

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium vlastností a funkce

S-nitrosoglutathionreduktasy u *Solanum spp.*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Petra Šařecová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Marek Petřivalský Dr.
Termín odevzdání práce:	26. 4. 2011

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

V Olomouci dne

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Mgr. Marku Petřivalskému Dr. za odborné vedení, cenné připomínky, rady a předané zkušenosti při tvorbě této práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu katedry biochemie za umožnění vypracování této práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Petra Šařecová
Název práce	Studium vlastností a funkce S-nitrosoglutathionreduktasy u <i>Solanum spp.</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Marek Petřivalský Dr.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	<p>Oxid dusnatý je endogenně produkováný radikál, který vykonává signální funkci u všech vyšších organismů. S-nitrosylace, která vzniká kovalentním vazbou NO na cysteinová rezidua, je klíčovou posttranslační modifikací u živočichů a i u rostlin, kde může mít velmi důležité signální a regulační funkce. Tato práce shrnuje poznatky o S-nitrosothiolech zejména S-nitrosoglutathionu a také enzymu S-nitrosoglutathionreduktase (GSNOR). GSNOR je důležitý pro detoxifikaci formaldehydu a také reguluje hladinu S-nitrosothiolů v rostlinách. V experimentální části byla provedena purifikace rekombinantního enzymu GSNOR ze <i>Solanum lycopersicon</i> cv. <i>Amateur</i> exprimovaného v <i>E.coli</i> a detekce GSNOR aktivity na polyakrylamidovém gelu. Tato práce popisuje stanovení aktivity GSNOR v kořenech a hypokotylech rajčete jedlého a hrachu setého, stanovení aktivity GSNOR v mitochondriích a chloroplastech. Na závěr, práce obsahuje stanovení změny aktivity GSNOR u tří genotypů rajčete vlivem infekce patogenem.</p>
Klíčová slova	Abiotický stres, biotický stres, hrách (<i>Pisum sativum</i>), oxid dusnatý, rajče (<i>Solanum lycopersicon</i>), S-nitrosylace, S-nitrosoglutathionreduktasa.
Počet stran	75
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Petra Šařecová
Title	Study of features and function of S-nitrosogluthione reductase in <i>Solanum spp.</i>
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Marek Petřivalský Dr.
The year of presentation	2011
Abstrakt	Nitric oxide is a short-live, endogenously produced radical that acts as a signaling molecule in all higher organism. S- nitrosylation, the covalent attachment of nitric oxide to a cysteine thiol, is now established as a key post-translational modification in animals and now is suggests that this modification may also have a central fuction in plant biology. This work summarizes the knowledge about S-nitrosothiols, especially S-nitrosogluthion GSNO and also describes enzyme S-nitrosogluthione reductase (GSNOR). This enzyme is important in the detoxification of formaldehyde and also controlling GSNO and S-nitrosothiol levels in plants. In experimental part of this work has included purification of recombinant GSNOR from <i>Solanum lycopersicon cv. Amateur</i> expressed in <i>E. coli</i> and detection of GSNOR acticity on polyacrylamid gel. This work also describes determination of GSNOR activity of roots and hypocotyls of <i>Solanum lycopersicon</i> and <i>Pisum sativum</i> , determination of GSNOR activity in mitochondrions and chloroplasts. In conclusion, this work has included determination of change of GSNOR activity in three genotypes of <i>Solanum</i> by infection pathogen.
Keywords	Abiotic stress, biotic stress, nitric oxide, pea (<i>Pisum sativum</i>), S-nitrosylation, S-nitrosogluthione reductase, tomato (<i>Solanum lycopersicon</i>).
Number of pages	75
Number of appendices	-
Language	Czech

OBSAH

Cíle práce	9
1. Teoretická část	10
1.1. Oxid dusnatý	11
1.2. S-nitrosylace proteinů	12
1.3. S-nitrosothioly	13
1.3.1. Syntéza SNOs	14
1.3.2. Biologické reakce SNOs	15
1.3.2.1. Uvolnění NO	15
1.3.2.2. Transnitrosační reakce	16
1.3.2.3. S-thiolace	16
1.3.3. Regulace funkce proteinů S-nitrosylací	16
1.3.4. Katabolismus SNOs	17
1.4. S-nitrosoglutathionreduktasa	18
1.4.1. Charakteristika GSNOR	18
1.4.2. GSNOR v oxidativních drahách	19
1.4.2.1. Metabolismus formaldehydu	19
1.4.2.2. Metabolismus etanolu	20
1.4.2.3. Metabolismus mast. kys. a ω -hydroxymast. kys.	20
1.4.2.4. Metabolismus retinolu	20
1.4.3. Role GSNOR v homeostaze NO	21
1.4.4. Struktura S-nitrosoglutathionreduktasy	22
1.4.5. Substrátová specifita GSNOR	24
1.4.6. Kinetické parametry	25
1.5. Vlastnosti a funkce GSNOR u živočichů	26
1.6. Vlastnosti a funkce rostlinné GSNOR	28
1.6.1. Funkce GSNOR při stresu rostlin	29
2. Experimentální část	32
2.1. Materiál a přístrojové vybavení	33
2.1.1. Chemikálie	33
2.1.2. Přístroje	34
2.1.3. Roztoky	35
2.1.4. Rostlinný materiál	37
2.1.4.1. <i>In vitro</i> sterilní kultivace semenáčků rajčat	38
2.1.4.2. Kultivace rajčat v substrátu	38
2.1.4.3. Výsev hrášku	39

2.2.	Metody	38
2.2.1.	Purifikace rekombinantního proteinu LeGSNOR z <i>E.coli</i>	38
2.2.2.	SDS-PAGE	39
2.2.3.	Nativní elektroforéza	40
2.2.4.	Western blotting	40
2.2.5.	Spektrofotometrické stanovení	41
2.2.5.1.	Stanovení proteinů metodou Bradfordové	41
2.2.5.2.	Stanovení aktivity LeGSNOR	41
2.2.5.3.	Stanovení aktivity GSNOR v extraktech z rostlin	41
2.2.5.4.	Stanovení aktivity GSNOR jako alkoholdehydrogenasy	42
2.2.5.5.	Stanovení glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity GSNOR	42
2.2.6.	Příprava rostlinného extraktu	42
2.2.7.	Izolace mitochondrií z hrachu	42
2.2.8.	Izolace chloroplastů z hrachu	43
2.2.9.	Syntéza S-nitrosoglutathionu	43
2.3.	Výsledky	44
2.3.1.	Purifikace LeGSNOR	
2.3.2.	Detekce GSNOR pomocí SDS-PAGE	
2.3.3.	Stanovení aktivity purifikované LeGSNOR	
2.3.4.	Stanovení alkoholdehydrogenasové aktivity purifikované LeGSNOR	
2.3.5.	Stanovení aktivity glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity purif. LeGSNOR	
2.3.6.	Detekce glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity purif. GSNOR	
2.3.7.	Stanovení GSNOR v extraktech z rostlin	
2.3.7.1.	Vliv světelných podmínek na aktivitu GSNOR u rajčete pěstovaného <i>in vitro</i>	
2.3.7.1.1.	Stanovení aktivity GSNOR v kořenech rajčat	
2.3.7.1.2.	Stanovení aktivity GSNOR v hypokotylech rajčat	
2.3.7.2.	Vliv světelných podmínek na aktivitu GSNOR u hrachu	
2.3.7.2.1.	Stanovení aktivity GSNOR v kořenech hrachu	
2.3.7.2.2.	Stanovení aktivity GSNOR v hypokotylech hrachu	

- 2.3.7.3. Vliv de-etiolace na aktivitu GSNOR v
semenáčcích hrachu
 - 2.3.7.3.1. Stanovení aktivity GSNOR v kořenech hrachu
 - 2.3.7.3.2. Stanovení aktivity GSNOR v hypokotylech hrachu
 - 2.3.7.3.3. Stanovení specifické aktivity GSNOR v kořenech
a hypokotylech hrachu
- 2.3.8. Stanovení aktivity GSNOR v mitochondriích a
chloroplastech hrachu setého
 - 2.3.8.1. Stanovení aktivity GSNOR v mitochondriích
 - 2.3.8.2. Stanovení aktivity GSNOR v chloroplastech a
etioplastech
- 2.3.9. Detekce GSNOR v rostlinných extraktech metodou
Western blottingu
- 2.3.10. Stanovení aktivity GSNOR u jednotlivých genotypů
rajčete
 - 2.3.10.1. Stanovení aktivity GSNOR u rajčete *Solanum
lycopersicum (Amateur)*
 - 2.3.10.2. Stanovení aktivity GSNOR u rajčete *Solanum
habrochaites*
 - 2.3.10.3. Stanovení aktivity GSNOR u rajčete *Solanum
chmielewskii*

2.4. Diskuse

Závěr	66
Literatura	67
Seznam použitých zkratk	74

CÍLE PRÁCE

1. Teoretická část

Vypracování literární rešerše shrnující aktuální poznatky o S-nitrosylaci cysteinů jako posttranslační modifikací ovlivňující strukturu a aktivitu proteinů a enzymů, a klíčové úloze S-nitrosoglutathionreduktasy v regulaci buněčné S-nitrosylace.

2. Experimentální část

Cílem praktické části je charakterizace S-nitrosoglutathionreduktasy v *Solanum spp.* a její úloze v obranných mechanismech při abiotickém a biotickém stresu, studium vlivu světelných podmínek na expresi a aktivitu GSNOR v semenáčcích rajčete a hrachu (*Pisum sativum*).

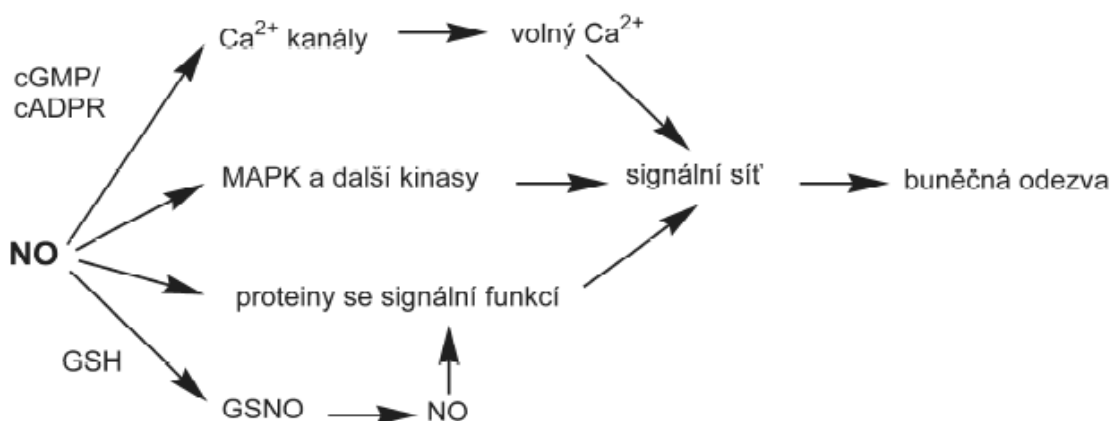
Teoretická část

1.1. Oxid dusnatý

Oxid dusnatý je vnitrobuněčná, klíčová signální molekula, která je spojena s regulací mnoha fyziologických i patologických funkcí u živočichů a rostlin (Moncada et al., 1991). V savčích organismech se účastní procesu vasorelaxace, neurotransmise, cytotoxicity a regulace imunitního systému (Ignarro, 2002). U rostlin reguluje řadu rostlinných fyziologických procesů a obranných reakcí rostlin. Podílí se na klíčení, růstu, kvetení, činnosti průduchů, lignifikaci buněčné stěny, senescenci a buněčné smrti (Lee et al., 2008). Dále je spojena s rostlinnou odpovědí na poranění a různé formy stresu – biotického a abiotického (Gould et al., 2003).

V savčích buňkách je oxid dusnatý produkován činností NO synthas (NOS, EC 1.14.13.39). Tyto enzymy katalyzují reakci, při které je oxidován guanidinový dusík L-argininu a vzniká citrulin a NO. Rozeznáváme tři isoformy NOS a to konstitutivní formy - endoteliární, neuronální a formu inducibilní (Hong et al., 2007). V rostlinných buňkách existence NOS nebyla doposud prokázána (Piterková et al., 2008). Další možností syntézy NO je činností enzymu nitrátreduktasy (NR, EC 1.7.1.1). V některých případech je NO produkován neenzymatickou cestou. V rostlinném apoplastu může být dusitan převeden na NO za kyselého pH (Hong et al., 2007).

Signální reakce NO zahrnují tvorbu sekundárních přenašečů, kterým je cyklický guanosinmonofosfát cGMP a cyklický adenosindifosfát ribosa cADPR, které regulují hladinu cytosolického vápníku. Dále oxid dusnatý umožňuje kovalentní modifikaci proteinů jako je S-nitrosylace cysteinů a nitrace tyrosinu. Stabilní metabolit S-nitrosoglutathion GSNO, vznikající S-nitrosylací, může sloužit jako přenašeč signálu NO (Obr.1) (Parani et al., 2004).



Obr. 1 Znárodnění signálních drah oxidu dusnatého (převzato Piterková et al., 2008).

