi tzv. redoxní signální dráhy. Za fyziologických podmínek tato posttranslační modifikace ovlivňuje funkci velkého počtu proteinů od iontových kanálů až po regulační proteiny buněčného jádra. S-nitrosylaci nepodléhají jen proteiny, ale i nízkomolekulární thioly z nichž nejvýznamnější je S-nitrosoglutathion (GSNO, Obr. 2) (Jahnová *et al.*, 2013).

Glutathion (GSH) je tripeptid (γ -glutamylcysteinylglycin), který obecně slouží jako hlavní nízkomolekulární buněčný antioxidant (Foyer a Noctor, 2005). Defekty v biosyntéze GSH vedou u rostlin ke zvýšené citlivosti k patogenům (Parisy *et al.*,

2007). GSNO vzniká z GSH S-nitrosací thiolové skupiny cysteinu. GSNO a ostatní nízkomolekulární SNO např. S-nitrosocystein (CysNO), S-nitroso-N-acetylpenicilamin (SNAP) jsou ve srovnání s NO stabilnější, mají delší dobu života a *in vivo* mohou tedy sloužit jako zásobní a transportní formy oxidu dusnatého (Martinez-Ruiz a Lamas, 2004; Gaston *et al.*, 2003). Endogenní GSNO byl poprvé popsán v lidských dýchacích cestách. Hladiny GSNO vzrůstají u pacientů se zápallem plic, a naopak u pacientů trpících astmatem jsou nízké (Gaston *et al.*, 1993; Gaston *et al.*, 1998). GSNO spolu s dalšími SNO byl identifikován v erythrocytech, polymorfních jaderných leukocytech, krevních destičkách, plazmě nebo mozkové tkáni (Gaston *et al.*, 1999)



Obr. 2 Strukturální vzorec S-nitrosoglutathionu.

2.2.1 Biosyntéza

Jsou známy celkem čtyři různé mechanismy vzniku SNO: 1) tvorbou vyšších oxidů dusíku přes autooxidaci NO, 2) reakcí NO radikálu s thiolem, 3) přes katalýzu za přítomnosti přechodných kovů nebo 4) trans-nitrosylací (Obr 3., Foster *et al.*, 2009; Martinez-Ruiz a Lamas, 2007). Biologicky nejvýznamnější jsou poslední dvě zmíněné reakce. U prvních třech zmíněných způsobů vzniku SNO vyžaduje reakce přítomnost elektronového akceptoru jako je O_2 , Cu^{2+} , Fe^{2+} , NAD^+ (Arnelle a Stamler, 1995).

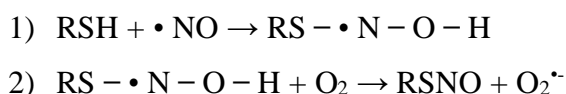
Reakce zahrnující tvorbu vyšších oxidů za aerobních podmínek závisí na koncentraci NO v systému, jelikož je třeba dvou molekul NO k vytvoření nitrosačního intermediátu. Proto tato reakce probíhá rychleji při zánětlivých reakcích, kdy je tok NO výrazně zvýšený a také za hydrofobních podmínek, kdy dochází k akumulaci NO v důsledku jeho lipofility (Gow *et al.*, 1997).

Tuto reakci můžeme zapsat následovně:

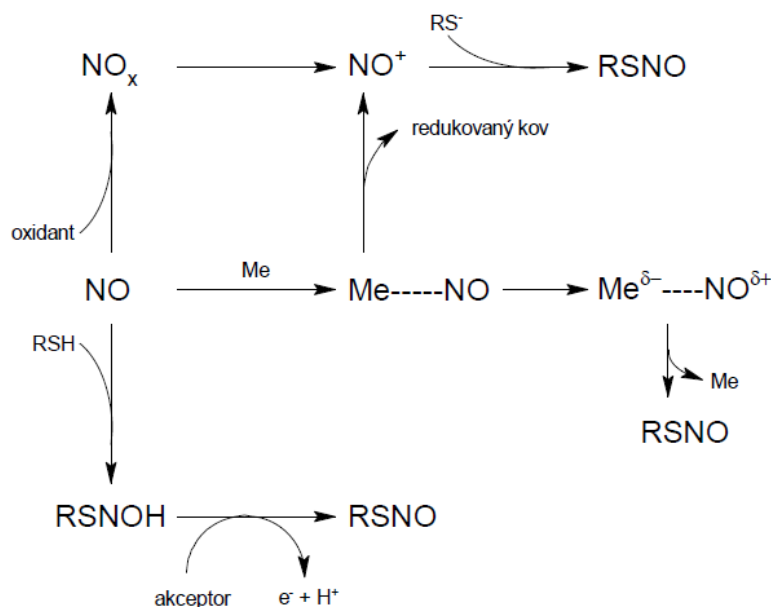
- 1) $2 NO + O_2 \rightarrow 2 NO_2$
- 2) $NO_2 + NO \rightarrow N_2O_3 (= ^+ON...NO^{2-})$
- 3) $^+ON...NO^{2-} + RSH \rightarrow RSNO + HNO_2$

(kde R je substrát pro S-nitrosaci)

První a druhý krok této reakce jsou kroky určující rychlost reakce a za fyziologických podmínek, kdy jsou koncentrace NO nanomolární a koncentrace O₂ mikromolární, probíhá první krok reakce poměrně pomalu (Gaston *et al.*, 2003). Dalším mechanismem popisujícím tvorbu SNO je reakce redukovaného thiolu a nitrosoniového kationu (NO⁺) nebo reakce thiolu s ONOO⁻ (Lancaster, 2008). Další mechanismus navrhli Gow *et al.* (1997), kdy v prvním kroku dochází k reakci thiolu s NO radikálem za vzniku radikálového meziprojektu, který je v druhém kroku přeměněn na SNO v přítomnosti elektronového akceptoru, kterým může být například NAD⁺.



U dvou plazmatických proteinů byla zjištěna schopnost tvorby SNO s využitím jejich kovových center. Prvním z nich je ceruloplasmin. Měď v oxidačním stavu 1 (Cu⁺) slouží jako elektronový akceptor, elektron putuje z Cu⁺ k ostatním atomům mědi v ceruloplasminu a NO⁺ je přenesen na thiolovou skupinu GSH. Také hemoglobin může katalyzovat tvorbu SNO (Gow a Stamler, 1998). Obecně jsou tedy SNO vytvářeny a aktivovány přes kovalentní interakce, zahrnující přenos NO⁺, ale příležitostně může dojít i k přenosu nitroxylového anionu (NO⁻), který může atakovat poměrně elektropozitivní -SH skupinu cysteinu například při S-nitrosylaci N-methyl-D-aspartát receptoru (Gaston *et al.*, 2003).



Obr. 3 Mechanismy S-nitrosylace (převzato a upraveno podle Gow *et al.*, 2004).

2.2.2 Stabilita a katabolismus

SNO jsou za fyziologických podmínek velmi nestabilní a velice snadno podléhají neenzymové degradaci za účasti redukčních činitelů přítomných v cytosolu. Vazba S-NO je vysoce polarizovaná, nestabilní, a proto SNO mohou jednoduše uvolnit NO, a tudíž jsou součástí S-thiolace nebo transnitrosylačních reakcí, při kterých dochází k přenosu NO skupiny z jedné molekuly na druhou. Avšak SNO mohou reagovat přímo aniž by došlo k uvolnění NO (Kovacs a Lindermayr, 2013). Hlavními produkty katabolismu SNO jsou NO a smíšené disulfidy (Shahani a Sawa, 2011). V biologických systémech a *in vitro* bylo popsáno několik dalších produktů degradace, které obsahují dusík a síru v různých oxidačních stavech (Tichá *et al.*, 2016). Stabilita SNO v roztoku je ovlivněna mnoha faktory, jako je světlo, teplota, pH, přítomnost kyslíku a kationtů přechodných kovů (Stamler a Toone, 2002).

2.2.2.1 Neenzymová degradace

Rozpad S-NO vazby může probíhat jako monomolekulární reakce, redukčním štěpením katalyzovaným kovy, nebo jako reakce vyššího řádu. Monomolekulární rozpad S-NO vazby může proběhnout homolytickým, nebo heterolytickým mechanismem, avšak heterolytické štěpení, kterým by vznikal NO^+ nebo NO^- ion není významné za fyziologických podmínek (Stamler a Toone, 2002). UV záření může indukovat homolytický rozpad SNO (Hogg, 2002). Při homolytickém rozpadu vznikají radikály $\text{NO}\cdot$ a $\text{RS}\cdot$, a poté může dojít k reakci dvou $\text{RS}\cdot$ radikálů (tento způsob je méně pravděpodobný vzhledem k velmi nízkým koncentracím obou $\text{RS}\cdot$ *in vivo*), nebo štěpením SNO vzniká $\text{RS}\cdot$ radikál, který reaguje s další molekulou SNO za vzniku disulfidu (Heinrich *et al.*, 2013). SNO mohou být také efektivně degradovány za pomoci iontů mědi Cu^+ . Význam této katalýzy *in vivo* není dosud plně objasněn, jelikož volná měď se ve většině tkání nachází v extrémně nízkých koncentracích. Ostatní ionty kovů jako např. Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} a Cr^{3+} jsou také schopny katalyzovat rozpad S-NO vazby (Williams, 1996). Savillova metoda, běžně používaná pro kvantitativní stanovení obsahu SNO v biologických vzorcích využívá Hg^{2+} ionty k účinné degradaci SNO (Saville, 1958).

Nízkomolekulární a proteinové SNO mohou být rychle a efektivně degradovány redukčními činidly přítomnými v cytosolu. Před redukčním prostředím mohou být SNO

chráněny v buněčných membránách, váčcích nebo když jsou obklopeny hydrofóbními částmi proteinových molekul (Rafikova *et al.*, 2002).

2.2.2.2 Enzymová degradace

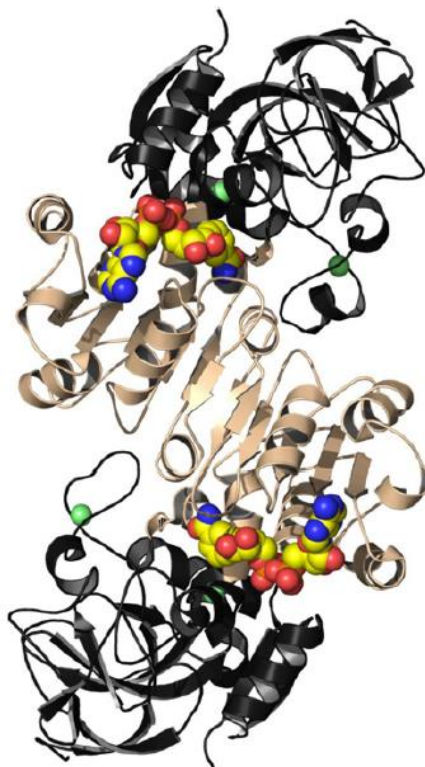
Denitrosace, tedy odstranění NO skupiny z cysteinového thiolu v postranním řetězci proteinů je důležitým aspektem NO signalizace. Dříve se předpokládalo, že probíhá spontánně a nepodléhá regulaci. Později bylo prokázáno, že tento proces podléhá enzymové katalýze, která může být regulována. Prozatím bylo popsáno několik enzymů, které zprostředkovávají denitrosaci Cys, z nichž jsou nejvýznamnější dva enzymové systémy: S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR, EC 1.1.1.284) a thioredoxinový systém (Trx/TrxR). Tyto vysoce konzervované systémy regulují denitrosaci a ovlivňují tak buněčnou signalizaci, odpovědi na stres a interakce mezi hostitelem a patogenem (Benhar *et al.*, 2009).

Enzym GSNOR je jedním z klíčových regulátorů hladiny SNO v rostlinné buňce (Corpas *et al.*, 2008). Ačkoliv tento enzym vykazuje vysokou specifitu k substrátu GSNO, může nepřímo kontrolovat hladinu proteinových SNO v buňce a obecně hraje důležitou roli v celkovém metabolismu NO a RNS (Malik *et al.*, 2011). Jelikož se tento enzym nachází v dostatečném množství ve většině tkání a buněk, předpokládá se, že má rozhodující vliv na ochranu buňky proti nitrosativnímu stresu (Benhar *et al.*, 2009).

Patří do rodiny Zn-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (EC 1.1.1). Dříve byl označován jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.1) kvůli jeho schopnosti katalyzovat NAD⁺ a glutathion-dependentní oxidaci formaldehydu. Avšak později bylo zjištěno, že mechanismus reakce zahrnoval oxidaci hydroxylové skupiny S-(hydroxymethyl)glutathionu za vzniku S-formylglutathionu. Proto byl tento enzym později pojmenován jako S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa, se systematickým názvem S-(hydroxymethyl)glutathion:NAD⁺ oxidoreduktasa (Staab *et al.*, 2008).

GSNOR je dimerní enzym složený ze dvou 40 kDA podjednotek. Každá z těchto podjednotek obsahuje dva atomy zinku a skládá se z velké katalytické domény a menší koenzymové domény. Jeden z atomů zinku se účastní katalýzy jako Lewisova kyselina a druhý má pouze strukturální funkci. Atom zinku v aktivním místě u lidské GSNOR a dalších členů savčí alkoholdehydrogenasové rodiny je vázán dvěma cysteiny, jedním

histidinem a jednou molekulou vody. Enzymové podjednotky jsou spojeny dvanáctivláknovým β -skládaným listem (Obr. 4; Kubienová *et al.*, 2013).



Obr. 4: Krystalová struktura GSNOR z rostliny *Solanum lycopersicum*. Katalytická doména je vyznačena černě a koenzymová doména hnědě. Atomy zinku jsou vyznačeny zelenými koulemi a koenzym NAD⁺ jako barevné atomové struktury (převzato z Kubienová *et al.*, 2013).