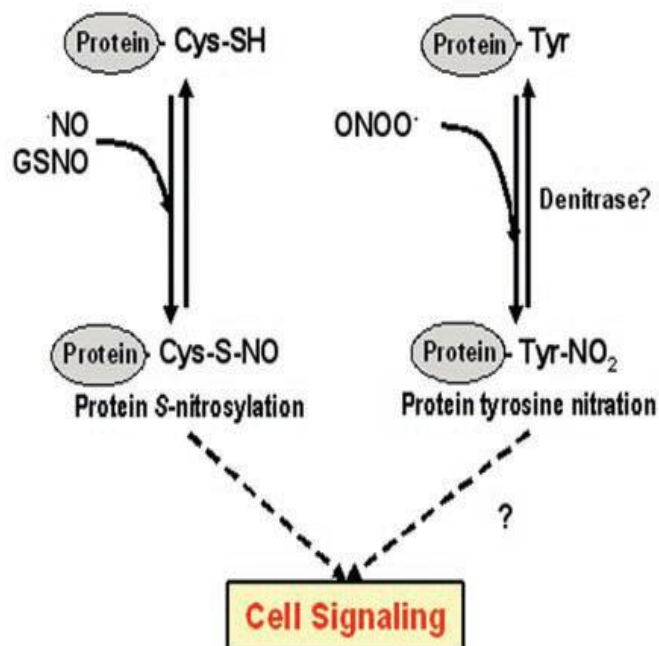
Nitrosativní stres buněk je indukován patofyziologickou hladinou oxidu dusného a S-nitrosothiolů (Foster et al., 2009). Existuje velmi málo informací o tomto typu stresu v rostlinách. Reaktivní dusíkaté radikály RNS je označení pro NO a od něj odvozené molekuly jako např. peroxyinitrit ONOO^- , oxid dusitý N_2O_3 , S-nitrosoglutathion GSNO, dusitan NO_2^- nebo nitrosylový kationt NO^+ (Valderrama et al., 2007). RNS vznikají činností NO, který velmi rychle reaguje s jinými radikály zejména ze skupiny reaktivních forem kyslíku. Z biologického hlediska je nejvýznamnější reakce NO se superoxidovým radikálem za vzniku peroxyinitritu, který je jedním z nejsilnějších oxidačních činidel a způsobuje řadu poškození buněk (Hong et al., 2007).

1.2. S-nitrosylace proteinů

V živočišných buňkách oxid dusnatý a další dusíkaté radikály zprostředkovávají posttranslační modifikace jako je S-nitrosylace proteinů a tyrosinová nitrace. Jsou spojeny s buněčnou signalizací a patologickými procesy (Obr. 2).

V rostlinných buňkách, znalost funkce těchto modifikací za fyziologických nebo stresových podmínek je ještě v počátcích (Corpas et al., 2008).

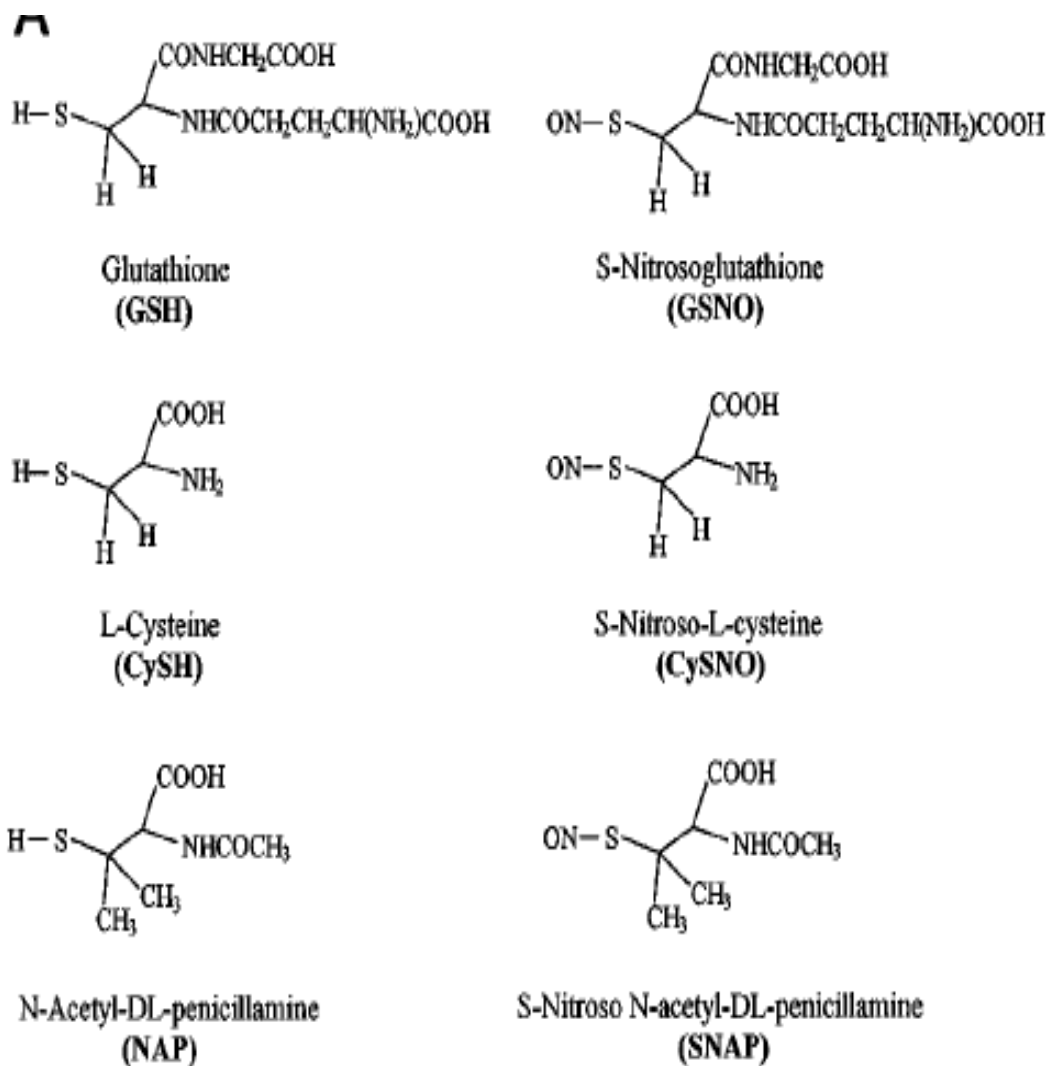
S–nitrosylace proteinů je modelem redoxně založené posttranslační modifikace, která je podkladem pro signální funkci NO během mnoha buněčných odpovědí (Stamler et al., 2001). Základem je navázání NO skupiny na cysteinová rezidua proteinů a peptidů, a tím pozměnění jejich funkce (Corpas et al., 2008). U živočichů je proces S-nitrosylace spojen s určitým počtem patofyziologických situací, které mohou přispívat k nitrosačnímu stresu, u rostlinných buněk existuje o této modifikaci velmi málo informací (Barroso et al., 2006). Proteomickou analýzou byly identifikovány některé proteinové cíle této modifikace (Lindermayr et al., 2005).



Obr. 2 Hypotetický model posttranslačních modifikací proteinů reaktivními formami dusíku (převzato Corpas et al., 2008).

1.3. S-nitrosothioly

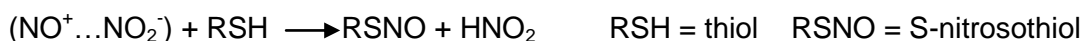
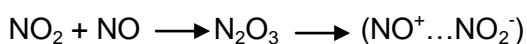
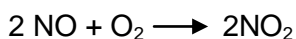
S-nitrosothioly (SNOs) jsou endogenní metabolity oxidu dusnatého se strukturou R-SNO. Obecně lze reakci vzniku SNOs popsat jako elektrofilní ataku atomu síry cysteinu nebo homocysteinu nitrosiem NO^+ , avšak byly prokázány i reakce zahrnující nitroxyl NO^- a radikál $\text{NO}\cdot$. V savčích tkáních se koncentrace S-nitrosothiolů pohybuje od nM až μM úrovně. Syntéza, aktivace a katabolismus SNOs jsou přísně regulovány (Gaston et al., 2003). Nejvýznamnějšími S-nitrosothioly jsou nízkomolekulární S-nitrosoglutathion, S-nitrosocystein, který se vyskytuje pouze jako součást proteinů a také S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamin (Obr. 3). GSNO slouží jako rezervoár a donor oxidu dusnatého (Singh et al., 1996). Mezi nejvýznamnější proteinové S-nitrosothioly u savců patří S-nitrosohemoglobin a S-nitrosoalbumin (Stamler et al., 1992).



Obr. 3 Struktura thiolů a S-nitrosothiolů (převzato Singh et al., 1996).

1.3.1. Syntéza SNOs

V biologických systémech tvorba SNOs vyžaduje přítomnost elektronového akceptoru. Předpokládá se, že akceptorem může být např. kyslík. Reakce poté probíhá v pořadí (Gow et al., 1997):

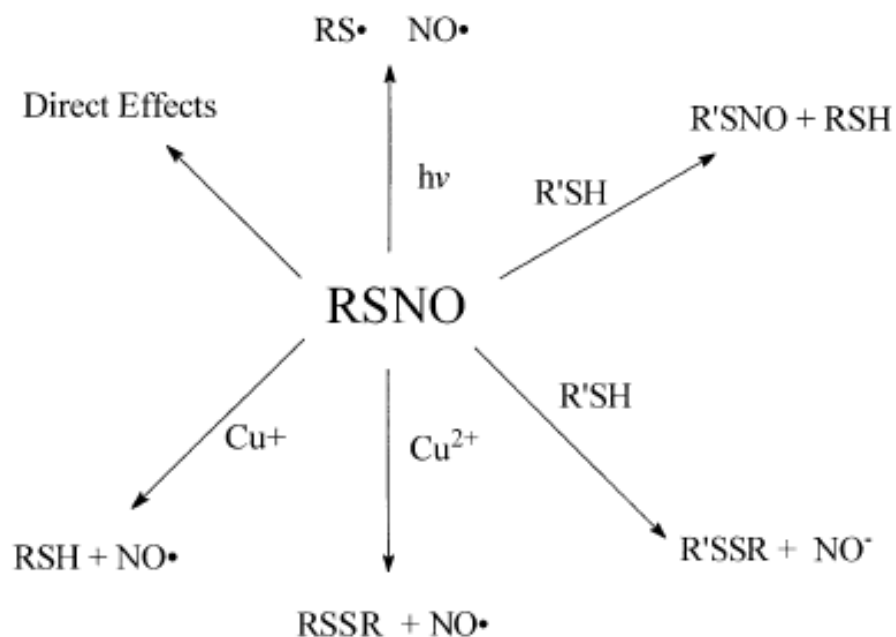


Byly popsány konzervované motivy pro S-nitrosylaci proteinů skládající se z 3 hlavních aminokyselinových uskupení (KRHDE) – (C) – (DE), které předpovídají možnost S-nitrosylace cysteinů v hydrofobních proteinových doménách (Stamler et al., 1997).

Ceruloplasmin je příkladem enzymu, který se podílí na syntéze nízkomolekulárních SNOs obzvláště S-nitrosogluathionu GSNO (Inoue et al., 1999).

1.3.2. Biologické reakce SNOs

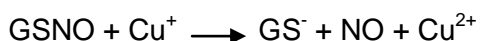
Reakce S-nitrosothiolů zahrnují tři nejdůležitější procesy - uvolnění NO, transnitrosační reakci a S-thiolaci (Obr. 4).



Obr. 4 Reakce S-nitrosothiolů (převzato Hogg, 2000).

1.3.2.1. Uvolnění NO

V přítomnosti iontů kovů mědi a železa je mechanismus uvolnění NO velmi dobře prozkoumán. Pro ionty mědi ho můžeme shrnout do rovnic (Williams, 1996):



Mědnaté ionty mohou přímo a katalycky rozkládat S-nitrosothioly. Tato reakce generuje NO a disulfid thiolu. Avšak atomy mědi nerozkládají GSNO kompletně, GSSG je velmi dobrým chelátorem Cu^{2+} a může inhibovat rozklad GSNO (Singh et al., 1999). Za účasti redukujících činitelů jako thiolů nebo askorbátu, mědnaté ionty mohou být redukovány na mědné ionty, které poté redukují GSNO na thiolový aniont a NO. Tato

reakce je daleko snadnější a důsledkem toho redukující činitelé podstatně urychlují rozklad S-nitrosothiolů (Dicks et al., 1996).

1.3.2.2. Transnitrosační reakce

Transnitrosační reakci můžeme definovat jako přenos NO skupiny z S-nitrosothiolu na další thiol:

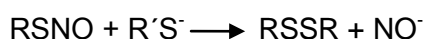


Tato reakce je reverzibilní a produktem je opět thiol a S-nitrosothiol (Hogg, 1999).

Transnitrosace je používána jako cesta přenosu NO ze sloučeniny na sloučeninu uvnitř buněk a reprezentuje potencionální mechanismus modifikace aktivity proteinů. V podstatě S-nitrosylace proteinových thiolů buněčným GSNO může představovat jednu ze složek regulace biologické aktivity proteinů. S-nitrosylace představuje důležitý způsob buněčné signalizace (Mannick et al., 1999).