GSNOR se nachází převážně v cytosolu, ačkoliv jeho výskyt byl prokázán i v jádře a peroxisomech. V případě jaderného výskytu by mohl tento enzym sloužit k ochraně genetického materiálu před poškozením vlivem NO a také regulovat hladinu GSNO v jádře (Reumann *et al.*, 2007).

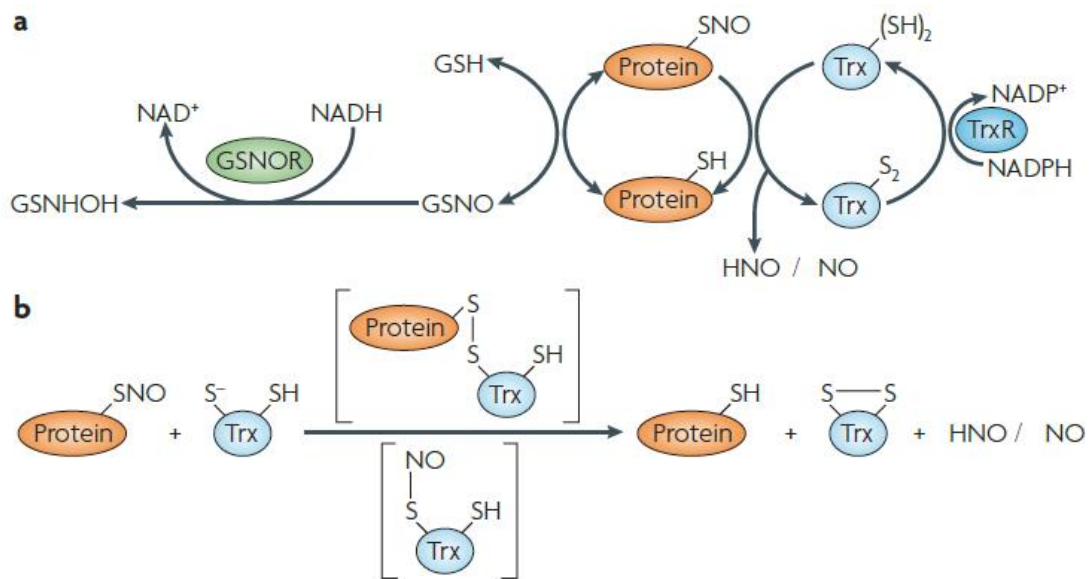
Reakční mechanismus redukce GSNO zahrnuje tvorbu nestabilního intermediátu N-hydroxysulfinamidu (GSNHOH, Obr. 5). Další reakční krok závisí na koncentraci GSH, při vyšších koncentracích vzniká glutathiondisulfid (GSSG) společně s hydroxylaminem, zatímco při nižších koncentracích, reakční intermediát GSNHOH může spontánně přecházet v glutathionsulfinamid (GSONH₂), který je dále hydrolyzován za vzniku glutathionsulfinové, nebo sulfonové kyseliny a amoniaku (Jensen *et al.*, 1998).

Thioredoxinový systém, který tvoří thioredoxin (Trx), thioredoxinreduktasa (TrxR, EC 1.8.1.9) a NADPH je disulfidreduktasový systém přítomný ve všech žijících organismech, hraje klíčovou roli při ochraně buňky před oxidačním stresem a má důležitou funkci při kontrole a udržení redoxní homeostázy (Sengupta a Holmgren, 2012). V poslední době byla Trx proteinům přisuzována řada funkcí včetně tlumení aktivity transkripčních faktorů. Během imunitní odpovědi u rostlin degraduje thioredoxin proteinové SNO. Je schopen rozlišit různé substráty S-nitrosylovaných proteinů a podílí se tak na vzniku rezistence vůči nákaze (Kneeshaw *et al.*, 2014). Ačkoliv byl thioredoxin dlouho považován za cíl pro S-nitrosaci (Haendeler *et al.*, 2002), později bylo prokázáno, že hraje důležitou roli při degradaci nízkomolekulárních i proteinových SNO, kde se účastní jak denitrosačních, tak i transnitrosačních reakcí (Mitchell a Marletta, 2005).

Byly popsány dvě isoformy Trx podle lokalizace v buňce, Trx1 nacházející se v cytosolu a v jádře a Trx2 přítomný v mitochondrii. Zde jsou zodpovědné za redukci disulfidů prostřednictvím jejich dithiolů, které se nachází v blízkosti aktivního místa. Redukované Trx (Trx-(SH)₂) reagují přímo s disulfidy proteinů prostřednictvím thiolového výměnného mechanismu za vzniku redukovaného proteinového thiolu a oxidovaného Trx (Trx-S₂). V rámci katalytického cyklu je Trx-S₂ následně převeden do původní podoby za pomoci TrxR a NADPH (Obr. 5, Broniowska *et al.*, 2013).

Na základě několika výzkumů se předpokládá, že Trx systém je primárním regulátorem S-nitrosoproteinů ve většině tkání. Tato hypotéza je také podpořena důkazem, že téměř všechny malé proteinové SNO (23-30 kDa) v buňkách lidského hepatocelulárního karcinomu jsou denitrosovány pomocí Trx systému (Sengupta *et al.*, 2007).

Mezi další enzymové systémy podílející se na katabolismu SNO patří xanthin/xanthinoxidasa (EC 1.17.3.2), γ -glutamyltranspeptidasa (γ -GT, EC 2.3.2.2), glutathionperoxidasa (EC 1.11.1.9) a Cu/Zn superoxiddismutasa (EC 1.15.1.1) (Gaston *et al.*, 2003).



Obr. 5 Biochemické mechanismy proteinové denitrosace: **a)** zprostředkované Trx a GSNOR, proteinové SNO mohou být také denitrosovány GSH za vzniku proteinového thiolu a GSNO, který je okamžitě a nevratně metabolizován enzymem GSNOR na produkt GSNHOH **b)** alternativní mechanismy denitrosace zahrnující tvorbu kovalentní vazby pomocí disulfidického můstku mezi Trx a daným proteinem nebo transnitrosační reakci (převzato a upraveno podle Benhar *et al.*, 2009).

2.2.3 Reaktivita

Transnitrosylace je pravděpodobně nejdůležitější reakcí SNO uvnitř buňky (Arnelle a Stamler, 1995). Jedná se o proces, při kterém je nitroso skupina přenesena z jedné molekuly S-nitrosylovaného proteinu nebo nízkomolekulárního thiolu na druhou molekulu, která se chová jako akceptor a obsahuje cysteinový thiol. Tato reverzibilní reakce zahrnuje nukleofilní atak thiolátového aniontu akceptoru na nitroso skupinu patřící donoru. GSNO je hlavním donorem NO mezi nízkomolekulárními SNO (CysNO, SNAP) a je známa jeho schopnost podléhat transnitrosylaci (Hogg, 1999). Tato reakce umožňuje například kovem katalyzovanou degradaci SNO, jestliže je nově vznikající SNO více náchylný k tomuto způsobu rozpadu (Singh *et al.*, 1996). Transnitrosylační reakce z donorového SNO, který nemůže být transportován do buňky, na akceptor, který prochází buněčnou membránou, umožňuje zvýšení obsahu NO v buňce (Zhang a Hogg, 2004). Tento mechanismus může vést k nitrosylaci proteinů, které nejsou za normálních podmínek cílem přímé S-nitrosylace.

Mezi proteiny účastníci se transnitrosylace patří hemoglobin, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (EC 1.2.1.9), caspasa3 (EC 3.4.22.56) nebo thioredoxin (Sengupta a Holmgren, 2013).

2.2.4 Biologické funkce

S-nitrosylace proteinů je považována za všudypřítomný mechanismus NO-dependentní buněčné signalizace a díky určitým chemickým vlastnostem SNO se jedná o zajímavý alternativní mechanismus regulace v rámci signálních drah NO. Jelikož je NO lipofilní, může volně procházet přes membrány, avšak v biologických systémech může být oxidován, a proto je jeho funkce jakožto druhého posla limitována. Tvorbou SNO je NO chráněn před oxidací a zároveň je limitována jeho schopnost difuze. Z toho plyne, že vznik SNO prodlužuje dobu bioaktivity NO a zároveň omezuje jeho funkčnost prostorovou (Matsumoto a Gow, 2011).

SNO mohou sloužit jako donory NO. Uvolněním NO dochází k jeho reakci s volnými radikály kyslíku a lipidů, což souvisí s ochranou buňky před oxidačním stresem (Jahnová *et al.*, 2013). NO se u rostlin účastní ochrany proti mikrobiálním patogenům (Delledonne *et al.*, 1998) a hraje důležitou roli v regulaci fyziologických procesů včetně růstu a vývoje rostliny nebo uzavírání průduchů (Wendehenne *et al.*, 2004).

S-nitrosylace je proces, který výrazně ovlivňuje vlastnosti i aktivitu cílových proteinů. Může aktivovat i inhibovat enzymy, ovlivňovat iontové kanály nebo transkripční faktory a touto cestou regulovat specifické procesy během vývoje rostliny a za podmínek biotického a abiotického stresu (Stamler, 1994). U *Arabidopsis thaliana* bylo popsáno přes 100 proteinů, které jsou potenciálními cíly S-nitrosylace *in vivo*. Mezi tyto proteiny patří signální, regulační, stresové, cytoskeletární proteiny a antioxidantní enzymy (Lindermayr *et al.*, 2005). Jedna z isoform enzymu methioninadenosyltransferasy (EC 2.5.1.6), která katalyzuje vznik S-adenosylmethioninu je inhibována S-nitrosylací cysteinového rezidua. S-adenosylmethionin je prekurzorem rostlinných hormonů ethylenu a polyaminů (Lindermayr *et al.*, 2006). Mikromolární koncentrace GSNO zvyšují transkripci genů jako je *CFTR* (transmembránový regulátor vodivosti iontů u cystické fibrózy), zatímco vyšší koncentrace mají opačný efekt. Tato regulační aktivita GSNO závisí na expresi a aktivitě γ -GT (Zaman *et al.*, 2004).

Je obecně známo, že SNO vykazují antimikrobiální vlastnosti (Stamler *et al.*, 2001). U rodu *Salmonella* se vyvinula specifická metabolická dráha, která zahrnuje zvýšenou tvorbu homocysteinu za účelem ochrany proti cytotoxicitě (De Groote *et al.*, 1996). U *Escherichia coli* dochází k inhibici bakteriální replikace nitrosací enzymu ribonukleotidreduktasa (EC 1.17.4.1), který určuje rychlost syntézy DNA (Roy *et al.*, 1995).

2.2.4.1 Intracelulární signalizace

Několik intracelulárních signálních a metabolických proteinů je ovlivňováno procesem S-nitrosylace. Tato modifikace znemožňuje přenos určitých proteinů, jako je například translokace p47^{phox} podjednotky NADPH oxidasy (EC 1.6.3.1) do cytoplazmatické membrány neutrofilu (Park, 1996), nebo transkripční regulaci zprostředkovanou nitrosylací proteinu IκB (Peng *et al.*, 1995). I metabolické procesy mohou být tímto procesem regulovány, včetně aktivace pentosafosfátového cyklu (Clancy *et al.*, 1994), ačkoliv tyto dráhy ještě nebyly přesně objasněny. GSNO a ostatní SNO mohou také v eukaryotických buňkách inhibovat enzymy spojené s oxidativním stresem. Mezi tyto enzymy patří například glutathionperoxidasa (EC 1.11.1.9, Fujii *et al.*, 1997), glutathionreduktasa (EC 1.8.1.7, Becker *et al.*, 1995), glutathion-S-transferasa (EC 2.5.1.18) a γ-glutamylcysteinsynthasa (EC 6.3.2.3, Han *et al.*, 1996).

Regulační i stresové reakce zprostředkované SNO byly popsány i v prokaryotických buňkách, kde SNO například způsobují upregulaci transkripčního faktoru oxyR u bakterie *Escherichia coli*, který se účastní odpovědi na oxidativní stres (Hausladen *et al.*, 1996). V tomto ohledu je důležité pochopit, že tyto citlivé intracelulární signální mechanismy v prokaryotických a eukaryotických buňkách mohou být narušeny vysokými hladinami SNO při zánětech a podmínkách nitrosativního stresu (Simon *et al.*, 1996).

2.2.4.2 Intercelulární signalizace

Jedním z nejdůležitějších aspektů NO signalizace je vytvoření intercelulární signální dráhy, následovanou přímým vstupem NO do buňky. NO může být vytvořen v jedné buňce, poté projít plazmatickou membránou do sousední buňky a aktivovat cGMP signální dráhu. Tato dráha je typickým příkladem NO signalizace a určuje tak daná kritéria pro přímou signalizaci (Matsumoto a Gow, 2011).

S-nitrosylace představuje alternativu k této signální dráze a zároveň mění některé její aspekty. Především se jedná o nové cílové proteiny včetně kinas a transkripčních faktorů, doba signalizace závisí na nitrosylaci a denitrosylaci, a tudíž na koncentraci a aktivitě regulačních proteinů v daném místě. Tyto dvě signální dráhy se navzájem ovlivňují. SNO, z kterého pochází NO, může hrát roli při regulaci guanylátcyklas. K přenosu signálů na membráně slouží enzym proteindisulfidomerasa (EC 5.3.4.1) (Sliskovic *et al.*, 2005). GSNO přenáší NO na povrch plazmatické membrány, kde proteindisulfidomerasa uvolní NO denitrosylační reakcí a proniká do buňky, kde dochází k aktivaci cGMP dráhy (Zhang a Hogg, 2005).

Nízkomolekulární SNO, jako je GSNO nebo CysNO jsou potenciálními přenašeči signálu v rámci signální dráhy zprostředkované SNO. GSH a zároveň i GSNO můžou být z buňky exportovány do extracelulárního prostoru (Ballatori *et al.*, 2009). Extracelulární GSH je ihned degradován na cytoplasmatické membráně enzymem γ -GT. Tento enzym odstraňuje z GSH glutamátový zbytek a současně přenáší cysteinylglycin do buňky. GSNO je taktéž substrátem pro γ -GT (Lipton *et al.*, 2001). Jelikož na savčí cytoplasmatické membráně není znám žádný GSH importér (Ballatori *et al.*, 2009), předpokládá se, že GSH ani GSNO nemohou znovu projít dovnitř buňky. Z toho důvodu je GSNO považován výhradně za exportní systém. Využití γ -GT jako importního systému by bylo energeticky náročné. Aby tento intercelulární komunikační systém mohl fungovat, je zřejmé, že SNO musí do buňky vstupovat, ale také z ní i vystupovat (Matsumoto a Gow, 2011).

2.3 Úloha S-nitrosace proteinů u rostlin

NO u rostlin obecně slouží jako regulátor mnoha fyziologických procesů, mezi které patří dormance, klíčení, růst vegetativních orgánů, vývoj kořenového systému, senescence nebo pohyb svěřacích buněk průduchů (Yu *et al.*, 2014). Reguluje buněčný metabolismus, aktivitu několika enzymů v cytosolu, biosyntézu fotosyntetických pigmentů a fotofosforylaci. Má také důležitou funkci v signálních drahách rostlinných hormonů a regulátorů a při odpovědích na abiotický a biotický stres. Účastní se apoptózy a systémové odpovědi na napadení rostliny patogeny (Domingos *et al.*, 2015).

Kyselina salicylová (SA) je důležitým rostlinným hormonem. Signální dráhy tohoto hormonu regulují odpověď rostlin na biotické stresové faktory jako je infekce mikrobiálními patogeny nebo napadení hmyzem (Kumar, 2014). Zvýšené koncentrace

SA při stresových podmínkách vedou k aktivaci obranných genů na lokální a systémové úrovni, které jsou zprostředkované proteinem NPR1. Subcelulární lokalizace a transkripční aktivita tohoto proteinu jsou regulovány S-nitrosací. Protein v neaktivní formě se nachází v cytosolu jako oligomer. U *Arabidopsis* vznikají intermolekulární disulfidické můstky u pěti z deseti cysteinových reziduí NPR1 proteinu. Infekce způsobená patogenem vede ke tvorbě SA, která vyvolá změny redoxního stavu, což může vést k rozpadu disulfidických můstků. Takto vzniklý aktivní monomer je přenesen do jádra, kde se může vázat na specifické transkripční faktory a spouštět tak expresi obranných genů (Dong, 2004). GSNO aktivuje oligomerizaci proteinu NPR1 prostřednictvím S-nitrosace Cys156 (Tada, 2009).

Důležitou roli v mechanismu působení SA má enzym karbonátanhydrasa (EC 4.2.1.1), nacházející se v chloroplastech, známý také jako SABP3 (protein vázající kyselinu salicylovou) vzhledem k jeho silné vazebné kapacitě k SA (Slaymaker *et al.*, 2002). S-nitrosace tohoto enzymu vede ke ztrátě aktivity a schopnosti vázat SA, tudíž slouží jako negativní odezva modulující obrannou reakci. S-nitrosace dále reguluje další SA-vazebné proteiny jako je katalasa (EC 1.11.1.6) a askorbátperoxidasa (EC 1.11.1.11, Correa-Aragunde *et al.*, 2013).

Ethylen je plynný rostlinný hormon regulující několik důležitých fyziologických procesů, jako je otvírání květů a zrání plodů. Signální dráhy ethylenu hrají roli při odpovědích rostliny na různé abiotické stimuly jako je hypoxie kořenů, poškození způsobené mrazem nebo mechanické poškození. Methioninadenosyltransferasa 1 (MAT1, EC 2.5.1.6) je klíčovým enzymem biosyntézy S-adenosylmethioninu, který slouží jako donor methylové skupiny v transmetylačních reakcích a jako substrát v biosyntéze ethylenu a polyaminů. V rostlinách byly popsány tři isoformy tohoto enzymu: MAT1, MAT2 a MAT3 (Lindermayr *et al.*, 2006). Po inkubaci MAT1 s GSNO, který slouží jako donor NO, došlo k 30% snížení aktivity. To bylo způsobeno S-nitrosací Cys114, což vedlo k částečné inhibici enzymové aktivity. Je dokázáno, že v celé řadě rostlinných procesů ethylen a NO působí antagonisticky. S-nitrosace isoformy MAT1 vede ke snížení tvorby S-adenosylmethioninu a následně snižuje hladinu ethylenu. Předpokládá se, že MAT1 může sloužit jako tzv. molekulární přepínač při regulaci interakce v signálních drahách ethylenu a NO (Lindermayr *et al.*, 2006).

Peroxiredoxiny představují skupinu enzymů s antioxidačními vlastnostmi, které jsou schopny redukovat širokou škálu substrátů odvozených od ROS. Jedním z nich je

peroxynitrit, který vzniká velice rychlou reakcí mezi NO a superoxidem (Gaupels *et al.*, 2011). Rostliny stále produkují malé množství peroxynitritu v aktivních fotosyntetizujících chloroplastech, zatímco během odpovědi rostliny na stresové podmínky, kdy dochází k nadměrné tvorbě NO a ROS, jsou pozorovány vysoké hladiny peroxynitritu (Sakamoto *et al.*, 2003). V závislosti na jejich lokalizaci bylo u rostlin popsáno pět hlavních tříd peroxiredoxinů (Dietz, 2011). Aktivita peroxiredoxinu II E, který se nachází ve stromatu chloroplastů, je inhibována S-nitrosací cysteinového zbytku v aktivním místě. Tato inhibice snižuje schopnost odbourávat peroxynitrit. Tento mechanismus byl popsán během hypersensitivní odpovědi u rostlin *Arabidopsis*, které byly infikovány avirulentním bakteriálním patogenem *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Romero-Puertas a Delledonne, 2007).

NO se také podílí na regulaci signální dráhy, která vede k zahájení apoptózy. Několik faktorů jako je typ buňky nebo dostupnost NO rozhoduje, zda se NO podílí na iniciaci apoptózy nebo buňku před apoptózou ochrání (Brune, 2003). Mechanismus anti-apoptického efektu NO je zprostředkován S-nitrosací kritického cysteinového zbytku v aktivním místě všech isoform kaspas (Martínez-Ruiz a Lamas, 2007).

Inhibice autoproteolytické aktivity prometakaspasy 9 (EC 3.4.22.62, AtMC9) prostřednictvím konstitutivní S-nitrosylace Cys147 byla popsána u *Arabidopsis* za fyziologických podmínek. Tato inhibice může být pozorována pouze v případě, že se AtMC9 nachází ve své inaktivní podobě, v aktivní formě není S-nitrosylací ovlivněna (Belenghi *et al.*, 2007).

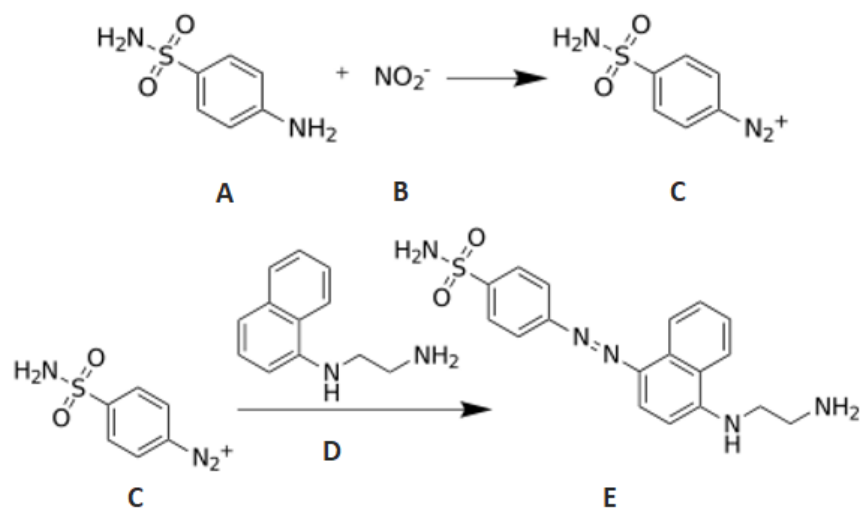
2.4 Metody analýzy S-nitrosothiolů

Jelikož jsou hladiny SNO *in vivo* velmi nízké, je kvantitativní stanovení poměrně obtížné. Navíc v přítomnosti dalších interferentů jako jsou thioly, kyselina askorbová nebo ionty kovů je vazba S-NO nestabilní (Giustarini *et al.*, 2007). Důležitý je při stanovení SNO jednak výběr vhodné analytické metody, ale i preanalytické zpracování vzorku. Důraz musí být kladen na thioly a dusitaný, které bývají ve vzorcích přítomny ve vysokých koncentracích a mohly by následně způsobit dodatečný vznik SNO, což by ovlivnilo konečný výsledek (Bramanti *et al.*, 2010). Jestliže jsou ve vzorku přítomny thioly, přidávají se SH-alkylační činidla jako je N-ethylmaleimid, který zabraňuje transnitrosačním reakcím. Volné -SH skupiny navíc mohou redukovat měďnaté ionty na měďné, což by způsobilo rozpad SNO. Aby nedošlo k degradaci způsobené kovem,

přidávají se ke vzorku chelatační činidla, nejčastěji EDTA (Giustarini *et al.*, 2007; Bramanti *et al.*, 2010). Vzorky by měly být uchovávány v chladu při 2-4 °C a měly by být chráněny před světlem. Stanovení může být také ovlivněno zvýšeným obsahem dusitanů v komerčně používaných chemikáliích nebo použitím celulosových filtrů (Giustarini *et al.*, 2007). Metody můžeme rozdělit na přímé nebo nepřímé. Mezi přímé metody řadíme například hmotnostní spektrometrii nebo imunochemické metody. Nepřímé metody jsou založeny na štěpení vazby S-NO a následné analýze uvolněných metabolitů. Rozpad SNO může být vyvolán chemicky nebo fotolýzou a uvolněné dusitany nebo NO• mohou být stanoveny spektrofotometricky, fluorimetricky nebo chemiluminescenční metodou. Vhodnou metodou pro identifikaci jednotlivých SNO je široce využívaná metoda biotin-switch (biotin-switch technique). Obecně u tohoto stanovení nejdříve dochází k chemické blokaci volných -SH skupin, poté k redukci SNO kyselinou askorbovou, označení uvolněných thiolů biotinylovanou látkou a následné určení s využitím imunoblottingu (Bramanti *et al.*, 2010).

2.4.1 Spektrofotometrické stanovení

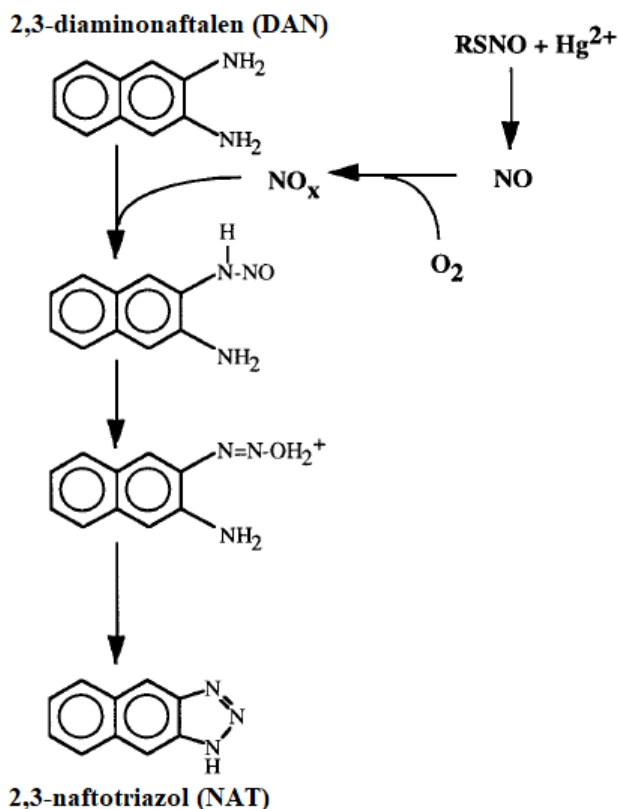
Kolorimetrické metody jsou pro stanovení SNO obecně nedostačující, jelikož jejich limit detekce (přibližně $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$) je obvykle blízko biologickým koncentracím. Spektrofotometrické stanovení SNO je nejjednodušší metodou vycházející z metody Griessovy. Savillova metoda je založena na reakci sulfanilamidu v kyselém prostředí HCl ($\text{pH} < 3$) (buď s přídavkem nebo bez přídavku HgCl_2) s dusitanem za vzniku diazoniového kationtu, který dále reaguje s N-(1-naftyl)ethylendiaminem (NED) za vzniku diazosloučeniny, vykazující silnou absorpenci okolo 540 nm (Obr. 6; Tsikas 2005). Jelikož je tato metoda založena na detekci dusitanů, je vhodné před analýzou odstranit všechny přítomné dusitany (Marley *et al.*, 2000). Toho můžeme docílit například přídavkem sulfamátu, který v kyselém prostředí redukuje NO_2^- na N_2 (Samouilov a Zweier, 1998). Ke kvantifikaci NO lze také využít 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonovou kyselinu (ABTS). NO v přítomnosti kyslíku mění ABTS na ABTS^+ , což vede ke zvýšení absorpčního maxima z 400 nm na 800 nm. Cook *et al.* (1996) provedli experiment, kdy vystavili GSNO 10 mmol.l^{-1} roztoku ABTS. V tomto případě nedošlo k okamžité oxidaci. Po přídavku $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ HgCl_2 došlo k prudkému vzrůstu absorpčního spektra mezi 400 a 800 nm.



Obr. 6 Griessova reakce: dusitany (B) v kyselém prostředí nejdříve reagují se sulfanilamidem (A) za vzniku diazoniového kationtu (C), který v dalším kroku reaguje s kopulačním činidlem NED (D) za vzniku diazosloučeniny (E) (převzato a upraveno podle Miranda *et al.*, 2001).