1.3.2.3. S-thiolace

Tato reakce zahrnuje nukleofilní atak síry na S-nitrosothiolu thiolátovým aniontem. Produktem je disulfid a NO^- :



Proteinová S-thiolace je považována za intracelulární odpověď na oxidativní stres buňky. Nedávno bylo ukázáno, že inkubace enzymů s RSNO vede jak k S-nitrosylaci tak S-thiolaci. Vystavení buněk oxidům dusíku vede k rozsáhlé intracelulární S-thiolaci (Padgett & Whorton, 1998). Jde o stabilnější modifikaci než je S-nitrosylace. Produktem reakce je kromě disulfidů i NO, který nejčastěji reaguje s kyslíkem za tvorby peroxynitritu (Fukuto et al., 1993).

1.3.3. Regulace funkce proteinů S-nitrosylací

Jako proteinové substráty S-nitrosylační reakce byly popsány proteinkinasy, fosfatasy, iontové kanály, metabolické a regulační enzymy, cytoskeletální a strukturní proteiny, transkripční faktory, oxidoreduktasy a respirační proteiny (Hess et al., 2005).

Oxid dusnatý se velmi dobře váže na hemoproteiny, kde s atomy železa tvoří komplexy. Příkladem je savčí guanylátcyklasa (GC, EC 4.6.1.2) jež je klíčovým cílem NO. Oxid dusnatý se váže na hemovou skupinu uvnitř regulační domény a tvoří komplex, který je vyžadován pro aktivaci guanylátcyklasy, která tak generuje cyklický guanosinmonofosfát. Zvýšená hladina cGMP aktivuje cGMP-dependentní proteinkiny, které regulují řadu pochodů buněčné aktivity (Hofmann et al., 2000). Dimethylarginindimethylaminohydrolasa (DDAH, EC 3.5.3.18) se účastní metabolismu argininu a ve své struktuře obsahuje SNO motiv. S-nitrosylaci cysteinu 249 vede k inhibici aktivity DDAH (Leiper et al., 2002). Podobné je to u dalších enzymů metabolismu argininu a to arginylglycinamidinotransferasy (EC 2.1.4.1) a arginindeiminasy (EC 3.5.3.6). Kromě toho ornitindekarboxylasa (EC 4.1.1.17), která katalyzuje přeměnu ornitinu na putrescin je inhibována S-nitrosylací v aktivním místě thiolu (Bauer et al., 2001). Uvolnění vápenatých iontů ze sarkoplasmatického retikula je kontrolováno ryanodinovým receptorem RyR1. NO, který je generován neuronální NOS, se váže prostřednictvím S-nitrosylace na cysteinové reziduum 3635 a dochází tak k aktivaci ryanodinového receptoru (Eu et al., 2000). Methioninadenosyltransferasa (MAT, EC 2.5.1.6) katalyzuje biosyntézu S-adenosylmethioninu, který je substrátem pro tvorbu polyaminů a rostlinného hormonu etylenu. U savců existují dvě isoformy MAT, kde pouze jedna a to MAT1A je regulována S-nitrosylací (Avila et al., 1997). V tomto případě NO negativně reguluje biosyntézu etylenu inhibicí aktivity MAT (Lindermayr et al., 2005). Metakaspasa 9 (EC 3.4.22.-) z *Arabidopsis thaliana* AtMC9 je nitrosylována na cysteinu v aktivním místě *in vivo*. Tato postranslační modifikace potlačuje její proteolytickou aktivitu (Belenghi et al., 2007). Glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (EC 1.2.1.9.) je inhibována S-nitrosylací, stejně jako transkripční faktor AtMYB2. Ten je nitrosylován na cysteinu 53 a tato modifikace inhibuje vazbu faktoru na DNA (Serpa et al., 2007).

1.3.4. Katabolismus SNOs

Současný pohled na biologický rozklad S-nitrosothiolů *in vivo* je odvozen ze znalosti o snadné dekompozici těchto sloučenin *in vitro* vlivem askorbátu, thiolů nebo iontů mědi. Řada enzymů se též podílí na katabolismu S-nitrosothiolů *in vivo*. Jde o thioredoxinový systém, glutathionperoxidasu (EC 1.11.1.12), γ -glutamyltranspeptidasu (EC 2.3.2.2), xantinoxidasu (EC 1.17.3.2) a S-nitrosoglutathionreduktasu (GSNOR), dříve glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH, EC 1.2.1.1.) (Tab. 1) (Liu et al., 2001).

Tab. 1 Enzymové systémy, které katalyzují rozklad GSNO u člověka; ND není určeno (převzato Staab et al., 2008a).

Enzym	Kinetické parametry	Produkt reakce
ADH3	$K_m = 11\mu\text{M}$ $K_{\text{cat}} = 1200 \text{ min}^{-1}$ $K_{\text{cat}}/K_m = 110\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$	GSNHOH je přeměněn: a) GSONH ₂ b) GSSG a NH ₂ OH Reakce je NADH dependentní
Cu/Zn superoxiddismutasa	$K_m = 5,6\mu\text{M}$ $K_{\text{cat}} = 0,3 \text{ min}^{-1}$ $K_{\text{cat}}/K_m = 0,05\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$	GSSG a NO
Gluathionperoxidasa	ND	GSSG a NO
Thioredoxinový systém	$K_m = 60\mu\text{M}$ $K_{\text{cat}} = 36 \text{ min}^{-1}$ $K_{\text{cat}}/K_m = 0,6\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$	GSH, NO a O ₂ Reakce je závislá na kyslíku
Xantinoxidasa	ND	GSH, NO a O ₂

1.4. S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR)

S-nitrosoglutathionreduktasa je též známa jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH) a alkoholdehydrogenasa III (ADH3, EC 1.2.1.1). Jde o klíčový enzym v regulaci hladiny S-nitrosothiolů a také detoxifikaci endogenního a exogenního formaldehydu (Staab et al., 2008a).

1.4.1. Charakteristika GSNOR

GSNOR se vyskytuje v prokaryotických i eukaryotických organismech. Genovým screeningem a srovnáním sekvencí všech členů rodiny alkoholdehydrogenas se ukázalo, že rodina ADH3, do které patří GSNOR, je jejich vývojovým předkem. Univerzální přítomnost a strukturní zachovalost naznačuje, že tyto enzymy vykonávají

esenciální funkci v živých organismech. Podílí se na signalizaci a metabolických drahách (Staab et al., 2008a). GSNOR je také nazývána glutation-dependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH), která katalyzuje NAD^+ - dependentní oxidaci S-hydroxymethylglutathionu na S-formylglutathion. Dlouho bylo navrhováno, že primární funkcí FALDH v biologických systémech je detoxifikace endogenního a exogenního formaldehydu. Avšak nedávné studie poskytly přesvědčivé důkazy, že FALDH je zapojena do metabolismu S-nitrosothiolů jako je S-nitrosoglutathion, který je přírodním rezervoárem NO. Výsledkem charakterizace odpovědného enzymu bylo přiřazení názvu S-nitrosogluathionreduktasy GSNOR (Sakamoto et al., 2002).

1.4.2. GSNOR v oxidativních drahách

1.4.2.1. Metabolismus formaldehydu

U řady organismů se vyvinul účinný systém detoxifikace formaldehydu, který byl nedávno klasifikován jako lidský karcinogen. Formaldehyd vzniká z mnoha exogenních a endogenních zdrojů (Staab et al., 2009). Polarizovaná karbonylová skupina vykazuje vysokou reaktivitu, a proto může atakovat DNA a proteiny za vzniku mutagenních sloučenin např. DNA-DNA, DNA-protein. Reaktivita formaldehydu vůči DNA vede tedy kromě mutagenních účinků i k chromozomálním změnám, které v kombinaci s aktivací proliferace formaldehydem jsou základem jeho karcinogenity. Formaldehyd je uvolňován během intracelulárního metabolismu endogenních látek a také je produktem oxidativní demethylace xenobiotik pomocí cytochrom P450 enzymů. V případě genotoxických a cytotoxických efektů formaldehydu není překvapením, že se vyvinulo několik detoxifikačních systémů. U člověka jsou známy dvě formy enzymu aldehyddehydrogenasy – cytosolická a mitochondriální, které přímo metabolizují formaldehyd. GSNOR (ADH3) je nejvíce efektivním formaldehyd-metabolizujícím enzymem *in vitro* ze všech doposud popsáných enzymů a také pravděpodobně dostatečně účinným za buněčných redoxních podmínek - jako je přítomnost glutationu v mM koncentraci a vysoký poměr NAD^+/NADH (Staab et al., 2008a). GSNOR (ADH3) je hlavním detoxifikačním systémem formaldehydu v jádře a cytosolu (Staab et al., 2009).

1.4.2.2 Metabolismus etanolu

GSNOR (ADH3) vykazuje velmi nízkou aktivitu k etanolu. Lidské enzymy ukazují nehyperbolickou kinetiku etanolu až do koncentrace 3,5M. ADH 3 tedy hraje jen minoritní roli v jaterním alkoholovém metabolismu, protože koncentrace etanolu zřídka přesáhne 50 mM hodnotu (ekvivalentní k 2,3‰ koncentraci v krvi). Hlavní cestou detoxifikace etanolu v játrech je formou ADH1 enzymů. Významné množství etanolu je metabolizováno už v žaludečním lumenu, kde koncentrace etanolu může dosáhnout 1,5 M (Staab et al., 2008a).

1.4.2.3. Metabolismus mastných kyselin a ω -hydroxymastných kyselin

V závislosti na délce uhlíkatého řetězce se v alkalickém pH, mastné kyseliny mohou chovat jako aktivátory oxidace krátkých řetězců alkoholů (Staab et al., 2008a). Optimální délka aktivátoru je kolem 10 uhlíků. Oxidace etanolu je vyšší díky kyselině oktanové nebo oxidace methylokrotylalkoholu je aktivována pentanovou kyselinou (Moulis et al., 1991). Na rozdíl dodekanová kyselina inhibuje ADH3 bez ohledu na substrát. Ze všech ω -hydroxymastných kyselin je nejlepším substrátem pro ADH3 12-hydroxydodekanová kyselina. Aktivita závislá na délce řetězce ukazuje rozměry velkého aktivního místa. Arg114 v aktivním místě enzymu je podstatný pro aktivaci mastnými kyselinami stejně jako pro oxidaci 12-hydroxydodekanové kyseliny a S-hydroxymethylglutathionu. Není jasné, zda aktivace nebo inhibice GSNOR mastnými kyselinami je fyziologicky významná. Aktivace oxidace etanolu zřejmě není dostatečně významná při fyziologickém pH, aby umožnila GSNOR (ADH3) významně přispět k detoxifikaci etanolu. Je možné, že inhibice GSNOR (ADH3) dodekanovou kyselinou hraje roli *in vivo*, protože mastné kyseliny jsou všudypřítomně a ochotně transportovány do buněk (Glatz et al., 1997). Kromě toho cytochrom P450 enzymy a další jsou schopné katalyzovat ω -hydroxylaci mastných kyselin mající za následek endogenní vznik 12-hydroxydodekanové kyseliny a dalších ω -hydroxymastných kyselin (Staab et al., 2008a).

1.4.2.4. Metabolismus retinolu

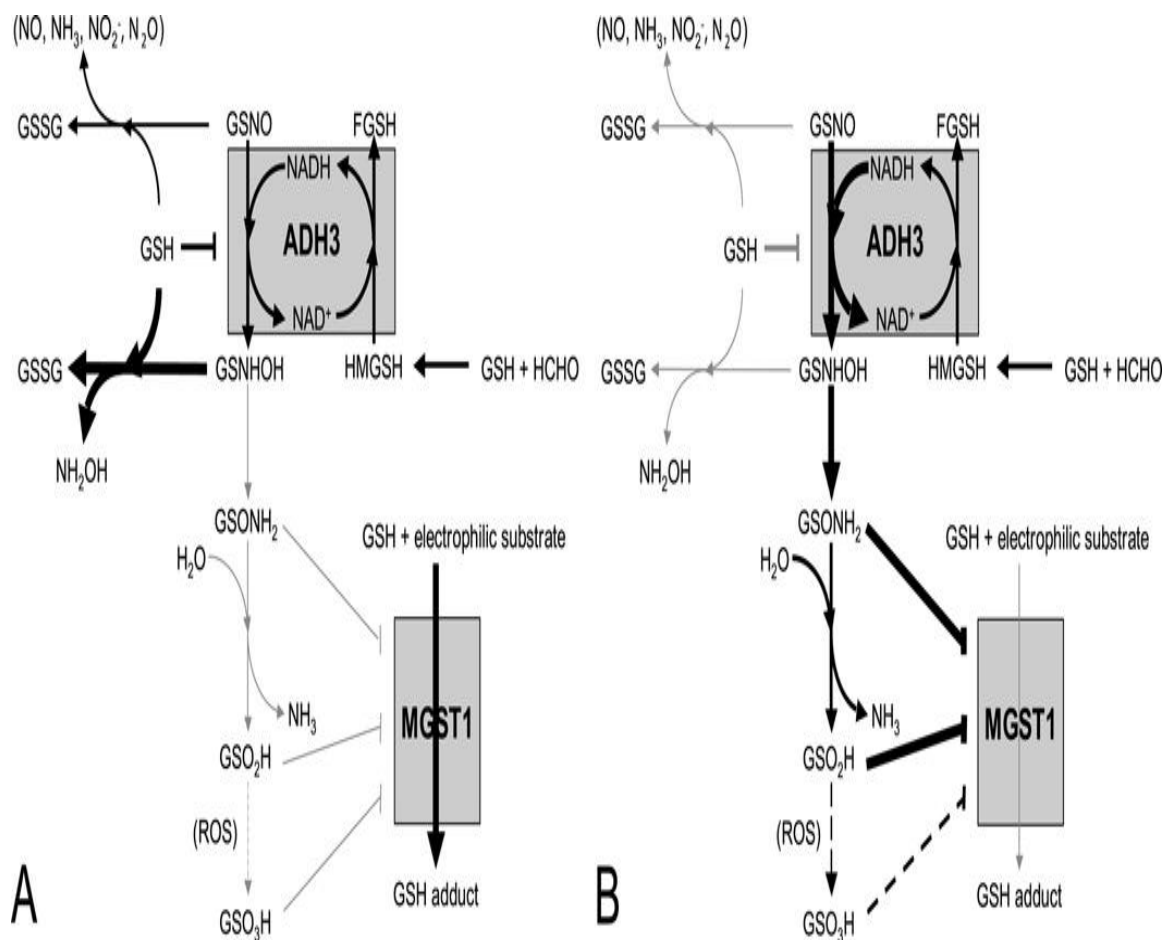
Účast GSNOR (ADH3) na metabolismu byla studována u myší, kde oxidace all-trans-retinolu působením GSNOR *in vitro* je velmi pomalá ve srovnání s ADH1 a

ADH4. Nicméně u Adh3-deficientních myší bylo prokázáno významné snížení koncentrace all-trans retinové kyseliny v séru, což poskytuje důkaz o zapojení GSNOR (ADH3) při syntéze kyseliny retinové *in vivo* (Staab et al., 2008a).