2.4.2 Fluorimetrické stanovení

Stanovení SNO fluorimetricky je založeno na diazotační reakci dusitanu, uvolněného z daného SNO za pomoci těžkého kovu, nejčastěji Hg²⁺, s 2,3-diaminonaftalenem (DAN). Touto reakcí vzniká stabilní fluoreskující sloučenina 2,3-naftotriazol (NAT), jejíž fluorescenci můžeme změřit při excitační vlnové délce 365 nm a emisní vlnové délce 450 nm (Obr. 7; Marzinzig *et al.*, 1997). Fluorimetrické metody založené na této diazotační reakci mohou být obecně využity ke stanovení dusitanů, dusičnanů a SNO (Tsikas, 2005). Fluorimetrické stanovení ovlivňují stejné interferenty jako u spektrofotometrické metody. Interferující dusitany mohou být odstraněny v kyselém prostředí sulfamátem (Samouilov a Zweier, 1998), nebo sulfanilamidem (Marley *et al.*, 2000). Marley *et al.* (2000) provedli experiment, kdy zkoušeli obě zmíněné látky pro odstranění dusitanů ze vzorku plasmy. Při použití 0,5% sulfanilamidu v prostředí 0,1 mmol.l⁻¹ HCl došlo ke kompletnímu odstranění dusitanů za vzniku diazoniové sloučeniny.



Obr. 7 Mechanismus fluorimetrického stanovení: reakcí DAN s dusitanem vzniká fluoreskující NAT (převzato a upraveno podle Cook *et al.*, 1996).

2.4.3 Chemiluminiscenční stanovení

Chemiluminiscenční stanovení je nejvíce používanou metodou stanovení SNO, především z důvodu nízkého detekčního limitu (Feelisch *et al.*, 2002). Jedná se o nepřímou analýzu SNO, založenou na měření NO vzniklého štěpením S-NO vazby. NO je oxidován působením O_3 za vzniku excitovaného oxidu dusičitého (NO_2^*). Tato molekula NO_2^* se ihned vrací do základního stavu a dojde k uvolnění přebytečné energie emisí světla, jehož vlnová délka leží v blízké infračervené oblasti spektra. Tento mechanismus lze popsat následující rovnicí:



Emitované světlo je poté detekováno a kvantifikováno s využitím fotonásobiče. Za předpokladu, že ozon je přítomen v nadbytku a podmínky reakce jsou konstantní, je množství emitovaného světla přímo úměrné koncentraci NO (Basu *et al.*, 2008). Tato metoda může být využita při měření biologických vzorků díky nízké rozpustnosti NO ve vodných roztocích (asi 2.0 mmol.l^{-1} při $20 \text{ }^\circ\text{C}$). Bylo popsáno několik způsobů

uvolnění NO z SNO, například chemické metody zahrnující využití reakční směsi Cu^+ /Cystein, trijodidová metoda nebo UV fotolýza (Giustarini *et al.*, 2007).

Jednou z nejpoužívanějších metod pro chemiluminiscenční stanovení SNO je trijodidová metoda, při které dochází ke štěpení S-NO vazby za pomoci I_2/I^- . U této metody je nutné před začátkem provést několik přípravných kroků (Giustarini *et al.*, 2007). Jelikož v kyselém prostředí vzniká z jodidu HI, který redukuje dusitany za vzniku NO, je součástí přípravy vzorků přidání sulfanilamidu v prostředí H^+ , pomocí kterého je možné rozlišovat SNO od již přítomných dusitanů (Marley *et al.*, 2000). SNO mohou být také odlišeny od nitrosylových komplexů železa přidáním okyseleného sulfanilamidu s přídavkem nebo bez přídavku $5 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ HgCl}_2$ (Basu *et al.*, 2008).

Štěpení S-NO vazby s využitím směsi Cu^+ /Cystein má několik výhod. Například neutrální pH, které je nutné pro redukční krok reakce zajišťuje, že dusitany, dusičnany a ani další NO_x , které mohou být přítomny, nejsou detekovány. Z tohoto důvodu je tato metoda vysoce specifická pro stanovení SNO. Cystein má v této reakci dvě funkce. Transnitrosační reakcí převádí všechny SNO na CysNO. Cu^+ poté redukuje NO^+ na NO za vzniku Cu^{2+} , který je poté cysteinem zpět redukován na Cu^+ (Giustarini *et al.*, 2007).

U fotolytické metody bylo upozorováno, že není dostatečně specifická pro štěpení vazby S-NO a při jejím použití může také dojít k uvolnění nitroso skupiny z nitrosaminů nebo nitrosylových komplexů železa, což může zkreslovat konečné výsledky (Giustarini *et al.*, 2007).

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Acros Organics (USA): glutathion

Fluka (Česká republika): chlorid měďný, DAN, EDTA

Lachema (Česká republika): octan měďnatý

Lach-Ner (Česká republika): aceton, diethylether, hydroxid sodný, kyselina chlorovodíková, ledová kyselina octová

Roth (Německo): dusičnan rtuťnatý

Sigma-Aldrich (Německo): chlorid rtuťnatý, dimethylformamid, dusitan sodný, jód, jodid draselný, L-cystein hydrochlorid, NED, sulfanilamid

3.2 Přístroje a vybavení

analytické váhy (Sartorius, Německo); analyzátor NO CLD 88 (Eco Physics, Švýcarsko); aparatura pro chemiluminiscenční detekci (Eppendorf, Německo); centrifuga chlazená (Eppendorf, Německo); elektromagnetická míchačka (Biosan, Lotyšsko); mikrodestičkový reader (Bio-Tek, USA); pH metr (XS instruments, Itálie); termostat láznový (Huber, Německo); termostat závěsný (Grant, UK); vakuová vývěva (Edwards, ČR); vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

3.3 Biologický materiál

Vzorky zamražených dospělých včel (*Apis mellifera*) a zamražených sedmidenních etiolovaných semenáčků hrachu setého (*Pisum sativum*) jsem obdržela od vedoucího práce.

3.4 Experimentální metody

3.4.1 Extrakce

Vzorky zamražených těl přibližně 18 dospělých včel byly rozděleny na jednotlivé tělní části – hlavu, hrud' a zadeček. K přípravě rostlinného extraktu byly použity celé zamražené etiolované klíčky hrachu setého. Vzorky byly za stálého chlazení na ledové lázni homogenizovány v třecí misce s činidlem Griess A v poměru 2 ml činidla Griess A na 1 g biologického materiálu s přidavkem mořského písku. Homogenizovaný extrakt byl centrifugován 10 minut při 16 000 g a 4 °C. Supernatant byl poté převeden do čistých mikrozkušavek a zamražen.

3.4.2 Příprava S-nitrosoglutathionu

GSNO byl připraven reakcí redukovaného glutathionu (GSH) s dusitanem v kyselém prostředí (Moore a Mani, 2002). Navážka 614 mg glutathionu (GSH, 2 mmol, Mr = 307,3) byla rozpuštěna v 3 ml 0,5 M HCl a vychlazena na ledové lázni. Poté byla za stálého míchání k roztoku GSH přidána navážka 138 mg NaNO₂ (2 mmol, Mr = 69). Reakční směs byla ponechána 40 minut na ledové lázni. Vzniklá červená sraženina byla odsáta na filtračním papíře na Büchnerově nálevce a promyta 2x 10 ml ledově vychlazené deionizované H₂O, 2x 10 ml ledově vychlazeného acetonu, 2x 10 ml ledově vychlazeného diethyletheru. Odsátá sraženina se nechala na alobalu asi 30 minut sušit v exsikatoru. Vysušený produkt byl seškrabán z filtračního papíru a ihned zamražen.

3.4.3 Spektrofotometrické stanovení SNO Savillovou metodou

Principem této metody je uvolnění NO⁺ ze SNO za katalýzy Hg²⁺ soli. Vzniklý dusitan v kyselém prostředí vytváří diazoniovou sůl, která dále kopuluje s činidlem NED za tvorby azobarviva, které je detekováno spektrofotometricky při 540 nm (Moore a Mani, 2002).

Měření bylo prováděno na 96-jamkových mikrodestičkách. Nejdříve bylo do každé jamky napipetováno 50 µl standardu (GSNO) nebo vzorku, poté 150 µl činidla Griess A, nebo B. Tato směs se ponechala 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě a poté bylo přidáno 100 µl činidla NED. Po dalších 5 minutách inkubace byla změřena absorbance při 540 nm. Alternativou k tomuto postupu bylo provedeno měření s činidlem B, při jehož přípravě byl použit 1% Hg(NO₃)₂ namísto 1% HgCl₂. Činidlo Griess A bylo použito pro odstranění interference dusitanů při stanovení SNO v extraktech. Postup je

stejný jako při použití činidla B, s tím rozdílem, že činidlo A neobsahuje těžký kov, který by rozštěpil vazbu S-NO na dusitany. V reakci tedy reagují pouze dusitany již přítomné ve vzorku.

Použité roztoky:

Griess A: 3,5% sulfanilamid v 0,5 mol.l⁻¹ HCl

Griess B: 3,5% sulfanilamid v 0,5 mol.l⁻¹ HCl + 1% HgCl₂

Činidlo NED: 0,1% N-(1-naftyletylen)diamin v deionizované H₂O

3.4.4 Fluorimetrické stanovení SNO metodou s DAN

Metoda je založena na uvolnění NO z SNO za katalýzy Cu²⁺ nebo Hg²⁺ iontů. Vzniklý NO reaguje v neutrálním prostředí s 2,3-diaminonaftalenem (DAN) za tvorby fluorescenčního 2,3-naftotriazolu (NAT), jehož fluorescence je měřena v alkalickém prostředí při excitaci 375 nm a emisi 450 nm (Cook *et al.*, 1996).

Měření bylo prováděno na 96-jamkových mikrodestičkách. Nejdříve bylo do každé jamky napipetováno 220 µl standardu (GSNO) nebo vzorku, poté 10 µl činidla DAN a 10 µl 2,5 mmol.l⁻¹ roztoku Cu(Ac)₂. Tato směs se ponechala 60 minut inkubovat při laboratorní teplotě a poté bylo přidáno 10 µl 10 mol.l⁻¹ NaOH, který reakční směs stabilizoval. Byla změřena fluorescence při excitační vlnové délce 375 nm a emisní vlnové délce 450 nm.

Použité roztoky:

Činidlo DAN: 7,5 mmol.l⁻¹ DAN v dimethylformamidu

Činidlo Cu(Ac)₂: 2,5 mmol.l⁻¹ Cu(Ac)₂ v deionizované H₂O

3.4.5 Chemiluminiscenční stanovení dusitanů a SNO

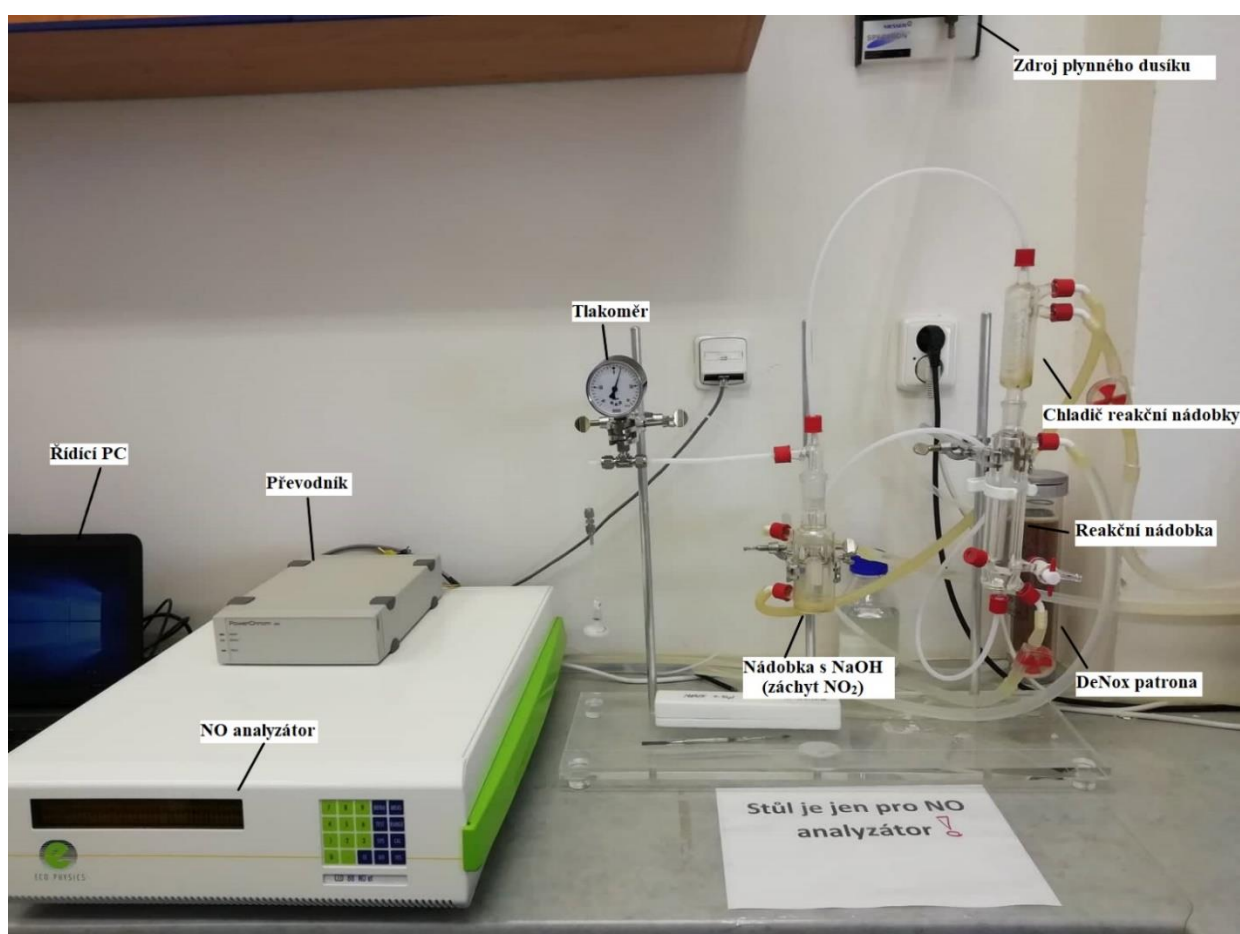
Použitá metoda je založena na použití chemiluminiscenčního analyzátoru ke stanovení NO uvolněného chemickou reakcí z SNO. Ke štěpení vazby S-NO k uvolnění plynného NO byla využita trijodidová a Cu/Cys metoda. Reakční směs byla vnesena do reakční nádoby, ke které byly později nastříkovány jednotlivé vzorky pomocí Hamiltonovy pipety. Reakční nádobka byla po celou dobu měření termostatována na požadovanou teplotu. K reakční nádobce byl také připojen chladič, kterým proudila chlazená voda o teplotě 5-10 °C. Proud plynného N₂ procházel nejdříve DeNox patronou a sloužil k odvedení vznikajícího plynného NO do chemiluminiscenčního analyzátoru.

Nežádoucí oxid dusičitý byl zachycen v nádobce s NaOH. Tlak dusíku byl po celou dobu měření kontrolován na tlakoměru a udržován (Obr. 8).

Princip chemilumiscenční metody lze obecně popsat touto rovnicí:



NO reaguje s ozonem za vzniku excitovaného oxidu dusičitého, který při návratu do základního stavu uvolní přebytečnou energii emisí světla, jehož vlnová délka leží v blízké infračervené oblasti spektra. Množství emitovaného světla detekovaného přístrojem je přímo úměrné koncentraci NO (převzato z manuálu pro analyzátor firmy Eco Physics).



Obr. 8 Popis reakční aparatury a dalšího příslušenství pro chemiluminiscenční stanovení.

Stanovení SNO:

Reakční směs: 1 mmol.l⁻¹ L-cystein a 100 μmol.l⁻¹ CuCl v 400 ml deionizované H₂O, pH 6,5 (upraveno na tuto hodnotu pomocí 1 mol.l⁻¹ NaOH).

Po spuštění analyzátoru CLD 88 bylo do reakční nádoby napipetováno 7 ml reakční směsi, tato směs byla termostatována na teplotu 50 °C. Poté byl spuštěn průtok

plynného dusíku aparaturou. Po ustálení signálu bylo zahájeno měření opakovaným nastříkáním 10 μl vzorků GSNO. Reakční směs byla vždy po 30 minutách měření vyměněna, aby byla zajištěna dostatečná účinnost.

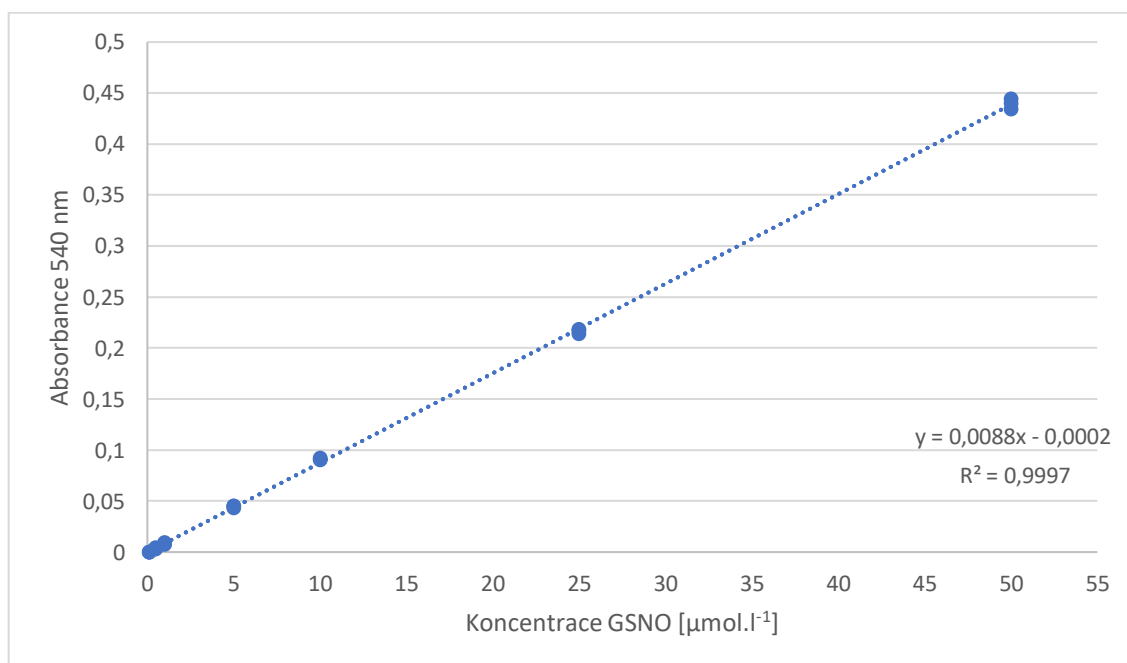
Alternativní způsob stanovení SNO byl vyzkoušen za použití reakční směsi připravené následujícím postupem: pro 10 ml směsi bylo rozpuštěno 52,5 mg KI a 33,6 mg I_2 v 2,1 ml deionizované H_2O a 7,9 ml ledové CH_3COOH . Takto připravená směs byla míchána cca 15 minut na magnetické míchačce. Poté byly odstraněny dusitany tak, že 180 μl roztoku GSNO bylo smícháno s 20 μl 100 mmol.l^{-1} sulfanilamidu (připraveného rozpuštěním 172 mg sulfanilamidu v 10 ml 2 mol.l^{-1} HCl) a inkubováno na ledu ve tmě 10 minut. Před vlastním měřením bylo do reakční nádoby napipetováno 5 ml reakční směsi, která byla vyhřívána na teplotu 30 $^\circ\text{C}$. Měření probíhalo obdobně jako v předešlém postupu.

4 Výsledky a diskuze

Cílem práce bylo porovnat vybrané metody stanovení SNO (spektrofotometrickou Savillovu metodu, fluorimetrickou metodu s DAN a chemiluminiscenční metodu) a určit jejich výhody a nevýhody. Dalším úkolem bylo ověření použití těchto metod pro stanovení obsahu SNO v extraktech hrachu setého (*P. sativum*) a extraktech z hlaviček, hrudníků a zadečků včely medonosné (*A. mellifera*).

4.1 Kalibrace Savillovy metody

Pro stanovení koncentrace SNO ve vzorcích bylo potřeba vytvořit kalibrační křivky. K jejímu sestavení pro Savillovu metodu byly připraveny roztoky GSNO v 0,5 mol.l⁻¹ HCl o koncentracích 0,1–50 μmol.l⁻¹. Kalibrační přímka vykazuje linearitu v daném koncentračním rozmezí ($R^2=0,9997$, Obr. 9).



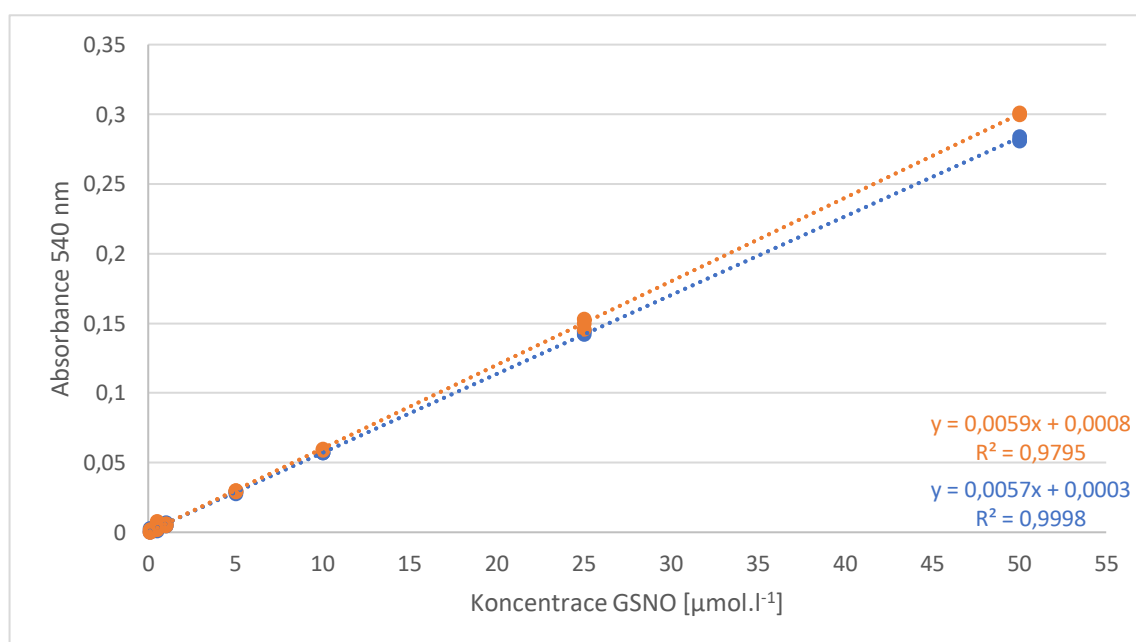
Obr. 9 Kalibrační křivka pro stanovení GSNO Savillovou metodou s využitím HgCl₂ (n=3).

Pro 3 nejnižší koncentrace kalibrační řady byly vypočítány relativní chyby měření (Tab. 1). Z těchto výsledků je patrné, že metoda poskytuje spolehlivé výsledky i při nižších koncentracích, které jsou blízké limitu detekce.

Tab. 1 Výpočet relativní chyby pro 3 nejnižší koncentrace kalibrační řady při stanovení SNO Savillovou metodou.

Koncentrace GSNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Absorbance	Vypočítaná koncentrace [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Relativní chyba [%]
0,5	0,004	0,48	-4,5
0,5	0,003	0,36	-27,3
0,5	0,003	0,36	-27,3
1	0,007	0,82	-18,2
1	0,008	0,93	-6,8
1	0,009	1,05	4,5
5	0,045	5,14	2,7
5	0,043	4,90	-1,8
5	0,045	5,14	2,7

Byla také sestavena kalibrační křivka, kdy bylo použito činidlo Griess B s 1% $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (Obr. 10). Po napipetování vzorku a činidla B byla nejdříve provedena původní inkubace 5 minut před přidáním činidla NED. Poté byla provedena druhá varianta, kdy činidlo NED bylo přidáno ihned po přidavku činidla B ke vzorku. K sestavení kalibrační křivky byly opět připraveny roztoky GSNO v $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl o koncentracích $0,1\text{--}50 \mu\text{mol.l}^{-1}$.



Obr. 10 Kalibrační křivky pro stanovení GSNO Savillovou metodou s použitím $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (modrá barva-bez inkubace, oranžová barva-s inkubací, $n=3$).

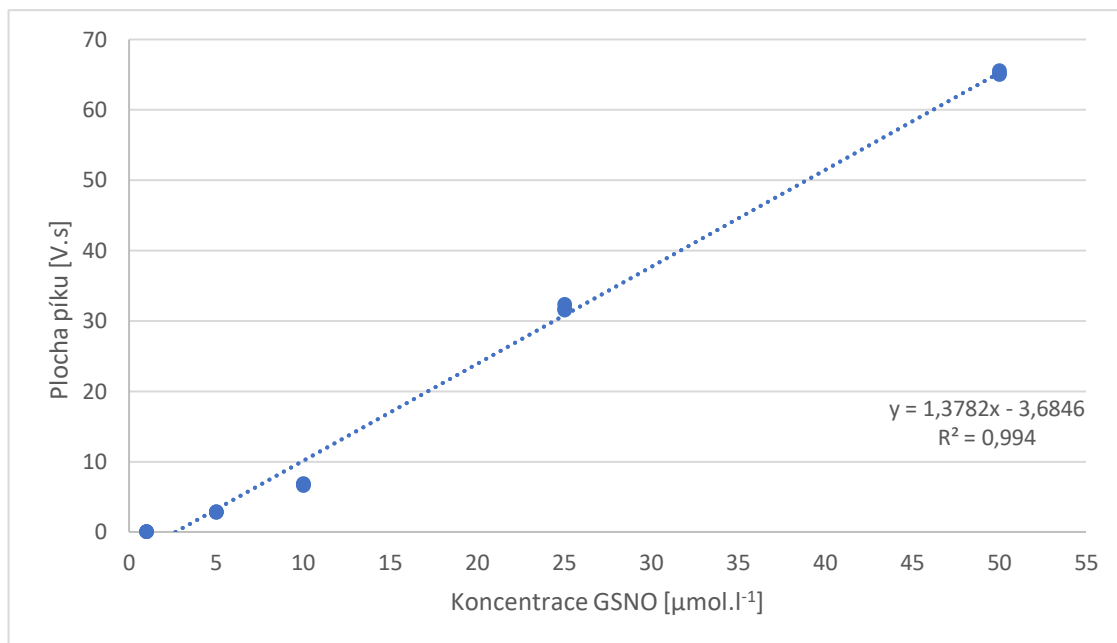
Z uvedených grafů (Obr. 9, Obr. 10) vyplývá, že směrnice kalibrační přímky při použití činidla HgCl_2 je vyšší, což znamená, že stanovení koncentrace SNO bude citlivější při

použití tohoto činidla. Podle Swift a Williams (1997) je rozklad vazby S-NO přibližně 10^3 rychlejší při použití dusičnanu. To odpovídá faktu, že dusičnanová sůl je ve vodě plně disociovaná, tedy ve formě Hg^{2+} a NO_3^- . Chlorid rtuťnatý je však v roztoku přítomen ve formě iontů HgCl^+ a Cl^- . Následkem je, že rychlostní konstanta je vyšší v prvním případě, jelikož je vyšší koncentrace volného Hg^{2+} . $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ tedy štěpí vazbu S-NO rychleji než HgCl_2 , a proto je použití činidla Griess B s touto solí vhodnou alternativou při stanovení SNO Savillovou metodou, jelikož nemusí být prováděna pětiminutová inkubace před přidáním činidla NED (Swift a Williams, 1997).