1.4.3. Role GSNOR v homeostáze NO

Jak už bylo zmíněno, signalizace NO je částečně zprostředkována S-nitrosylací. S-nitrosylované proteiny se zdají být v transnitrosační rovnováze s S-nitrosoglutathionem, nejběžnějším nízkomolekulárním S-nitrosothiolem. V přítomnosti NADH je GSNO efektivně a ireverzibilně redukován prostřednictvím GSNOR S-nitrosothioly jsou metabolizovány několika enzymy, jak už bylo popsáno v kapitole o katabolismu SNOs. GSNO jako jediný doposud známý enzym metabolizuje GSNO bez uvolnění NO. Díky vysoké hodnotě k_{cat}/K_m jde o nejefektivnější aktivitu mezi všemi navrhovanými aktivitami za předpokladu, že je příslušný kofaktor NADH přítomen. GSNOR nepřímě řídí koncentraci proteinových S-nitrosothiolů a tímto způsobem může plnit důležitou regulační funkci v signalizaci NO.

GSNOR zprostředkovaná redukce GSNO je pod kontrolou buněčného redoxního potenciálu. GSNO je redukován na meziprodukt, který může být buď přeskupen na odpovídající glutathionsulfonamid ($GSONH_2$) nebo může s další molekulou glutathionu vytvořit glutathiondisulfid (GSSG). Typická buněčná koncentrace GSH v mM rozmezí zpomaluje ADH3 reakci a zamezuje tvorbě sulfonamidu (Staab et al., 2008a). Koncentrace GSH podléhá intracelulárním fluktuacím. Vyčerpání GSH je typické např. při oxidativním stresu a při různých nemocích jako HIV, Parkinsonova choroba a onemocnění jater (Staab et al., 2008b). *In vitro* nízké koncentrace GSH podporují vznik $GSONH_2$, který je spontánně hydrolyzován na odpovídající sulfinovou kyselinu (GSO_2H). Při vysoké intenzitě oxidativního stresu je kyselina sulfinová oxidována na kyselinu glutathionsulfonovou (GSO_3H). $GSONH_2$, GSO_2H a GSO_3H zvyšují možnou inhibici glutathiontransferas, které jsou součástí obranného mechanismu proti xenobiotikům (Obr. 5) (Staab et al., 2008b).



Obr. 5 Modely pro tvorbu produktů činností ADH3 v závislosti na koncentraci GSH; A – koncentrace GSH je dostupná, reakcí se tvoří glutathiondisulfid a hydroxylamin. Nedočází k inhibici mikrosomální glutathion-S-transferasy MGST1; B – koncentrace GSH je vyčerpána, reakcí vzniká glutathionsulfinamid, kys. glutathionsulfonová a glutathionfulfonová. To přispívá k oxidačnímu stresu a inhibici MGST1 (převzato Staab et al., 2008b).

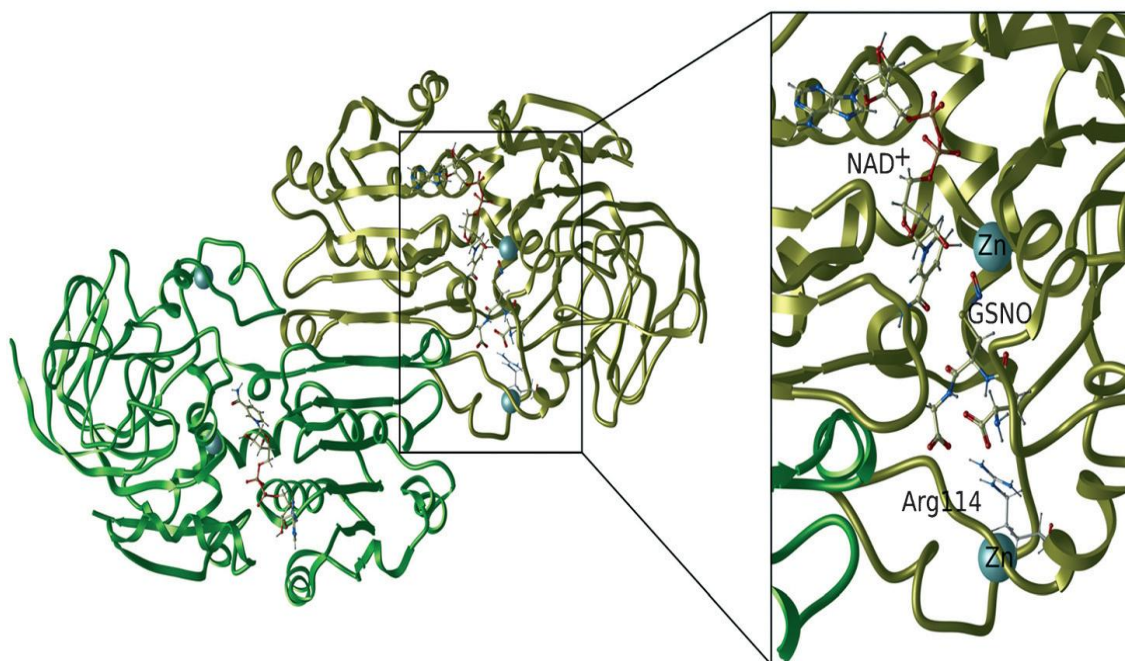
1.4.4. Struktura S-nitrosoglutathionreduktasy

Jako jiné enzymy z rodiny alkoholdehydrogenas, GSNOR má homodimerní strukturu se dvěma zinečnatými ionty na každou 40 kDa podjednotku. Zatímco jeden zinečnatý iont vykonává strukturální funkci, druhý iont funguje jako Lewisova kyselina, která aktivuje substrát v aktivním místě enzymu. Aktivní místo je lokalizováno ve štěrbině mezi katalytickou doménou a vazebnou doménou pro koenzym. GSNOR jako

ADH3 se odlišuje od ostatních etanol oxidujících alkoholdehydrogenas substrátovou specifitou a kinetickými parametry.

Ve vztahu k substrátové specifitě, rezidua 53-59 a 113-120 jsou situována dále od aktivního místa, které se tím podstatně zvětší a vytvoří rozšířený vstup do vazebné domény pro substrát. To je jedním z rozdílů GSNOR (ADH3) oproti klasickým alkoholdehydrogenasam typu I. Aktivní místo je tedy vytvořeno tak, že nemůže být nasyceno etanolem, nýbrž je uzpůsobeno pro vazbu větších substrátů jako je GSNO, hydroxymethylglutathion, středně dlouhé řetězce alkoholů, aldehydy a ω -hydroxymastné kyseliny (Staab et al., 2008a).

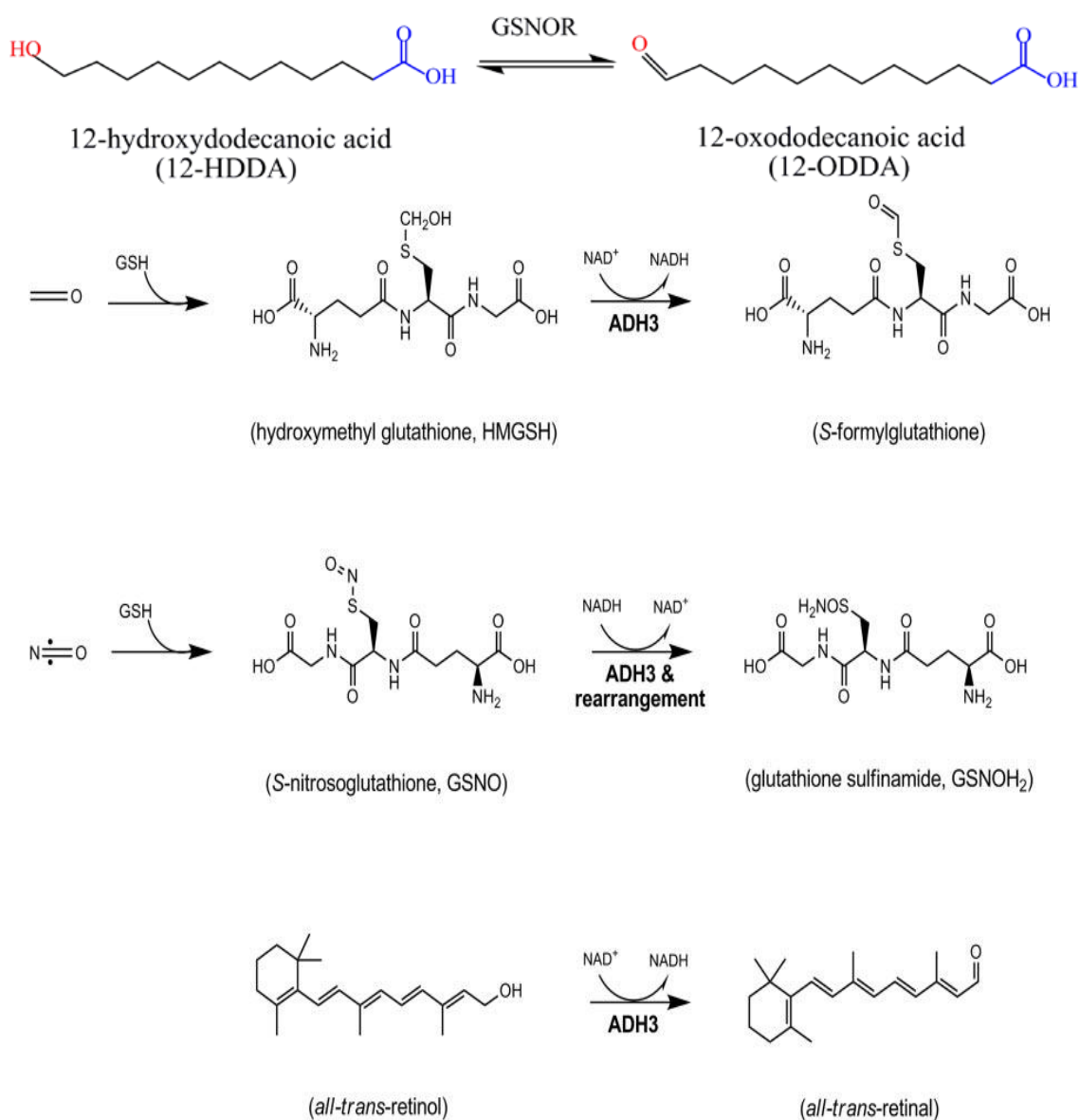
Několik reziduí v aktivním místě hraje důležitou roli. Patří mezi ně Arginin114, který poskytuje pozitivní náboj ve vazebném místě, usnadňuje vazbu a správnou orientaci negativně nabitých substrátů, aktivátorů a inhibitorů. Arginin114, místo zinku a v menší míře i rezidua Thr46, Asp55 a Glu57 jsou důležitá pro schopnost vazby S-hydroxymethylglutathionu a s největší pravděpodobností i GSNO (Obr. 6) (Staab et al., 2008a).



Obr. 6 Dimerní struktura a aktivní místo lidské GSNOR. Dimerní struktura ukazuje oba monomery (žlutý a zelený), atomy zinku jsou znázorněny modře. Vpravo je zobrazeno aktivní místo se zakresleným koenzymem NAD^+ a substrátem GSNO (převzato ze Staab et al., 2008a).

1.4.5. Substátová specifita GSNOR

GSNOR katalyzuje oxidaci středně dlouhých a dlouhých řetězců alkoholů na aldehydy za účasti NAD^+ . Etanol je velmi slabým substrátem. Alkoholy, které mají řetězec delší než 4 uhlíky jsou mnohem efektivněji oxidovány než etanol. Dalším substrátem je spontánní adukt glutationu a formaldehydu S-hydroxymethylglutathion, jehož oxidací je GSNOR zapojena do detoxifikace endogenního a exogenního formaldehydu. Posledním významným substrátem je S-nitrosoglutathion, který je redukován GSNOR za pomoci koenzymu NADH a hraje tedy významnou roli v homeostaze NO (Obr. 7) (Staab et al., 2008a).