4.2 Kalibrace chemiluminiscenční metody

Pro chemiluminiscenční metodu byla připravena kalibrační řada GSNO v $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl o koncentracích $1\text{--}50 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$. Kalibrační přímka vykazuje linearitu v daném koncentračním rozmezí ($R^2=0,994$, Obr. 11). Bylo vyzkoušeno i měření roztoků GSNO o koncentracích 10 a 100 nmol.l^{-1} , avšak tyto koncentrace neposkytovaly signál odlišitelný od blanku. Mioto *et al.* (2017) uvádějí u chemiluminiscenční metody limit detekce ($\text{LOD}=0,06 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$) a limit kvantifikace ($\text{LOQ}=0,2 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$). Limitu detekce podle Miota *et al.* (2017) se nepodařilo dosáhnout, pravděpodobně kvůli nastavení přístroje, u kterého byl zvolen rozsah měření 500 ppb . Takové nastavení rozsahu měření bylo nutné pro analýzu SNO v extraktech biologického materiálu, kde koncentrace SNO přesahovaly hodnotu $50 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$ a rozsah měření 50 ppb by tedy byl nedostatečný. Nicméně při větším rozsahu měření není detekce dostatečně citlivá v nízkých koncentracích.

Samouilov a Zweier (1998) prokázali, že dusitany ve vzorku mohou způsobovat interferenci. Pokud se totiž nachází v kyselém prostředí dojde k tvorbě NO způsobené dismutací HNO_2 . Jsou-li dusitany přítomny ve vysokých koncentracích, může dojít k překrytí signálu NO uvolněného z SNO. Při pH vyšším než $6,5$ je takto vzniklý NO téměř nedetekovatelný. Proto byla reakční směs Cu/Cys před měřením upravena na pH $6,5$.



Obr. 11 Kalibrační křivka pro stanovení SNO chemiluminiscenční metodou (n=3).

I u této metody byly pro 3 nejnižší koncentrace vypočítány relativní chyby měření (Tab. 2). U nejnižší koncentrace $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a také u $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ je relativní chyba vysoká, a proto hodnoty naměřené v této koncentrační oblasti nebudou poskytovat příliš spolehlivé výsledky.

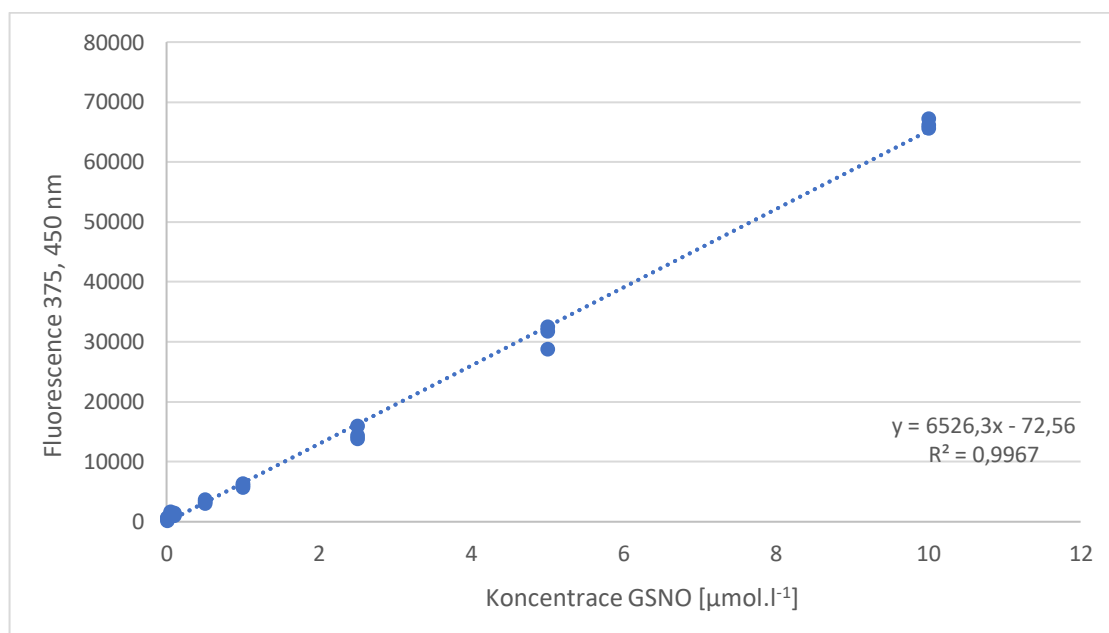
Tab. 2 Výpočet relativní chyby pro 3 nejnižší koncentrace kalibrační řady při stanovení SNO chemiluminiscenční metodou.

Koncentrace GSNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Plocha píku [V.s]	Vypočítaná koncentrace [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Relativní chyba [%]
1	0,093	2,74	174,1
1	0,094	2,74	174,1
1	0,103	2,75	174,8
5	2,934	4,80	-4,0
5	2,918	4,79	-4,2
5	2,852	4,74	-5,1
10	6,677	7,52	-24,8
10	6,862	7,65	-23,5
10	6,856	7,65	-23,5

Samouilov a Zweier (1998) také navrhli vhodnou alternativu reakční směsi, kterou je směs obsahující hydrochinon/chinon v Tris pufru ($0,5\text{--}2\text{ mol.l}^{-1}$, $\text{pH} > 10$) při $60\text{ }^\circ\text{C}$. V tomto případě došlo k úplnému rozštěpení vazby S-NO během 60 s. Získaný signál byl lineární v koncentračním rozmezí $0,01\text{--}1000\text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$ s odchylkou menší než 5 %.

4.3 Kalibrace fluorimetrické metody

U fluorimetrické metody byla sestavena kalibrační křivka GSNO v deionizované H_2O o koncentracích $0,05\text{--}10\text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$. Kalibrační přímka vykazuje linearitu v daném koncentračním rozmezí ($R^2=0,9967$, Obr. 12). Je zde však vidět rozdíl oproti předchozím dvou metodám, kdy byl připraven roztok GSNO v HCl, tedy v kyselém prostředí. Pro tuto metodu je nutné neutrální pH reakční směsi, aby mohl být vytvořen fluoreskující 2,3-naftotriazol (Cook *et al.*, 1996). Ke štěpení GSNO byl v experimentu použit Cu^{2+} , avšak Cook *et al.* (1996) uvádějí, že Hg^{2+} je při štěpení vazby S-NO efektivnější. Uvádějí také, že touto metodou bylo možno detekovat až 50 nmol.l^{-1} koncentrace GSNO, ale při nižších koncentracích je potřeba delší čas inkubace. U 100 nmol.l^{-1} roztoků jsou to až 2 h.



Obr. 12 Kalibrační křivka pro stanovení SNO fluorimetrickou metodou ($n=3$).

Také u této metody byly vypočítány relativní chyby pro 3 nejnižší koncentrace kalibrační řady (Tab. 3). Relativní chyby jsou pro dvě nejnižší koncentrace 0,05 a 0,1

$\mu\text{mol.l}^{-1}$ vysoké, výsledky proto nebudou pro takto nízké koncentrace spolehlivé. Důvodem je pravděpodobně to, že se tyto koncentrace nacházejí blízko limitu detekce.

Tab. 3 Výpočet relativní chyby pro 3 nejnižší koncentrace kalibrační řady při stanovení SNO fluorimetrickou metodou.

Koncentrace GSNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Fluorescence	Vypočítaná koncentrace [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Relativní chyba [%]
0,05	1656	0,27	429,7
0,05	1104	0,18	260,6
0,05	867	0,14	187,9
0,1	1421	0,23	128,9
0,1	1270	0,21	105,7
0,1	1004	0,17	64,9
0,5	3689	0,55	15,3
0,5	3403	0,53	6,5
0,5	3024	0,47	-5,1

Mioto *et al.* (2017) ve své práci uvedli alternativní metodu fluorimetrického stanovení, kdy místo štěpení vazby S-NO je využito fotolýzy pomocí UV transiluminátoru při vlnové délce 302–312 nm. K detekci uvolněného NO slouží fluorofor diamino-rhodamin a fluorescence je poté měřena při excitační (560 nm) a emisní (575 nm) vlnové délce. Byl zjištěn limit detekce (LOD=0,14 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a limit kvantifikace (LOQ=0,48 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Bylo prokázáno, že tato metoda je přibližně 5x citlivější než Savillova metoda, je vhodná pro stanovení SNO u rostlin, není ovlivněna interferencí dusitanů a není manuálně náročná. Měření bylo prováděno u rostlin *Arabidopsis* a také u rostlin rajčete a kukuřice. Ve všech případech byly změřené koncentrace SNO pod limitem detekce Savillovy metody (LOD=0,77 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) (Mioto *et al.*, 2017).

4.4 Stanovení SNO v etiolovaných semenáčcích hrachu setého (*P. sativum*)

Třemi používanými metodami byl změřen obsah SNO nejdříve v čistém extraktu a poté po přidavku GSNO, který byl na odpovídající koncentraci naředěn získaným extraktem z hrachu setého (Tab. 4-6). Po přidavku GSNO k extraktu z hrachu setého došlo u všech zkoumaných metod ke zvýšení hladiny SNO, ale tyto hodnoty neodpovídaly hodnotám teoretickým. U Savillovy a chemiluminiscenční metody byly hodnoty vypočítaného přidaného GSNO nižší než teoretické hodnoty, zatímco u fluorimetrického stanovení byly mnohdy až dvojnásobně vyšší. Rozdíly v naměřených hodnotách u různých metod mohou být způsobeny interferujícími látkami přítomnými ve vzorku. Určité látky

způsobující interferenci u jedné metody, nemusí ovlivňovat další metodu. Může například docházet k rozkladu přidaného GSNO, což by vysvětlovalo snížené hodnoty, nebo naopak některé látky mohou poskytovat falešně pozitivní výsledky, což má za následek zvýšení hodnoty SNO ve vzorku.

Podle Cook *et al.* (1996) způsobují u fluorimetrické a kolorimetrické metody interferenci kyselina askorbová, dithiothreitol a GSH. Přítomnost těchto látek v koncentracích vyšších než 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ vedla až k 50% poklesu fluorescence. Merkaptoethanol, přítomný dokonce v nižších koncentracích 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ způsobil, že nebyl detekován žádný fluorescenční signál. Marley *et al.* (2000) při měření chemiluminiscenční metodou uvádějí, že je vhodné přidat N-ethylmaleimid ke vzorkům, který způsobí alkylaci volných -SH skupin, stabilizuje SNO a nedochází poté k dodatečné S-nitrosaci. Bramanti *et al.* (2010) ve své práci uvedli, že přítomnost enzymu γ -glutamyltranspeptidasy ve vzorku způsobuje rozklad GSNO. Aby se zabránilo ztrátě GSNO, je třeba tento enzym inhibovat směsí serinu a kyseliny borité.

Airaki *et al.* (2011) stanovili obsah GSNO v listech, stoncích a kořenech papriky (*Capsicum annuum L.*) a také v listech *Arabidopsis* pomocí techniky LC-ES/MS. Co se týče obsahu GSNO v rostlinných částech papriky, nejvyšší obsah byl naměřen v kořenech a to přibližně $7,9 \pm 1,9 \text{ nmol.g}^{-1} \text{ FW}$. V listech *Arabidopsis* byl změřen obsah GSNO $3,7 \pm \text{nmol.g}^{-1} \text{ FW}$. Chaki *et al.* (2011) provedli experiment, kdy vystavili semenáčky slunečnice (*Helianthus annuus*) pěti rozdílným podmínkám (nízkým teplotám, mechanickému poškození, vysoké intenzitě světla, nepřetržitému světlu a nepřetržité tmě). Poté byl metodou chemiluminiscenční detekce změřen obsah SNO. Oproti kontrolní rostlině byl obsah SNO výrazně vyšší pouze u rostlin, které byly vystaveny mechanickému poškození, a to více než čtyřikrát.

Tab. 4 Výsledky stanovení S-nitrosothiolů ve vzorku hrachu setého Savillovou metodou (n=3).

<i>Savillova metoda</i>	Koncentrace SNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Vypočítaná koncentrace přidaného GSNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
Extrakt	$18,78 \pm 0,2$	
Extrakt + 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	$21,37 \pm 0,3$	2,59
Extrakt + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	$23,63 \pm 0,3$	4,85
Extrakt + 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	$31,83 \pm 0,9$	13,05

Tab. 5 Výsledky stanovení S-nitrosothiolů ve vzorku hrachu setého chemiluminiscenční metodou (n=3).

<i>Chemiluminiscenční metoda</i>	Koncentrace SNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Vypočítaná koncentrace přidaného GSNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
Extrakt	2,96 \pm 0,0	
Extrakt + 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	5,13 \pm 0,0	2,17
Extrakt + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	8,06 \pm 0,0	5,10
Extrakt + 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	15,98 \pm 0,7	13,02

Tab. 6 Výsledky stanovení S-nitrosothiolů ve vzorku hrachu setého fluorimetrickou metodou (n=3).

<i>Fluorimetrická metoda</i>	Koncentrace SNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Vypočítaná koncentrace přidaného GSNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
Extrakt	14,89 \pm 2,1	
Extrakt + 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	19,33 \pm 1,0	4,44
Extrakt + 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	24,61 \pm 0,4	9,72
Extrakt + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	36,03 \pm 0,2	21,14

4.5 Stanovení SNO v tělních částech včely medonosné (*A. mellifera*)

Stejným způsobem jako u hrachu setého byly všemi třemi metodami proměřeny extrakty z tělních částí včely medonosné (Tab. 7-9). U výsledků Savillovy a fluorimetrické metody byly u většiny případů po přidavku GSNO hladiny SNO nižší než v čistých extraktech. U chemiluminiscenční metody byly koncentrace v čistých extraktech nulové.