Obr. 7 Reakce, které katalyzuje ADH3 (převzato Thomson et al., 2009).

1.4.6. Kinetické parametry

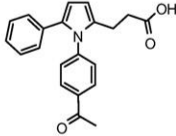
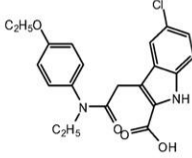
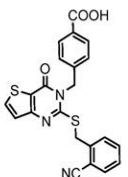
Staab et al., 2008b ve své studii charakterizovali kinetické parametry ADH3. Použili rekombinantní lidskou ADH3 exprimovanou v *E. coli* a substráty GSNO a HMGS (Tab. 2). Hodnota konstanty K_m pro HMGS byla přibližně 100x menší než pro GSNO. Katalytická konstanta byla 10x vyšší pro redukci GSNO avšak katalytická efektivita byla asi 10x vyšší pro HMGS. GSH inhibuje ADH3 redukci GSNO v mM koncentracích a je modelem nekompetitivní inhibice (Staab et al., 2008b).

Tab. 2 Kinetické parametry pro GSNO a HMGS; hodnoty byly měřeny při 340 nm v 0,1 M fosforečnanu draselném pH 7,5, 2,4 mM NAD^+ a 1 mM GSH pro oxidaci HMGS, 0,1mM NADH, koncentrace GSNO 5-60 μM (převzato Staab et al., 2008b).

	HMGS	GSNO
K_m (μM)	0.12 ± 0.02	11.1 ± 2.9
k_{cat} (min^{-1})	150 ± 10	1200 ± 150
k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$)	1300 ± 210	110 ± 30
K_i (GSH) (mM)	n.d.	14.3 ± 1.3

Nedávné studie identifikovaly nové inhibitory GSNOR. Jak již bylo zmíněno, kyselina dodekanová funguje jako inhibitor GSNOR. Další tři sloučeniny vykázaly vysokou afinitu a specifičnost k inhibici GSNOR (Obr. 8) (Sanghani et al., 2009).

Provedené studie určily mechanismus, kterým látky C1-C3 inhibují funkci GSNOR. Jednotlivé látky se ukázaly být nekompetitivními a akompetitivními inhibitory proti různým koncentracím GSNO a NADH. Další pokusy s kyselinou dodekanovou jako inhibitorem GSNOR určily komplex, na který se inhibitor váže. Dodekanová kyselina je nekompetitivním inhibitorem a váže se buď na enzym samotný nebo na komplex enzym-NADH. Sloučeniny C1-C3 jsou také nekompetitivními inhibitory, které se vážou na komplex enzym-NADH nebo na komplex enzym-NAD⁺. Ve zkratce tedy inhibiční studie ukázaly, že látky C1-C3 se vážou do aktivního místa a tvoří komplexy GSNOR-NADH-Inhibitor, GSNOR-NAD⁺-Inhibitor a GSNOR-Inhibitor (Sanghani et al., 2009).

No.	Compound name	Structure	% inhibition		IC ₅₀ at pH 7.5 (μM)
			pH 10	pH 7.5	
	Dodecanoic acid		4	19	212
C1	3-[1-(4-acetylphenyl)-5-phenyl-1H-pyrrol-2-yl]propanoic acid		78	93	1.3
C2	5-chloro-3-{2-[(4-ethoxyphenyl)(ethyl)amino]-2-oxoethyl}-1H-indole-2-carboxylic acid		55	91	2.4
C3	4-{[2-[(2-cyanobenzyl)thio]-4-oxothieno[3,2-d]pyrimidin-3(4H)-yl]methyl}benzoic acid		75	95	1.1

Obr. 8 Struktury účinných inhibitorů GSNOR (převzato Sanghani et al., 2009).

1.5. Vlastnosti a funkce GSNOR u živočichů

GSNOR (ADH3) byla vývojově konzervována od bakterií až po obratlovce a je tedy evolučním předkem rodiny alkoholdehydrogenas. Genová duplikace a mutace v aktivním místě daly vzniknout novým genům, které u členů ADH (EC 1.1.1.1) mohou vyvolat ztrátu schopnosti metabolizovat formaldehyd nebo získat aktivitu vůči krátkým řetězcům alkoholů jako je např. etanol (Engeland et al., 1993). GSNOR (ADH3) je přítomna v hlodavčích tkáních a všech dospělých lidských tkáních jako placenta, mozek plodu, plíce, játra a ledviny. GSNOR (ADH3) se zdá být exprimována jako jediná z členů ADH v lidské a hlodavčí mozkové tkáni. Distribuce uvnitř mozkové tkáně je podobná u hlodavců i lidí a zahrnuje expresi v mozkové kůře, hippokampu, středním mozku a mozečku. V rámci subcelulární distribuce je GSNOR (ADH3) lokalizována v cytoplasmě a jádru několika typů buněk. Nejvyšší exprese je v bazálním epitelu. Hladina mRNA GSNOR je vyšší u proliferujících buněk *in vitro* i *in vivo*. U člověka byly transkripty GSNOR detekovány v plicích, játrech, mozku a ledvině plodu. U myši byly transkripty GSNOR detekovány 13. den po početí a to v mozku, játrech, nadledvinkách a ve spojivkovém, čichovém a střevním epitelu (Edenberg et al., 1995).

Srovnání sekvencí GSNOR (ADH3) a ADH1 mezi myší a člověkem, ukázalo vysoký stupeň ortologie – 93 % a 83 % (Edenberg et al., 1995). Oblast promotoru GSNOR je daleko méně zachována u jednotlivých druhů oproti promotorové oblasti ADH1. Tyto výsledky ukazují, že ačkoliv je funkce GSNOR velmi důležitá, její regulace může být poměrně odlišná u jednotlivých druhů. 5' region lidské GSNOR sdílí malou homologii s dalšími lidskými třídami ADH na rozdíl od dalších členů alkoholdehydrogenas. 5' konec lidské i hlodavčí ADH3 postrádá TATA box a obsahuje mnoho CG párů. Tyto vlastnosti jsou typické pro tzv. housekeeping geny. Lidská ADH3 také obsahuje dvě startovací místa upstream od ORF (open reading frame), což je charakteristické pro geny s regulační funkcí jako jsou růstové faktory, transkripční faktory a geny zahrnuté v signální transdukcii (Thomson et al., 2009). Následující tabulka ukazuje výskyt ADH tříd u jednotlivých organismů (Tab. 3).

Tab. 3 Výskyt ADH tříd u jednotlivých organismů (převzato Duester et al., 1999).

organismus	Třída I	Třída II	Třída III	Třída IV	Třída V	Třída VI	Třída VII
Člověk	ADH1A ADH1B ADH1C	ADH2	ADH3	ADH4	ADH5		
Myš	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4			
Krysa	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4		ADH6	
Křeček	ADH1					ADH6	
Kůň	ADH1E ADH1S		ADH3				
Pavián	ADH1B ADH1C						
Opice	ADH1A						
Králík	ADH1	ADH2A ADH2B					
Hlodavec	ADH1						
Slepice	ADH1		ADH3				ADH7
Křepelka	ADH1						
Pštros	ADH1	ADH2					

Kiwi	ADH1		
Aligátor	ADH1		
Kobra	ADH1		
Ještěrka	ADH1A	ADH3	
	ADH1B		
Žába	ADH1		ADH4
Karas	ADH1	ADH3H	
		ADH3L	
Žralok		ADH3A	
		ADH3B	

1.6. Vlastnosti a funkce rostlinné GSNOR

S-nitrosoglutathionreduktasa byla nalezena i v rostlinách. Charakterizována byla nejdříve u *Arabidopsis thaliana* a poté i u dalších modelových rostlin jako je hrách, rýže, kukuřice, slunečnice a rajče (Sakamoto et al., 2002).

Enzymová struktura GSNOR z *Arabidopsis thaliana*, odvozená z cDNA sekvence odpovídá komplexnímu systému alkoholdehydrogenas a ukazuje, že všechny formy života sdílejí alkoholdehydrogenasový typ 3. Odpovídající mRNA má délku 1,4kb, je přítomná ve všech orgánech rostlin a byla nalezena pouze v jedné kopii v genomu (Martinez et al., 1996). GSNOR z *Arabidopsis thaliana* ukazuje typickou strukturu ADH3 se 69-89 % shodou s odpovídající formou ADH3 u člověka a hrachu (Shafgat et al., 1996). Vyhodnocením reziduí v aktivním místě bylo zjištěno, že 3 z 23 hlavních reziduí jsou odlišná uvnitř ADH3 enzymů a z toho dvě z těchto tří změn u rostlinných sekvencí (Obr. 9) (Martinez et al., 1996).

	Substrate-interacting residues										Coenzyme-interacting residues													
	46	67	93	140	141	57	115	116	294	318	110	304	309	47	48	51	178	203	223	224	228	269	271	369
Ara III	T	H	Y	F	M	D	R	S	V	A	L	F	V	H	T	Y	T	V	D	I	K	I	N	R
Pea III	T	H	Y	F	M	D	R	A	V	A	L	F	V	H	T	Y	T	V	D	I	K	L	N	R
Human III	T	H	Y	Y	M	D	R	V	V	A	L	F	V	H	T	Y	T	V	D	I	K	I	N	R

Obr. 9 Rezidua v důležitých pozicích pro vazbu substrátu a koenzymu u *Arabidopsis*, hrachu a člověka (převzato Martinez et al., 1996).

Molekulové a kinetické vlastnosti GSNOR (ADH3) z *Arabidopsis* jsou pozoruhodně podobné těm, které byly studovány u savců, bezobratlých a mikroorganismů, což poskytuje důkaz o vysokém stupni strukturní a funkční zachovalosti enzymu u všech živých forem (Fernandes et al., 1995). ADH3 je v *Arabidopsis thaliana* exprimována v nízkém množství přibližně 5 mU/mg proteinu a 17,5 mU/mg čerstvá tkáň. Jde přibližně o stejné množství, které bylo nalezeno v semenech hrachu. ADH3 gen je exprimován v podobném množství ve všech rostlinných orgánech obdobně jako je všudypřítomná distribuce u živočišné ADH3 (Giese et al., 1994).

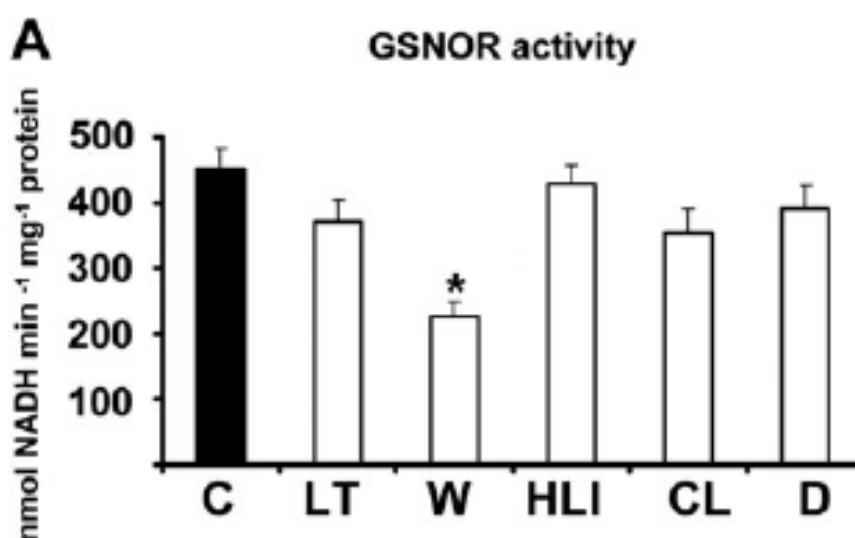
1.6.1. Funkce GSNOR při stresu rostlin

Kadmium je toxický polutant pro člověka, živočichy a rostliny. Odlišné metabolické procesy jako je fotosyntéza nebo respirace jsou ovlivněny právě kadmíem. U rostlin hrachu růstem s 50 μ M chloridem kademnatým CdCl₂ došlo k významné inhibici růstu, právě tak jako redukcí transpirace, fotosyntézy a poruchám nutričního stavu rostlin (Sandalio et al., 2001). Navíc kadmium vyvolává poruchy v antioxidační funkci a tím dochází k indukci oxidačního stresu u hrachu (Romero-Puertas et al., 2004). Obsah glutathionu v listech hrachu byl analyzován a bylo zjištěno, že obsah glutathionu v listech rostlin, které byly pěstovány s kadmíem, se snížil o více než 50% vůči kontrolním rostlinám bez kadmia. Dále byla měřena aktivita GSNOR jejíž hodnota byla 2,67 nmol NADH min⁻¹ mg⁻¹ v surovém extraktu hrachových listů. U rostlin vystaveným působení kadmia došlo k redukcí aktivity GSNOR asi o 31% (Barroso et al., 2006).

Mechanické poškození rostlinné tkáně nebo poranění se vyskytuje při útoku hmyzu a iniciuje sérii biochemických a molekulárních procesů, které jsou totožné k těm, které jsou zahrnuty v obranné odpovědi k hmyzu. Analýza transkriptů genu pro GSNOR u *Arabidopsis* v různých časech po poranění ukázala, že došlo k represi genu. Represe byla nejvyšší dvě hodiny po poranění listů *Arabidopsis*. Hladina mRNA byla obnovena za 48 hodin po poranění. Dvě odlišné signální dráhy jsou zahrnuty v odpovědi na poranění (Titarenko et al., 1997). První z nich nevyžaduje kyselinu jasmonovou (JA) a je hlavně zodpovědná za aktivaci genů v místě lokálního poškození. Druhou je dráha, která je dependentní na kyselině jasmonové a aktivuje geny pro lokální a systémové místo poškození. Na druhou stranu některé geny vyžadují k aktivaci kyselinu abscisovou ABA. Výzkum ukázal, že gen GSNOR (ADH3) je citlivý k JA a necitlivý k ABA (Pena-Cortes et al., 1995). Gen GSNOR je také

regulován kyselinou salicylovou SA. SA podporuje typ buněčné smrti související s hypersenzitivní odpovědí na interakci patogen - rostlina (Brading et al., 2000). SA inhibuje aktivitu katalasy, což vede k zvýšení koncentrace peroxidu vodíku a jeho následkem vzniká oxidativní stres v lokálním místě poškození. Inhibice katalasy také iniciuje peroxidaci lipidů (Durner & Klessig, 1995).

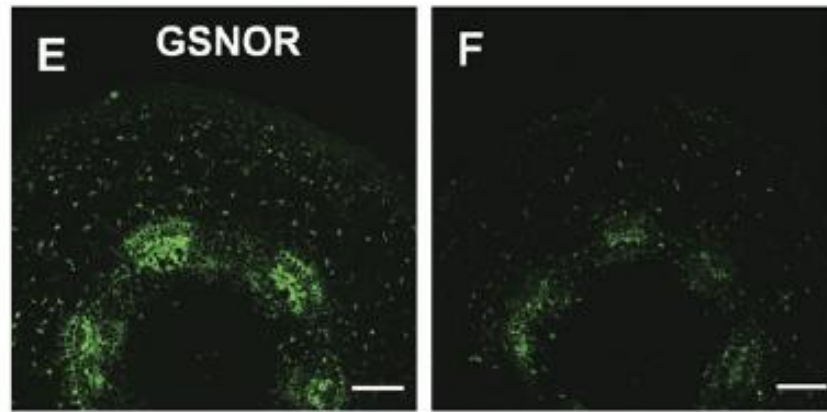
Další studie zkoumala 9 dnů staré hypokotyly slunečnice, které byly vystaveny různým podmínkám - nízká teplota, mechanické poškození, vysoká intenzita světla, nepřetržitému světlu a tmě (Obr. 10) (Chaki et al., 2010).



Obr. 10 Aktivita GSNOR z hypokotylů slunečnice měřená za různých podmínek; c – kontrola, LT – nízká teplota, W – poranění, HLI – vysoká intenzita světla, CL – nepřetržité světlo, D – tma; aktivita GSNOR měřena při 340 nm, použito 20 mM fosfátový pufru pH8, 0,2 mM NADH, finální koncentrace GSNO byla 0,4 mM (převzato Chaki et al., 2010).

Aktivita GSNOR byla významně redukována pouze v případě mechanického poškození, činila asi 50%. Další podmínky neměly na aktivitu GSNOR významnější efekt.

GSNOR u kontrolních hypokotylů byla detekována v buňkách kortexu a cévních svazcích (Obr. 11). Mechanickým poškozením bylo množství GSNOR redukováno (Chaki et al., 2010).



Obr. 11 Redukce GSNOR vlivem mechanického poškození hypokotylu slunečnice; vlevo kontrola, vpravo mechanicky poškozený hypokotyl; detekce provedena konfokální laserovou skenovací mikroskopií (převzato Chaki et al., 2010).

Z uvedených nepříznivých podmínek na hypokotylu slunečnice jen mechanické poškození a vysoká intenzita světla se zdá být příčinnou oxidativního poškození, založeném na vysokém množství lipidových hydroxyperoxidů, které jsou typickým ukazatelem oxidativního stresu (Requena et al., 1996).

Nedávné studie mutanta *Arabidopsis thaliana* HOT5, který kóduje GSNOR a je citlivý k vysoké teplotě, ukázaly, že GSNOR je vyžadována pro aklimatizaci organismu vůči vysoké teplotě (Lee et al., 2008).

Experimentální část

2.1. Materiál a přístrojové vybavení

2.1.1. Chemikálie

Acros Ogranics, USA:

Glutathion GSH

Triton X-100

AppliChem, SRN:

BSA

NADH

Bio-Rad, USA:

Akrylamid

CBB-R 250

Laemmliho vzorkovací pufr

Pure Nitrocellulose Membrane 0,45 μ m

Fluka , Švýcarsko:

EDTA Na⁺

Fenazinmethosulfát PMS

Imidazol

Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid IPTG

Lysozym

MOPS

Na-askorbát

N,N'-tetramethyldiamin TEMED

Percoll

Persíran amonný APS

PMSF

Sacharosa

Sorbitol

Lach-Ner, ČR:

Aceton

Bromfenolová modř

n-butanol

MP Biomedicals, USA

Bisakrylamid

Tris

Sigma-Aldrich, USA

Agar

Dithiothreitol - DTT

Dusitan sodný

EDTA

Glycerol

Glycin

Formaldehyd

NAD⁺

Nitrotetrazoliová modř NBT

PVP-40

Streptomycin 400x

Sekundární králičí protilátka IgG značená POX

Top-Bio, ČR:

DNAsa

RNAsa

Ostatní:

Bacterial Protein Extraction Reagent B-PER – Thermo Scientific, USA

Blotovací papír – ScienceLab, USA

L-cystein – Lachema, ČR

Luminol - Santa Cruz Biotechnology, USA

Protein - Ladder 10-250 kDa - Biolabs, UK

Primární polyklonální protilátka byla připravena injektováním purifikovaného rekombinantního LeGSNOR do těla králíka.

2.1.2. Přístroje

Analytické váhy – Sartorius, SRN

Automatické pipety - Eppendorf, SRN

Blotovací aparatura BioDot SF - Bio-Rad, USA

Centrifuga IEC CL31R – Thermo Jouan, Francie

Centrifuga Rotanta 460R – Schoeller Instruments, ČR
Digitální pH-metr InoLab pH Level 1 - Thermo Scientific, USA
Digitální předvážky 440-21N - KERN, SRN
Elektromagnetická míchačka IKA Big-squid - Labortechnik, SRN
Fotografický film - Amersham Biosciences, USA
Homogenizátor T18/10 – Janke and Kunkel, SRN
Chlazená centrifuga 5415 R - Eppendorf, SRN
Incubátor Gallenkamp - Schoeller Instruments, ČR
Laminární box - Schoeller Instruments, ČR
Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT - BioTek Instruments, USA
Spektrofotometr Beckman DU 7500 - Beckman Coulter, USA
Třepačka 3D Mini-Shaker - BIOSAN, GRANT Instruments, UK
Vortex - Stuart, UK
Ultrafiltrační zařízení Amicon - Millipore, USA
Zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 - Bio-Rad, USA

2.1.3. Roztoky

Roztoky pro přípravu rekombinantního proteinu

- LB médium: 10 g Tryptonu, 5 g Yeast extraktu, 10 g NaCl v 1l pH 7, autoklávováno
- 20% glukosa
- 100 mM IPTG
- Resuspendační pufr: 1, 25 ml 50 mM Tris-HCl pH 8, 0,25 ml 10 mM MgCl₂, 0,15 ml inhibitoru proteas a 0,85 ml H₂O
- 1 M NaCl
- 50% glycerol
- Ekvilibrační pufr: 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM imidazol, 5% glycerol
- Eluční pufr: 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 250 mM imidazol, 5% glycerol

Roztoky pro elektroforézu

- AA/BIS : 30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) bisakrylamid
- Pufr do zaostřovacího gelu: 0,5 M Tris-HCl pH6,8
- Pufr do dělicího gelu: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
- 10% persíran amonný

- Elektrodotový pufr pro nativní elektroforézu: 0,025 mol/l Tris, 0,192 mol/l glycin pH 8,3
- Elektrodotový pufr pro SDS-PAGE: 0,025 mol/l Tris, 0,192 mol/l glycin, 0,1% SDS pH 8,3
- 60% glycerol
- 10% SDS
- Vzorkovací pufr: 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 20% glycerol, 0,2 M DTT, 0,02% (w/v) bromfenolová modř

Roztoky pro Western blotting

- Blotovací pufr: 0,025 mol/l Tris, 0,192 mol/l glycin, 20% (v/v) metanol pH 8,3
- TBS pufr: 20 mM Tris, 500 mM NaCl pH7,5
- 3% želatina v TBS
- 1% želatina v TBS
- Tween TBS – 0,15 ml Tween-20 do 300 ml TBS

Stanovení proteinů

- Zásobní roztok činidla Coomasie Blue: 50 mg Coomasie Blue G250 v 25 ml MeOH a 50 ml 85% kys. fosforečné, doplněno do 100 ml H₂O
- Pracovní roztok činidla Bradfordové – zásobní roztok Coomasie Blue naředěn vodou 1:4

Roztoky pro přípravu rostlinných extraktů

- Extrakční pufr: 50 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM EDTA Na⁺, 0,2% (v/v) Triton X-100, 2 mM DTT, 1 mM PMSF
- 10 mM Na - fosfátový pufr pH 6,8
- 50 mM K - fosfátový pufr pH 7,8

Roztoky pro izolaci mitochondrií a chloroplastů

- EM médium: 300 mM sorbitol pH 7,5, 1 mM EDTA, 30 mM MOPS, 0,6% PVP-40, 4 mM L-cystein, 0,1% BSA
- WM médium: 300 mM sorbitol, 1 mM EDTA, 30 mM MOPS, 0,1% BSA pH 7,5
- MB médium: 300 mM sacharosa, 10 mM K-fosfátový pufr, 1 mM EDTA, 0,1% BSA, pH 7,2
- GR pufr: 0,33 M sorbitol, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 2 mM EDTA, 5 mM Na-askorbát, 0,1% BSA pH 7,5

- Import pufr: 0,33 M sorbitol pH 8

Barvicí roztoky

- Barvení Coomassie Blue: 0,1% (w/v) CBB R – 250 v 15% (v/v) kyselině octové a 45% (v/v) metanolu
- Barvení NBT: 0,1 M fosfát, pH 7,5, 0,1 mM NAD⁺, 0,1 mM PMS, 0,1 mM NBT, 1 mM formaldehyd, 1 mM GSH

Ostatní roztoky

- MS médium: 4,3 g MS média s vitaminy, 10 g sacharosy, 0,195 g MES, 7g agaru v 1l H₂O pH 6,1
- Hoaglandův roztok:

Tab. 4 Složení Hoaglandova roztoku.

Složení	MW	c zás. roztoků (mM)	objem ml/l	výsledná c (μM)
KNO ₃	101,1	1000	1,5	1500
Ca (NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	236,16	1000	1	1000
NH ₄ H ₂ PO ₄	115,08	1000	0,5	500
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246,49	1000	0,25	250
KCl	74,5	50	} 1	50
MnSO ₄ · H ₂ O	169,01	2		2
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	287,55	2		2
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	249,75	0,5		0,5
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	161,97	0,5		0,5
H ₃ BO ₃	61,84	25		0,5
FeEDTA	381,08	20	1	20

2.1.4. Rostlinný materiál

Hrách setý *Pisum sativum* – odrůda Zekon, Audit C1

Rajče jedlé - 3 genotypy:

Solanum lycopersicum (Amateur),

Solanum chmielewskii (LA 2663)

Solanum habrochaites (LA 2128)

2.1.4.1. *In vitro* sterilní kultivace semenáčků rajčat

Semena rajčat byla sterilizována 20 minut v 3% Savu a poté 10x propláchnuta sterilní vodou. Pinzetou byla semena vyseta na Petriho misky s MS médiem. Misky byly umístěny do fytostronu s periodou 12h den/12h noc a 22°C. Polovina misek byla pěstována na světle a polovina misek v tmě.

2.1.4.2. Kultivace rajčat v substrátu

Semena rajčat byla vyseta do květináčů s pěstební hlínou a pěstována 6-8 týdnů ve fytostronu s periodou 12h den/12h noc a 22°C.

2.1.4.3. Výsev hrášku

Semena hrášku byla přes noc namočena do vody. Nabobtnaná semena byla vyseta do misek s perlitem a umístěna do fytostronu s periodou 12h den/12h noc a 22°C. Hrášek byl zaléván Hoaglandovým živným roztokem. Polovina misek byla pěstována na světle a polovina misek v tmě.

2.2. Metody

2.2.1. Purifikace rekombinantního proteinu LeGSNOR z *E. coli*

Kompetentní buňky *E. coli*, které obsahovaly plasmid pCDF DUET s vloženou sekvencí LeGSNOR (GU296438.1) mi byly poskytnuty Mgr. Martinou Tylichovou Ph.D. Nejdříve byla připravena prekultura smícháním 20ml LB média, 1 ml 20% glukosy a 50µl antibiotika streptomycin 400x. Poté byla provedena inokulace 5 µl buněčné suspenze *E. coli*. Prekultura byla inkubována přes noc při 37°C na třepačce. Následuje příprava kultury. Do Erlenmayerovy baňky s 200ml LB média bylo přidáno 500 µl streptomycinu 400x. Kultura byla centrifugována při 4000 g 10 minut a 4°C, supernatant odliť a peleta resuspendována v 10ml připraveného LB média s antibiotikem. Poté byla kultura přilita ke zbylým 190 ml LB média a inkubována na třepačce 1-1,5 hodiny při 37°C. Až optická denzita dosáhla 0,5-0,6 byl přidán 1 ml 100

mM IPTG, čímž došlo k indukci exprese proteinu. Inkubace přes noc při 20°C na třepačce.