O obsahu SNO u hmyzu a konkrétně u včel je zatím velmi málo známo, a proto jsou zde pro porovnání uvedeny informace získané z výzkumů zaměřených na živočichy a na zdravé či nemocné osoby. Rozsáhlý výzkum je již několik let veden v oblasti stanovení SNO v lidské krevní plazmě. Mezi první zmínky patří výsledky skupiny Stamler *et al.* (1992), kteří stanovili obsah SNO v plazmě přibližně 7 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, kdy ke štěpení vazby S-NO byla využita fotolýza, která je obecně nespecifická při stanovení SNO a může docházet k uvolnění NO také z dusitanů a nitrosaminů. Tento výsledek byl tedy považován za nadhodnocený. Naseem *et al.* (1996) předpokládali obsah SNO v plazmě v rozmezí 15-25 nmol.l^{-1} . To bylo potvrzeno v práci Marley *et al.* (2000), kdy s využitím chemiluminiscenční metody byly stanoveny koncentrace v plazmě 28 $\text{nmol.l}^{-1} \pm 7$ SNO. Jako reakční směs byla použita směs $\text{Cu}^+/\text{I}_2/\text{I}^-$, dusitany

byly odstraněny sulfanilamidem a ke stabilizaci SNO sloužil N-ethylmaleimid a EDTA. Tato metoda je považována za spolehlivou metodu při stanovení nanomolárních koncentrací SNO v biologických vzorcích. Tento názor vyvrátili Tsikas *et al.* (2013) s využitím techniky UPLC-MS/MS, kdy měřili obsah SNO v plazmě u 10 zdravých jedinců. Ani v jednom případě nepřesahovaly koncentrace SNO hodnotu $2,8 \text{ nmol.l}^{-1}$, což byl limit kvantifikace této metody.

Giustarini *et al.* (2007) ve své práci shrnuli výsledky výzkumů, kdy byly měřeny hladiny SNO v krevním séru nebo krevní plazmě. U krysy byla v několika výzkumech a odlišnými metodami změřena koncentrace SNO. Výsledky byly různé, a to od nízkých nanomolárních koncentrací až po nejvyšší hodnotu $1,78 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ získanou měřením metodou chemiluminescenční detekce. Vyšší hladiny SNO byly naměřeny v lidských vzorcích, a to především u jedinců trpících nějakým onemocněním nebo u těhotných žen. Celkově nejvyšší hladiny SNO byly sledovány u jedinců s městnavým srdečním selháním, a to přibližně $14,7 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Giustarini *et al.*, 2007).

Jelikož výsledky získané z měření extraktů včel jsou v porovnání s uvedenými experimenty několikanásobně vyšší, lze tedy konstatovat, že pravděpodobně neodpovídají skutečným hodnotám. Stejně jako u výsledků hrachu setého mohou opět určité látky rušit stanovení SNO a dávat falešně pozitivní výsledky. Může také docházet k dodatečnému vzniku SNO, jestliže byly ve vzorku přítomny vysoké koncentrace dusitanů a thiolů. (Giustarini *et al.*, 2007). Je také možné, že nejbližší skutečným hodnotám jsou výsledky získané z chemiluminiscenčního analyzátoru (Tab. 8), kdy byly naměřeny nulové koncentrace SNO. Koncentrace SNO ve včelích extraktech mohou být blízké limitu detekce, nebo dokonce pod limitem detekce této metody.

Tab. 7 Výsledky stanovení S-nitrosothiolů v tělních částech včely medonosné Savillovou metodou (n=3).

<i>Hlava</i>	Koncentrace SNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Vypočítaná koncentrace přidaného GSNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
Extrakt	109,17 ± 5,7	
Extrakt + 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	86,47 ± 2,3	-22,70
Extrakt + 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	101,68 ± 11,8	-7,50
Extrakt + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	83,66 ± 8,8	-25,51
Extrakt + 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	73,95 ± 3,1	-35,22
Extrakt + 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	149,68 ± 8,1	40,50
<i>Hrud'</i>		
Extrakt	249,025 ± 31,7	
Extrakt + 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	258,37 ± 47,8	9,35
Extrakt + 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	224,95 ± 54,1	-24,08
Extrakt + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	235,66 ± 32,2	-13,37
Extrakt + 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	151,57 ± 12,5	-97,46
Extrakt + 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	349,87 ± 7,2	100,85
<i>Zadeček</i>		
Extrakt	139,60 ± 4,7	
Extrakt + 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	130,10 ± 7,1	-9,49
Extrakt + 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	155,29 ± 4,9	15,70
Extrakt + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	147,47 ± 8,0	7,87
Extrakt + 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	94,13 ± 1,6	-45,47
Extrakt + 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	166,54 ± 4,9	26,94

Tab. 8 Výsledky stanovení S-nitrosothiolů v tělních částech včely medonosné chemiluminiscenční metodou (n=3).

<i>Hlava</i>	Koncentrace SNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Vypočítaná koncentrace přidaného GSNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
Extrakt	0	
Extrakt + 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	2,73 \pm 0,0	2,73
Extrakt + 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	4,62 \pm 0,1	4,62
Extrakt + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	6,75 \pm 0,0	6,75
Extrakt + 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	24,18 \pm 0,1	24,18
Extrakt + 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	54,76 \pm 0,6	54,76
<i>Hrud'</i>		
Extrakt	0	
Extrakt + 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	2,82 \pm 0,0	2,82
Extrakt + 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	4,97 \pm 0,0	4,97
Extrakt + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	8,20 \pm 0,1	8,20
Extrakt + 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	24,41 \pm 0,5	24,41
Extrakt + 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	54,80 \pm 0,2	54,80
<i>Zadeček</i>		
Extrakt	0	
Extrakt + 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	2,70 \pm 0,0	2,70
Extrakt + 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	4,48 \pm 0,3	4,48
Extrakt + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	7,63 \pm 1,6	7,63
Extrakt + 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	22,60 \pm 1,0	22,60
Extrakt + 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	54,26 \pm 6,2	54,26

Tab. 9 Výsledky stanovení S-nitrosothiolů v tělních částech včely medonosné fluorimetrickou metodou (n=3).

<i>Hlava</i>	Koncentrace SNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Vypočítaná koncentrace přidaného GSNO [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
Extrakt	76,00 \pm 2,1	
Extrakt + 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	61,80 \pm 5,8	-14,20
Extrakt + 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	68,65 \pm 3,4	-7,36
Extrakt + 2,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	52,14 \pm 0,6	-23,87
Extrakt + 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	73,83 \pm 7,0	-2,17
Extrakt + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	108,83 \pm 2,9	32,83
<i>Hrud'</i>		
Extrakt	74,04 \pm 9,2	
Extrakt + 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	63,66 \pm 2,9	-10,38
Extrakt + 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	79,80 \pm 9,0	5,76
Extrakt + 2,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	54,51 \pm 8,9	-19,53
Extrakt + 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	90,43 \pm 11,5	16,39
Extrakt + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	98,13 \pm 3,4	24,09
<i>Zadeček</i>		
Extrakt	109,85 \pm 4,0	
Extrakt + 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	83,75 \pm 6,7	-26,10
Extrakt + 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	87,84 \pm 7,5	-22,00
Extrakt + 2,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	90,43 \pm 3,4	-19,42
Extrakt + 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	91,41 \pm 6,3	-18,43
Extrakt + 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSNO	117,42 \pm 5,1	7,57

4.6 Porovnání použitých metod, výhody a nevýhody

Jednoznačně se nedá posoudit, která z uvedených metod je nejvhodnější. Při výběru metody je především nutné brát v potaz, že hladiny SNO jsou obecně *in vivo* velmi nízké. Důležité parametry jednotlivých metod jsou shrnuty v Tab. 10.

Savillova metoda je levná, rychlá a málo pracná, ale její velkou nevýhodou je značné množství interferentů, které ruší spektrofotometrické stanovení. Mezi tyto interferenty patří již dříve zmíněné dusitany, thioly, ionty kovů nebo kyselina askorbová. Navíc je její detekční limit ($0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$) často blízký biologickým koncentracím (Giustarini *et al.*, 2007). Fluorimetrická metoda je opět levná a poměrně rychlá, interferenty jsou stejné jako u metody Savillovy, ale její detekční limit je nižší (asi $0,14 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Velkou výhodou chemiluminiscenční metody je její nízký limit detekce ($0,06 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Tohoto limitu se však v experimentu nepodařilo dosáhnout, pravděpodobně kvůli zvolenému rozsahu měření. Tato metoda je však z hlediska přístrojů finančně nejnáročnější. Její nevýhodou je také časová náročnost a pracnost. Kromě preanalytické úpravy vzorku musí být také kladen důraz na správnou manipulaci se vzorkem. Jednou z podmínek jsou nízké teploty ($2-4 \text{ }^\circ\text{C}$) a omezení práce na přímém světle, jelikož by mohlo dojít k rozkladu SNO (Giustarini *et al.*, 2007).

Jelikož hladiny SNO ve zkoumaných extraktech jsou pravděpodobně nízké, může být problém například v malém objemu nastříkovaného vzorku u chemiluminiscenční metody. Vyzkoušet by se také mohly jiné reakční směsi a jejich častější výměna během měření. Problém také mohl nastat již při samotné přípravě extraktu. V rámci dalšího zkoumání by se například mohla vyzkoušet jiná extrakční činidla nebo lepší způsoby homogenizace biologického materiálu. Co se týče odstranění interferujících látek před začátkem měření, je třeba brát v potaz, že každý zásah do původního prostředí buňky může negativně ovlivnit pozdější výsledky.

Tab. 10 Porovnání použitých metod z hlediska stanovení S-nitrosothiolů v biologickém materiálu.

Metoda	Savillova	Fluorimetrická	Chemiluminiscenční
Rychlost	+ rychlá	– pomalá	– pomalá
Pracnost	+ málo pracná	+ málo pracná	– pracná
Cena přístrojů	+ levná	+ levná	– drahá
Další (ne)výhody	+ vizuální kontrola	– 1 hod. inkubace	+ nízký limit detekce
	– množství interferentů	– velká spotřeba vzorku	+ malá spotřeba vzorku

5 Závěr

V teoretické části byla zpracována literární rešerše shrnující nejdůležitější poznatky týkající se S-nitrosothiolů, především jejich biosyntézy, odbourávání, chemických vlastností a biologických funkcí. Dále bylo také poukázáno na jejich klíčovou roli v rámci signálních drah oxidu dusnatého. V teoretické části byl zpracován přehled použitých metod analýzy S-nitrosothiolů.

V experimentální části bylo zavedeno stanovení S-nitrosothiolů metodou chemiluminiscenční detekce. Dále byly testovány tři metody analýzy S-nitrosothiolů (spektrofotometrická, fluorimetrická a chemiluminiscenční) jak na standardu S-nitrosoglutathionu, tak na rostlinných a hmyzích vzorcích. Tyto metody byly poté porovnány a byly zhodnoceny jejich výhody a nevýhody.

Z uvedených experimentálních výsledků vyplývá, že výběr vhodné analytické metody je při analýze S-nitrosothiolů klíčový, neméně důležitá je však i preanalytická úprava vzorku, která je pro danou metodu charakteristická a mnohdy velmi komplikovaná. Problematika stanovení S-nitrosothiolů v biologickém materiálu byla v posledních letech obohacena o spoustu nových poznatků a nových experimentálních metod. I nadále se však jedná o náročnou analytickou výzvu a v této oblasti je zapotřebí dalšího zkoumání.

Seznam citované literatury

- Adámková Š., Petřivalský M. (2012): Interactions between Metabolism and Signal Functions of Polyamines and Nitric Oxide in Plants. *Chemické Listy* **106**, 166-173.
- Airaki M., Sanchez-Moreno L., Leterrier M., Barroso J.B., Palma J.M., Corpas F.J. (2011): Detection and Quantification of S-Nitrosoglutathione (GSNO) in Pepper (*Capsicum annuum* L.) Plant Organs by LC-ES/MS. *Plant and Cell Physiology* **52**, 2006-2015.
- Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357**, 593-615.
- Arnelle D.R., Stamler J.S. (1995): NO⁺, NO⁻, and NO• donation by S-nitrosothiols: Implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **318**, 279-285.
- Ballatori N., Krance S.M., Marchan R., Hammond C.L. (2009): Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Molecular Aspects of Medicine* **30**, 13-28.
- Basu S., Wang X.D., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B. (2008): Chemiluminescent detection of S-nitrosated proteins: Comparison of tri-iodide, copper/CO/cysteine, and modified copper/cysteine methods. *Nitric Oxide* **440**, 137-156.
- Becker K., Gui M., Schirmer R.H. (1995): Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione. *European Journal of Biochemistry* **234**, 472-478.
- Belenghi B., Romero-Puertas M.C., Vercammen D., Brackener A., Inze D., Delledonne M., Van Breusegem F. (2007): Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 1352-1358.
- Benhar M., Forrester M.T., Stamler J.S. (2009): Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 721-732.
- Bramanti E., Angeli V., Paolichci A., Pompella A. (2010): The determination of S-nitrosothiols in biological samples—Procedures, problems and precautions. *Life Sciences* **88**, 126-129.
- Broniowska K., Diers A.R., Hogg N. (2013): S-Nitrosoglutathione. *Biochimica et Biophysica Acta* **1830**, 3173-3181.
- Brune B. (2003): Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death and Differentiation* **10**, 864-869.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocana A.M. (2011): Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1803-1813.
- Clancy R., Levartovsky D., Leszczynska-Piziak J., Yegudin J., Abramson S. (1994): Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**, 3680-3684.
- Cook J.A., Kim S.Y., Teague D. (1996): Convenient Colorimetric and Fluorometric Assays for S-Nitrosothiols. *Analytical Biochemistry* **238**, 150-158.
- Corpas F.J., Chaki M., Fernandez-Ocana A., Valderrama R., Palma J.M., Carreras A., Begara-Morales J.C., Airaki M., del Rio L.A., Barroso J.B. (2008): Metabolism of reactive nitrogen species in pea plant under abiotic stress condition. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1711-1722.
- Correa-Aragunde N., Foresi N., Delledonne M., Lamattina L. (2013): Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3339-3349.
- De Groote M., Testerman T., Xu Y., Staujer G., Fang F. (1996): Homocysteine antagonism of nitric oxide-related cytostasis in *Salmonella typhimurium*. *Science* **272**, 414-417.
- del Río L.A. (2015): ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2827-2837.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.