Extrakce

Kultura byla centrifugována 20 minut při 4000g a 4°C. Supernatant byl odlit a peleta promyta 40 ml 0,9% NaCl a vortexována. Centrifugace 20 minut při 4000 g a 4°C. Supernatant odlit a peleta rozpuštěna v resuspendačním pufru, vortexována, a poté přidáno 2,5 ml B-PER. Vortexováno a necháno 10 minut stát při pokojové teplotě. Dále bylo přidáno 300 µl lysozymu a inkubováno 30-60 minut než vzorek zgelovatěl. Poté bylo přidáno 5 ml H₂O, 7 µl RNAsy a 10 µl DNAsy a promícháno převrácením. Inkubováno 30 minut při 37°C na vodní lázni. Finálně bylo přidáno 1,25 ml 1 M NaCl a 1,37 ml 50% glycerolu, centrifugováno 30 minut při 12000 g a 8°C. Lyzát byl přenesen do nové centrifugační zkumavky.

Purifikace

Kolona Co(II)-IDA-sepharose byla promyta ekvilibračním pufrém. Vzorek nadávkován, jímány frakce balastních proteinů a poté kolona opět promývána pufrém asi 1 hodinu. Eluce proteinu byla zahájena elučním pufrém a jímány aktivní frakce. Eluáty byly zkoncentrovány pomocí ultrafiltrační cely Amicon 8200. Vzorky dialyzovány pře noc.

2.2.2. SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu byla provedena v 10% dělicím a 4% zaostřovacím gelu. Jednotlivé gely byly připraveny dle tabulky (Tab. 5). Přídavkem persíranu amonného byla nastartována polymerace dělicího gelu, který byl poté nalit do prostoru mezi skla. Gel byl převrstven n-butanolem. Po 15 minutách byl n- butanol odstraněn a povrch gelu opláchnut destilovanou vodou. Po nastartování polymerace zaostřovacího gelu, byl gel přenesen mezi skla, vložen hřebínek a gel nechán tuhnout 30 minut. Skla s gelem byla umístěna do komory, vyjmut hřeben a nalit elektrodivý pufr. Do jamek bylo aplikováno 30 µl vzorku a 10 µl markru. Vzorky byly připraveny smícháním 20 µl vzorku proteinu, 20 µl 10% SDS a 20 µl vzorkovacího pufru. Promíchány, povařeny 5 minut a po ochlazení centrifugovány 5 minut při 6000 g. Komora byla uzavřena a připojena ke zdroji o 100 V. Po doputování vzorků na rozhraní gelů byl zdroj nastaven na 200 V. Po doputování zóny markru téměř na úroveň dolního okraje skla byl zdroj vypnut.

Tab. 5 Příprava gelů

Typ gelu	AA/Bis	Tris-HCl	Tris-HCl	voda	TEMED	APS
		1,5M pH8,8	0,5M pH6,8			
10% dělicí	3,4 ml	2,5ml	-	3,8ml	0,1ml	0,07ml
4% zaostřovací	1,3ml	-	2,5ml	5,9ml	0,2ml	0,12ml

2.2.3. Nativní elektroforéza

Metoda nativní elektroforéza byla provedena v 8% dělicím a 4% zaostřovacím gelu. Postup přípravy gelu je stejný jako u SDS-PAGE. Gely byly připraveny dle tabulky (Tab. 6). Vzorky byly připraveny smícháním proteinu a 60% glycerolu v poměru 3:1 (v/v).

Tab. 6 Příprava gelů

Typ gelu	AA/Bis	Tris-HCl	Tris-HCl	voda	TEMED	APS
		1,5M pH8,8	0,5M pH6,8			
8% dělicí	5,2 ml	5ml	-	9,2ml	0,02ml	0,12ml
4% zaostřovací	1,3ml	-	2,5ml	5,9ml	0,02ml	0,12ml

2.2.4. Western blotting

Nejdříve byla provedena SDS-PAGE elektroforéza podle již zmíněného postupu. Následovala metoda Western blottingu v uspořádání „tank-blotting“. Nejdříve byla připravena nitrocelulósová membrána a 2 kusy silného filtračního papíru o velikosti gelu - 8x5 cm. Membrána, houbičky a filtrační papír byly namočený v blotovacím pufrem. Do blotovací kazety na její černou stranu byly postupně poskládány jednotlivé vrstvy – porézní houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír a porézní houbička. Kazeta byla uzavřena a vložena do blotovací komory a zalita blotovacím pufrem. Podle velikosti a počtu membrán nastavíme proud na zdroji – 0,8 mA /cm². Po 2 hodinách bylo ukončeno blotování. Následovala detekce proteinů na

membráně. Membrána byla inkubována přes noc v 3% želatině v TBS. Poté 2x promyta roztokem Tweenu v TBS. Inkubována s primární protilátkou v 1% želatině v TBS ředěnou 1: 500 po dobu 2 hodin. Jako primární protilátka byla použita připravená polyklonální králičí protilátka proti LeGSNOR. Opět 2x promyta roztokem Tweenu v TBS a inkubována se sekundární protilátkou v 1% želatině v TBS ředěnou 1:16000 2 hodiny. Jako sekundární protilátka byla využita komerčně dodávaná polyklonální králičí IgG protilátka značená POX. Membrána promyta roztokem Tweenu v TBS a 5x destilovanou vodou. Membrána poté byla detekována chemiluminiscencí. Sekundární protilátka značená POX reakcí s luminolem vyvolala chemiluminiscenci, detekce záření byla provedena na fotografický papír a ten vložen do automatického vyvolávacího přístroje.

2.2.5. Spektrofotometrické stanovení

2.2.5.1. Stanovení proteinů metodou Bradfordové

Do jamek mikrodestičky bylo pipetováno postupně 45 μ l deionizované vody, 5 μ l vzorku nebo standardu a 200 μ l pracovního roztoku činidla Bradfordové. Destička byla jemně protřepána a ponechána stát 10 minut při pokojové teplotě. Poté byla na readru proměřena při 595 nm.

2.2.5.2. Stanovení aktivity LeGSNOR

Měření probíhalo na UV/Vis spektrofotometru Beckman DU 7500. Aktivita enzymu byla měřena při 340 nm a 25°C. Do kyvety bylo postupně nepipetováno 1,6 ml 20 mM Tris-HCl pufru pH 8, 0,2 ml 2 mM NADH a 1 μ l vzorku. Reakce byla startována přidávkem 0,2 ml 4 mM GSNO.

2.2.5.3. Stanovení aktivity GSNOR v extraktu z rostlin

Měření probíhalo na UV/Vis spektrofotometru Beckman DU 7500. Aktivita enzymu byla měřena při 340 nm a 25°C. Do kyvety bylo postupně nepipetováno 1,6 ml 20 mM Tris-HCl pufru pH 8, 0,2 ml 2 mM NADH a 25 μ l vzorku extraktu. Reakce byla startována přidávkem 0,2 ml 4 mM GSNO.

2.2.5.4. Stanovení aktivity GSNOR jako alkoholdehydrogenasy

Měření probíhalo na UV/Vis spektrofotometru Beckman DU 7500. Aktivita enzymu byla měřena při 340 nm a 25°C. Do kyvety bylo postupně pipetováno 2,18 ml 0,1 M glycinového pufru pH 10, 30 μ l 75 mM NAD⁺ a 30 μ l substrátu – 2,2 M etanol, 2,2 M 2-propanol a 75 mM 1-oktanol. Reakce byla startována přidavkem 10 μ l vzorku enzymu.

2.2.5.5. Stanovení glutation-dependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity GSNOR

Měření probíhalo na UV/Vis spektrofotometru Beckman DU 7500. Aktivita enzymu byla měřena při 340 nm a 25°C. Do kyvety bylo postupně pipetováno 2,34 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 8, 50 μ l 50 mM GSH, 50 μ l 50 mM formaldehydu a 50 μ l 75mM NAD⁺. Reakce byla startována přidavkem 10 μ l vzorku.

2.2.6. Příprava rostlinného extraktu

1g rostlinného materiálu byl homogenizován v extrakčním pufru v třecí misce vychlazené ledem (poměr 1 g rostlinného materiálu: 2 ml extrakčního pufru). Extrakt byl centrifugován 30 minut při 16000 g a 4°C. Poté byl přečištěn na kolonkách PD-10. Nejdříve byly kolonky ekvilibrovány 15 ml 10 mM Na-fosfátového pufru pH 6,8. Poté nanesen 1 ml extraktu. Po vsáknutí naneseo 1,5 ml 50 mM K-fosfátového pufru pH 7,8. Eluce zahájena 3,5 ml 50 mM K-fosfátového pufru pH 7,8. Kolony promyty 25 ml destilované vody a uchovány v azidu sodném.

2.2.7. Izolace mitochondrií z hrachu

10 g kořenů/stonků hrachu ve 30 ml EM média bylo opatrně rozdrceno mixérem 3-5 impulzy a přefiltrováno pře sítku. Ke zbylé nepřefiltrované tkáni bylo přidáno 20 ml EM média, byla opět rozdrcena mixérem a přefiltrována. Homogenát byl centrifugován 20 minut při 1000 g. Poté byl supernatant centrifugován 20 minut při 12500 g. Peleta byla rozpuštěna v 2 ml WM média a centrifugována 10 minut při 1000 g. Poté byl supernatant centrifugován 20 minut při 12500 g. Peleta s mitochondriemi byla resuspendována v 0,3 ml MB média a zamražena.

2.2.8. Izolace chloroplastů z hrachu

10g kořenů/stonků hrachu ve 20 ml ledového GR pufru bylo opatrně rozdrceno 3-5 impulzy mixéru a přefiltrováno přes sítku. Homogenát byl centrifugován v centrifuze s polohovacím rotorem 3 minuty na 2000 g. Supernatant byl odlit a peleta rozpuštěna v 0,5 ml GR pufru a převrstvena Percoll gradientem. Centrifugováno 15 minut při 2000 g. Gradient byl připraven smícháním 3,5 ml GR pufru a 7 ml Percollu, promíchán převrácením a centrifugován 40 minut při 20000 rpm. Pipetou s odstříženou špičkou byla vyjmuta fáze s chloroplasty a rozpuštěna v trojnásobném množství Import pufru. Centrifugováno 5 minut při 1500 g. Peleta resuspendována v 2,5 ml Import pufru a centrifugována 5 minut při 1000g . Peleta byla zamrazena.

2.2.9. Syntéza S-nitrosoglutathionu

Ve 3 ml 1 M HCl vychlazené na ledu bylo rozpuštěno 614 mg glutathionu. Poté bylo přidáno 138 mg pevného NaNO_2 a mícháno na ledu 40 minut. Vznikla hustá růžová sraženina. K sraženině bylo přidáno 5 ml vyhlazeného acetonu a mícháno 10 minut. Sraženina byla odsána na Büchnerově nálevce a promyta postupně 2x 10 ml ledové H_2O , 2x 10 ml acetonu a 2x 10 ml vychlazeného etheru. Promytá sraženina GSNO byla vysušena ve tmě v exsikátoru a uschována v mrazicím boxu při -20°C .

Závěr

V teoretické části byly shrnuty aktuální poznatky o roli oxidu dusnatého v signalizaci buněk, S-nitrosylaci jako posttranslační modifikaci cysteinových reziduí a roli S-nitrosothiolů v rostlinách a u živočichů. Další kapitoly byly věnovány charakteristice enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy, jako klíčového enzymu detoxifikace formaldehydu a regulace hladiny S-nitrosothiolů. A neposlední řadě vlivu biotický a abiotických faktorů na aktivitu GSNOR.

V experimentální části byla provedena purifikace rekombinantního enzymu GSNOR v *E. coli*. Dále byla provedena detekce aktivity GSNOR na polyakrylamidovém gelu. Aktivita GSNOR byla stanovována v extraktech z kořenů a hypokotylů rajčete a hrachu, kde byl sledován vliv světelných podmínek na aktivitu GSNOR. Aktivita GSNOR v kořenech rajčete *Amateur* byla vyšší než u etiolovaných vzorků. Stejný jev byl pozorován i u hypokotylů. V případě hrachu aktivita GSNOR u etiolovaných kořenů i hypokotylů přesáhla aktivitu v extraktech z kořenů a hypokotylů hrachu pěstovaných na světle. V chloroplastech izolovaných z hypokotylů byla stanovena aktivita GSNOR a její hodnota byla pro vyšší pro hypokotyly oproti etiolovaným vzorkům. V případě stanovení aktivity GSNOR v mitochondriích byli vyšší hodnoty pro etiolované kořeny a hypokotyly hrachu kultivovaného na světle. Na závěr jsme se věnovali stanovení změny aktivity GSNOR u tří genotypů rajčete vlivem infekce patogenem. U více náchylného genotypu *Amateur* byl pozorován nárůst aktivity GSNOR. U zbylých dvou více rezistentních genotypů *habrochaites* a *chmielewskii* byl zaznamenán pokles aktivity GSNOR.

Literatura

Avila M. A., Mingorance J., Martinez-Chantar M. L., Casado M., Martin-Sanz P., Bosca L., Mato J. M. (1997) Regulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase during septic shock: role of nitric oxide. *Hepatology* **25**, 391-396.

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

Bauer P. M., Buga G. M., Fukuto J. M., Pegg A. E., Ignarro L. J. (2001) Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **276**, 34458-34464.

Belenghi B., Romero-Puertas M. C., Vercammen D., Brackener A., Inze D., Delledonne M., van Breusegen F. (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of critical cysteine residue. *J. Biol. Chem.* **282**, 1352-1358.

Brading P. A., Hammond-Kosack K. E., Parr A., Jones J. D. (2000) Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant J.* **23**, 305-318.

Chaki M., Valderrama R., Fernandes-Ocana A. M., Carreras A., Gomez-Rodriguez M. V., Pedrajas J. R., Begara-Morales J. C., Sanchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F. J., Barroso J. B. (2010) Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *J. Exp. Bot.* **62**, 1803-13.

Chen R., Sun S., Wang C., Li Y., Liang Y., An F., Li C., Dong H., Yang X., Zhang J., Zuo J. (2009) The *Arabidopsis* Paraquat resistant2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Research* **19**, 1377-1387.

Corpas F. J., del Rio L. A., Barroso J. B. (2008) Post-translational modifications mediated by reactive nitrogen species: nitrosative stress responses or components of signal transduction pathways? *Plant Signal. Behav.* **3**, 301-303.

- Diaz M., Achkor H., Titarenko E., Martinez M. C. (2003) The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Lett.* **543**, 136-139
- Dicks A. P., Swift H. R., Williams D. L., Butler A. R., Al-Sadoni H. H., Cox B. G. (1996) Identification of Cu⁺ as the effective reagent in nitric oxide formation from S-nitrosothiols (RSNO). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 481-487.
- Duester G., Farres J., Felder M. R., Holmes R. S., Höög J. O., Pares X., Plapp B. V., Yin S. J., Jörnvall H. (1999) Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Bioch. Pharmacol.* **58**, 389-395.
- Durner J., Klessig D. F. (1995) Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *PNAS* **92**, 11312-11316.
- Durner J., Wendehenne D., Klessig D. F. (1998) Defence gene-inducing in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *PNAS* **95**, 10328-10333.
- Durrant W. E., Dong X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 185-209.
- Edenberg H. J., Ho W. H., Hur M. W. (1995) Promoters of mammalian class III alcohol dehydrogenase genes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **372**, 295-300.
- Engeland K., Höög J. O., Holmquist B., Estonius M., Jörnval H., Vallee B. L. (1993) Mutation of Arg-115 of human class III alcohol dehydrogenase: a binding site required for formaldehyde dehydrogenase activity and fatty acid activation. *PNAS* **90**, 2491-2494.
- Eu J., Sun J., Xu L., Stamlor J. S., Meissner G. (2000) The skeletal muscle calcium release channel coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell* **102**, 499-509.
- Feechan A., Kwon E., Yun B. W., Wang Y., Pallas J. A., Loake G. J. (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *PNAS* **102**, 8054-8059.
- Fernandes M. R., Biosca J. A., Norin A., Jörnvall H., Parks X. (1995) Class III alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: structural and enzymatic features differ toward the human/mammalian forms in a manner consistent with functional needs in formaldehyde detoxification. *FEBS Lett.* **370**, 23-26

- Foster M. W., Liu L., Zeng M., Hess D. T., Stamler J. S. (2009) A genetic analysis of nitrosative stress. *Biochemistry* **48**, 792-799.
- Fukuto J. M., Hobbs A. J., Ignarro L. J. (1993) Conversion of nitroxyl (HNO) to nitric oxide (NO) in biological systems: the role of physiological oxidants and relevance to the biological activity of HNO. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 707-713.
- Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A. (2003) S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol. Interv.* **3**, 253-263.
- Giese M., Bauer-Doranth U., Langebartels C., Sandermann H. (1994) Detoxification of formaldehyde by the spider plant (*Chlorophytum comosum* L.) and by soybean (*Glycine max* L.) cell suspension cultures. *Plant Physiol.* **104**, 1301-1309.
- Glatz J. F., Luiken J. J., van Nieuwenhoven F. A., van der Vusse G. J. (1997) Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acid. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **57**, 3-9.
- Gould K. S., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A., Wendehenne D. (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ.* **26**, 1851-1862.
- Gow A., Buerk D., Ischiropoulos H. (1997) A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **272**, 2841-2845.
- Hedberg J. J., Griffiths W. J., Nilsson S. J., Höög J. O. (2003) Reduction of S-nitrosoglutathione by human alcohol dehydrogenase 3 in an irreversible reaction as analysed by electrospray mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1249-1256.
- Hess D. T., Matsumoto A., Kim S. O., Marshall H. E., Stamler J. S. (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 150-166.
- Hofmann F., Ammendola A., Schlossmann J. (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J. Cell Sci.* **113**, 1671-1676.
- Hogg N. (1999) The kinetics of S-transnitrosation – a reversible second order reaction. *Anal. Biochem.* **272**, 257-262.
- Hogg N. (2000) Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Rad. Biol. Med.* **28**, 1478-1486.

Hong K. J., Yun B. W., Kang J. G., Raja M. U., Kwon E., Sorhagen K., Chu Ch., Wang Y., Loake G. J. (2007) Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *J. Exp. Bot.* **59**, 147-154.

Ignarro L. J. (2002) Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J. Physiol. Pharmacol.* **53**, 503-514.

Inoue K., Akaike T., Miyamoto Y., Okamoto T., Sawa T., Otagiri M., Suzuki S., Yoshimura T., Maeda H. (1999) Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **274**, 27069-27075.

Lee U., Wie Ch., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E. (2008) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 786-802.

Leiper J., Murray-Rust J., McDonald N., Vallance P. (2002) S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *PNAS* **99**, 13527-13532.

Lindermayr C., Durner J. (2009) S-nitrosylation in plants: pattern and function. *J. Proteomics* **73**, 1-9.

Lindermayr Ch., Saalbach G., Durner J. (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **137**, 921-930.

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

Liu L., Yan Y., Zeng M., Zhang J., Hanes M. A., Ahearn G., McMahon T. J., Dickfeld T., Marshall H. E., Que L. G., Stamler J. S. (2004) Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell* **116**, 617-628.

Mannick J. B., Hausladen A., Liu L., Hess D. T., Zeng M., Miao Q. X., Kane L. S., Gow A. J., Stamler J. S. (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* **284**, 651-654.

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

- Moncada S., Palmer R. M., Higgs E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
- Moulis J. M., Holmquist B., Vallee B. L. (1991) Hydrophobic anion activation of human liver $\chi\chi$ alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **30**, 5743-5749.
- Nürnberg Z., Brunner F., Kemmerling B., Piater L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**, 249-266.
- Padgett C. M., Whorton A. R. (1998) Cellular responses to nitric oxide – role of protein S-thiolation/dethiolation. *Arch. Biochem. Biophys.* **358**, 232-242.
- Parani M., Rudrabhatla S., Myers R., Weirich H., Smith B., Leaman D. W., Goldman S. L. (2004) Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* **2**, 359–366.
- Pena-Cortes H., Fisahn J., Willmitzer L. (1995) Signals involved in wound-induced Pin2 gene expression in tomato and potato plants. *PNAS* **92**, 4106-4113.
- Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008) Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chemické Listy* **102**, 410-416.
- Requena J. R., Fu M. X., Ahmed M. U., Jenkins A. J., Lyons T. J., Thorpe S. R. (1996) Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol. Dial. Transplant.* **11**, 548-553.
- Romero-Puertas M. C., Rodriguez-Serrano M., Corpas F. J., Gomez M., del Rio L. A., Sandalio L. M. (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves. *Plant Cell Environ.* **27**, 1122-1134.
- Rusterucci Ch., Espunya M. C., Diaz M., Chabannes M., Martinez M. C. (2007) S-nitrosogluthione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol.* **143**, 1282-1292.
- Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willits M. G., Molina A., Steiner H. Y., Hunt M. D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819.
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosogluthione reductase. *FEBS Lett.* **515**, 20-24.

- Sandalio L. M., Dalurzo H. C., Gomez M., Romero-Puertas M. C., del Rio L. A. (2001) Cadmium-induced change in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* **52**, 2115-2126.
- Sanghani P. C., Davis W. I., Fears S. L., Green S. L., Zhai L., Tang Y., Martin E., Bryan N. S., Sanghani S. P. (2009) Kinetic and cellular characterization of novel inhibitors of S-nitrosogluthione reductase. *J. Biol. Chem.* **284**, 24354-24362.
- Serpa V., Vernal J., Lamattina L., Grotewold E., Cassia R., Terenzi H. (2007) Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 1048-1053.
- Shafqat J., El-Ahmad M., Danielsson O., Martinez M. C., Persson B., Pares X., Jörnvall H. (1996) Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: Common derivation of the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol active forms (classes I and P). *PNAS* **93**, 5595 - 5599
- Singh R. J., Hogg N., Goss S. P. A., Antholine W. E., Kalyanaraman B. (1999) Mechanism of superoxide dismutase/H₂O₂ – mediated nitric oxide release from S-nitrosogluthione – role of glutamate. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**, 8-15.
- Singh R. J., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B. (1996) Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* **271**, 18596-18603.
- Staab C. A., Alander J., Brandt M., Lengqvist J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2008b) Reduction of S-nitrosogluthione by alcohol dehydrogenase 3 is facilitated by substrate alcohols via direct cofactor recycling and leads to GSH – controlled formation of glutathione transferase inhibitors. *Biochem. J.* **413**, 493-504.
- Staab C. A., Alander J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2009) The janus face of alcohol dehydrogenase 3. *Chem. Biol. Interact.* **178**, 29-35.
- Staab C. A., Hellgren M., Höög J. O. (2008a) Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implication with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosogluthione reductase activities. *Cell Mol. Life. Sci.* **65**, 3950-3960.
- Stamler J. S., Lamas S., Fang F. C. (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signalling mechanism. *Cell* **106**, 675-683.

Stamler J. S., Simon D. I., Osborne J. A., Mullins M. E., Jaraki O., Michel T., Singel D. J., Loscalzo J. (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *PNAS* **89**, 444-448.

Stamler J. S., Toone E., Lipton S., Sucher N. (1997) (S)NO signals: Translocation, regulation and a consensus motif. *Neuron* **18**, 691-696.

Thomson Ch. M., Sonawane B., Grafström R. C. (2009) The ontogeny, distribution and regulation of alcohol dehydrogenase 3: Implication for pulmonary physiology. *Drug Metab. Dispos.* **37**, 1565-1571.

Titarenko E., Rojo E., León J., Sanchez-Serrano J. J. (1997) Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **115**, 817-826.

Valderrama R., Corpas F. J., Carreras A., Fernandez-Ocana A., Chaki M., Luque F., Gomez-Rodriguez M. V., Colmenero-Varea P., del Rio L. A., Barroso J. B. (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett.* **581**, 453-461.

Williams D. L. (1996) S-nitrosothiols and role of metal ions in decomposition to nitric oxide. *Methods Enzymol.* **268**, 299-308.

Seznam použitých zkratek

AA/Bis	akrylamid-N,N'-methylenbisakrylamid
ABA	kyselina abscisová
ADH1	alkoholdehydrogenasa třídy 1
ADH3	alkoholdehydrogenasa třídy 3
APS	persíran amonný
Asp	kyselina asparagová
Arg	arginin
BSA	hovězí sérový albumin
cADPR	cyklický adenosindifosfát ribosa
CdCl ₂	chlorid kademnatý
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DDAH	dimethylarginindimethylaminohydrolasa
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FALDH	glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
GC	guanylátcyklasa
Glu	kyselina glutamová
GSH	glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSO ₂ H	glutathionsulfinová kyselina
GSONH ₂	glutathion sulfinamid
GSO ₃ H	glutathionsulfonová kyselina
GSSG	glutathion-disulfid
GTS	glutathion-S-transferasa
HMGSH	S-hydroxymethylglutathion
H ₂ O	voda
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HR	hypersenzitivní odpověď
IPTG	isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
JA	kyselina jasmonová
MAT	methioninadenosyltransferasa
MGST1	mikrosomální glutathion-S-transferasa

MOPS	3-(4-Morpholino)propansulfonový kyselina
NaCl	chlorid sodný
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaná forma)
NBT	nitrotetrazoliová modř
NaNO ₂	dusitan sodný
NH ₂ OH	hydroxylamin
NO	oxid dusnatý
N ₂ O ₃	oxid dusitý
NOS	synthasa oxidu dusnatého
NR	nitrátreduktasa
ONOO ⁻	peroxynitrit
ORF	open reading frame
PAL	fenalalaninamoniaklyasa
PAMPs	pathogen asociované sloučeniny
PMS	fenazinmethosulfát
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
POX	peroxidasa
PR-1	pathogenesis related protein 1
PVP-40	polyvinylpyrrolidon
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RyR1	ryanodinový receptor
SA	kyselina salicylová
SAR	systemově získaná resistance
SNOs	S-nitrosothioly
TEMED	N,N'-tetramethylendiamin
Thr	threonin