- Dietz K.J. (2011): Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants and Redox Signaling* **15**, 1129-1159.
- Domingos P., Prado A.M., Wong A., Gehring C., Feijo J.A. (2015): Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. *Molecular Plant* **8**, 506-520.
- Dong X. (2004): NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 547-552.
- Feelisch M., Rassaf T., Mnaimneh S., Singh N., Bryan N.S., Jourdain D., Kelm M. (2002): Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *The FASEB Journal* **16**, 1775-1785.
- Foster M.W., Liu L.M., Zeng M., Hess D. T., Stamler J.S. (2009): Genetic analysis of nitrosative stress. *Biochemistry* **48**, 792-799.
- Foyer C.H., Noctor G. (2005): Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* **17**, 1866-1875.
- Fujii J.M., Asahi M., Takao T., Shimonishi Y., Taniguchi N. (1997): NO-dependent oxidation of Seleno-cysteine in the active center of glutathione peroxidase is responsible for its inactivation. *The Japanese Journal of Pharmacology* **75**, 13-20.
- Gaston B., Reilly J., Drazen J.M., Fackler J., Ramden P., Arnette D., Mullins M.E., Sugarbaker D., Chee C., Singel D., Loscalzo J., Stamler J.S. (1993): Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**, 10957-10961.
- Gaston B., Sears S., Woods J., Hunt J., Ponaman M., McMahon T., Stamler J. (1998): Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. *The Lancet* **351**, 1317-1319.
- Gaston B.M (1999): Nitric oxide and thiol groups. *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**, 323-333.
- Gaston B.M., Carver J., Doctor A., Palmer L.A. (2003): S-nitrosylation signaling in cell biology. *Molecular interventions* **3**, 253-263.
- Gaupels F., Kuruthukulangarakoola G.T., Durner J. (2011): Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 707-714.
- Giustarini D., Milzani A., Dalle-Donne I., Rossi, R. (2007): Detection of S-nitrosothiols in biological fluids: A comparison among the most widely applied methodologies. *Journal of Chromatography B* **851**, 124-139.
- Goldstein S., Merenyi G. (2008): The chemistry of peroxyxynitrite: implications for biological activity. *Methods in Enzymology* **436**, 49-61.
- Gow A.J., Buerk D., Ischiropoulos H. (1997): A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 2841-2845.
- Gow A.J., Stamler, J.S. (1998): Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* **391**, 169-173.
- Gow A.J., Farkouh C.R., Munson D.A., Posencheg M.A., Ischiropoulos H. (2004): Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**, 262-268.
- Haendeler J., Hoffmann J., Tischler V., Berk B.C., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2002): Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nature Cell Biology* **4**, 743-749.
- Han J.H., Stamler J.S., Li H.L., Griffith O. (1996): Inhibition of γ -glutamylcysteine synthetase by S-nitrosylation. *Biology of Nitric Oxide* **10**, 114-122.
- Hausladen A., Privalle C.T., Keng T., DeAngelo J., Stamler J.S. (1996): Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* **86**, 719-729.
- Heinrich T.A., da Silva R.S., Miranda K.M., Switzer C.H., Wink D.A., Fukuto J.M. (2013): Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *British Journal of Pharmacology* **169**, 1417-1429.
- Hogg N. (1999): The kinetics of S-transnitrosation-a reversible second-order reaction. *Analytical Biochemistry* **272**, 257-262.
- Hogg N. (2002): The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **42**, 585-600.

- Jahnová J., Tichá T., Kubienová L., Luhová L., Petřivalský M. (2013): Biological functions and importance of protein S-nitrosation. *Chemická listy* **107**, 350-355.
- Jensen D., Belka G., Du Bois G. (1998): S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemical Journal* **331**, 659-668.
- Kavya R., Saluja, R., Singh, S., Dikshit, M. (2006): Nitric oxide synthase regulation and diversity: Implication in Parkinson's disease. *Nitric Oxide* **15**, 280-294.
- Kneeshaw S., Gelineau S., Tada Y., Loake G.J., Spoel S.H. (2014): Selective protein denitrosylase activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Molecular Cell* **56**, 153-162.
- Kovacs I., Lindermayr C. (2013): Nitric oxide-based protein modification: formation and site specificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science* **4**, 137-140.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tache R., Luhová L., Barroso J.B., Petřivalský M. (2013): Structural and functional characterization of plant S-nitrosoglutathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochemie* **95**, 889-902.
- Kumar D. (2014): Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science* **228**, 127-134.
- Lancaster J.R. Jr. (2008): Protein cysteine thiol nitrosation: Maker or maker of reactive nitrogen species-induced nonerythroid cellular signaling. *Nitric Oxide* **19**, 68-72.
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J. (2005): Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* **137**, 921-930.
- Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., Durner J. (2006): Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 4285-4291.
- Lipton A.J., Johnson M.A., Macdonald T., Lieberman M.W., Gozal D., Gaston B. (2001): S-nitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia. *Nature* **413**, 171-174.
- Malik S.I., Hussain A., Yun B.W., Spoel S.H., Loake G.J. (2011): GSNOR-mediated denitrosylation in the plant defence response. *Plant Science* **181**, 540-544.
- Marley R., Feelisch M., Holt S., Moore K. (2000): A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radical Research* **32**, 1-9.
- Martinez-Ruiz A., Lamas S. (2004): S-nitrosylation: a new potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovascular Research* **62**, 43-52.
- Martinez-Ruiz A., Lamas S. (2007): Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovascular Research* **75**, 220-228.
- Marzinzig M., Nussler A.K., Stadler J., Marzinzig E., Barthlen W., Nussler N.C., Beger H.G., Morris S.M., Bruckner U.B. (1997): Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: Nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols. *Nitric Oxide* **1**, 177-189.
- Matsumoto A., Gow A.J. (2011): Membrane transfer of S-nitrosothiols. *Nitric Oxide* **25**, 102-107.
- Mioto P.T., Rodriguez-Ruiz M., Mot A.C., Zuccarelli R., Corpas J.F., Freschi L., Mercier H. (2017): Alternative fluorimetric-based method to detect and compare total S-nitrosothiols in plants. *Nitric Oxide* **68**, 7-13.
- Mitchell D.A., Marletta M.A. (2005): Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nature Chemical Biology* **1**, 154-158.
- Miranda M.K., Espey M.G., Wink D.A. (2001): Rapid, Simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* **5**, 62-71.
- Moore K.P., Mani A.R. (2002): Measurement of protein nitration and S-nitrosothiol formation in biology and medicine. *Methods in Enzymology* **359**, 256-268.
- Moricová P., Luhová L., Lochman J., Kašparovský T., Petřivalský M. (2014): Elicitins: Key Molecules in Plant-Pathogen Interactions. *Chemická Listy* **108**, 1133-1139.
- Mur L.A., Mandon J., Persijn S., Cristescu S.M., Moshkov I.E., Novikova G.V., Hall M.A., Harren F.J.M., Hebelstrup K.H., Gupta K.J. (2013): Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants* **5**, 52-56.
- Naseem K.M., Chirico S., Mohammadi B., Bruckdorfer K.R. (1996): The synergism of hydrogen peroxide with plasma S-nitrosothiols in the inhibition of platelet activation. *Biochemical Journal* **318**, 759-766.

- Nussler A.K., Billiar T.R. (1993): Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Leukocyte Biology* **54**, 171-178.
- Pagliari P. (2003): Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sciences* **73**, 2137-2149.
- Parisy V., Poinssot B., Owsianowski L., Buchala A., Glazebrook J., Mauch F. (2007): Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **49**, 159-172.
- Park J.W. (1996): Attenuation of p47phox membrane translocation as the inhibitory mechanism of S-nitrosothiol on the respiratory burst oxidase in human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **220**, 31-35.
- Peng H.B., Libby P., Liao J.K. (1995): Induction and stabilization of IUBK by nitric oxide mediates inhibition of NF- κ B. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 14214-14219.
- Piterková J., Hofman J., Mieslerová B., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A., Petřivalský M. (2011): Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp.-*Oidium neolycopersici* interactions. *Environmental and Experimental Botany* **74**, 37-44.
- Rafikova O., Rafikov R., Nudler E. (2002): Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 5913-5918.
- Reumann S., Babujee L., Ma C., Wienkoop S., Siemsen T., Antonicelli G.E., Rasche N., Lüder F., Weckwerth W., Jahn O. (2007): Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *The Plant Cell* **19**, 3170-3193.
- Romero-Puertas M.C., Delledonne M. (2007): S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Free Radical Research* **41**, 12.
- Roy B., Lepoivre M., Henry Y., Fontecave M. (1995): Inhibition of ribonucleotide reductase by nitric oxide derived from thionitrites: reversible modifications of both subunits. *Biochemistry* **34**, 5411-5418.
- Sakamoto A., Tsukamoto S., Yamamoto H., Ueda-Hashimoto M., Takahashi M., Suzuki H., Morikawa H. (2003): Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species. *Plant Journal* **33**, 841-851.
- Samouilov A., Zweier J.L. (1998): Development of chemiluminescence-based methods for specific quantitation of nitrosylated thiols. *Analytical Biochemistry* **258**, 322-330.
- Saville B. (1958): A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* **83**, 670-672.
- Schmidt H.H., Hofmann H., Schindler U., Shutenko Z.S., Cunningham D.D., Feelisch M. (1996): No NO from NO synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **25**, 14492-14497.
- Sengupta R., Ryter S.W., Zuckerbraun B.S., Tzeng E., Billiar T.R., Stoyanovsky D.A. (2007): Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols. *Biochemistry* **46**, 8472-8483.
- Sengupta R., Holmgren A. (2012): The role of thioredoxin in the regulation of cellular processes by S-nitrosylation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1820**, 689-700.
- Sengupta R., Holmgren A. (2013): Thioredoxin and thioredoxin reductase in relation to reversible S-nitrosylation. *Antioxidants and Redox Signaling* **18**, 259-269.
- Shahani N., Sawa A. (2011): Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for S-nitrosylation. *Antioxidants and Redox Signaling* **14**, 1493-1504.
- Simon D.I., Mullins M.E., Jia L., Gaston B., Singel D.J., Stamler J.S. (1996): Polynitrosylated proteins: characterization, bioactivity, and functional consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 4736-4741.
- Singh R.J., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B. (1996): Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 18596-18603.
- Slaymaker D.H., Navarre D.A., Clark D., del Pozo O., Martin G.B., Klessig D.F. (2002): 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 11640-11645.

- Sliskovic I., Raturi A., Mutus B. (2005): Characterization of the S-denitrosation activity of protein disulfide isomerase. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 8733-8741.
- 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. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3950-3960.
- Stamler J.S., Jaraki O., Osborne J. (1992): Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**, 7674-7677.
- Stamler J.S. (1994): Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* **78**, 931-936.
- Stamler J.S., Lamas S., Fang F.C. (2001): Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**, 675-683.
- Stamler J.S., Toone E.J. (2002): The decomposition of thionitrites. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**, 779-785.
- Šírová J., Sedlářová M., Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2011): The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Science* **181**, 560-572.
- Swift H.R., Williams D.L.H. (1997): Decomposition of S-nitrosothiols by mercury (II) and silver salts. *Journal of the Chemical Society* **10**, 1933-1935.
- Wendehenne D., Durner J., Klessig D.F. (2004): Nitric oxide signalling and plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 449-455.
- Tada Y. (2009): Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **325**, 1072.
- Tichá T., Luhová L., Petřivalský M. (2016): Functions and Metabolism of S-Nitrosothiols and S-Nitrosylation of Proteins in Plants: The Role of GSNOR. *Gasotransmitters in Plants*, 175-200.
- Tsikas D. (2005): Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radical Research* **39**, 797-815.
- Tsikas D., Bohmer A., Mitschke A., Araujo P. (2013): Accurate measurement of nitrate, nitrite, and S-nitrosothiols in biological samples by mass spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine* **65**, 301-304.
- Tuteja N., Chandra M., Tuteja R., Misra M.K. (2004): Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **4**, 227-237.
- Williams D.L.H. (1996): S-nitrosothiols and role of metal ions in decomposition to nitric oxide. *Methods in Enzymology* **268**, 299-308.
- Yamasaki H., Sakihama Y. (2000): Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* **468**, 89-92.
- Yu M., Lamattina L., Spoel S.H., Loake G.J. (2014): Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist* **202**, 1142-1156.
- Zaman K., Palmer L.A., Doctor A., Hunt J.F., Gaston B. (2004): Concentration dependent effects of endogenous S-nitrosoglutathione on gene regulation by specificity proteins Sp3 and Sp1. *Biochemical Journal* **380**, 67-74.
- Zhang Y., Hogg N. (2004): The mechanism of transmembrane S-nitrosothiol transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **101**, 7891-7896.
- Zhang Y., Hogg N. (2005): S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radical Biology and Medicine* **38**, 831-838.

Seznam použitých zkratk

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonová kyselina
AtMC9	Prometakaspa 9 z <i>A. thaliana</i>
CFTR	Transmembránový regulátor vodivosti iontů u cystické fibrózy
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
CysNO	S-nitrosocystein
DAN	2,3-diaminonaftalen
γ GT	γ -glutamyltranspeptidasa
GSH	Glutathion
GSONH ₂	Glutathionsulfinamid
GSSG	Glutathiondisulfid
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
MAT1	Methioninadenosyltransferasa 1
MS	Hmotnostní spektrometrie
NAT	2,3-naftotriazol
NED	N-(1-naftyl)-ethylendiamin
NO ⁻	Nitroxylový anion
NO ⁺	Nitrosoniový kation
NOS	NO-synthasa
O ₂ ⁻	Superoxidový anionradikál
ONOO ⁻	Peroxyinitrit
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SA	Kyselina salicylová
SABP3	Vázající protein 3 u kyseliny salicylové
sGC	Rozpustná guanylátcyklasa
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicilamin
SNO	S-nitrosothiol
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktasa