

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Metabolismus S-nitrosothiolů v houbových patogenech

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Zuzana Žvátorová
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.**
Rok: 2014

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a 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. Byl/a jsem seznámen/a 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 15. 7. 2014

Zuzana Žvátorová

Děkuji svému školiteli Doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, za poskytnutí potřebné literatury a čas věnovaný při zpracování experimentální i teoretické části bakalářské práce.

Děkuji kolektivu Katedry biochemie za cenné rady a pomoc při experimentální činnosti, především pak Mgr. Tereze Tiché za její pomoc s teoretickou a experimentální částí.

Dále děkuji doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za poskytnutí kultury *P. parasitica*.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Zuzana Žvátarová
Název práce	Metabolismus S-nitrosothiolů v houbových patogenech
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt

V úvodní teoretické části jsou shrnuty informace týkající se metabolismu a funkce oxidu dusnatého a významu S-nitrosylace jako mechanismu, který produkuje S-nitrosothioly, látky sloužící jako zásobní nebo transportní formy NO *in vivo*. Hladina vzniklých S-nitrosothiolů je kontrolována pomocí enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR), který se tak nepřímo podílí na regulaci posttranslačních modifikací proteinů S-nitrosylací. GSNOR se také podílí na obranné reakci rostlin proti abiotickému a biotickému stresu.

Bakalářská práce je zaměřena na studium přítomnosti S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) v modelové rostlině *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom a v patogenu *Phytophthora parasitica*. V experimentální části práce byly použity extrakty z listů tříměsíčních rostlin *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a z 35-denních kultur *P. parasitica*. V extraktech obou organismů byla prokázána přítomnost GSNOR a změřena její aktivita spektrofotometrickou metodou založenou na principu Warburgova optického testu. V buněčných extraktech byl také stanoven obsah S-nitrosothiolů pomocí Savillovy metody. Pro testování přítomnosti GSNOR v extraktech byly použity nativní elektroforéza a metoda Western blot, u které však nedocházelo k navázání primární protilátky, takže se z ní nezískaly potřebné výsledky. Naměřená GSNOR aktivita v *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom byla vyšší než u *S. lycopersicum*, kultivar Amateur, který sloužil pro porovnání. U *P. parasitica* byla enzymová aktivita značně ovlivněna stářím testované kultury. Naměřená koncentrace S-nitrosothiolů v nepřečištěných i přečištěných vzorcích byla vždy vyšší u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom než u *P. parasitica*. Výsledky práce potvrzují přítomnost S-nitrosothiolů a GSNOR v rostlinném patogenu a jsou výchozím bodem pro studium jejich úlohy v patogenezi.

Klíčová slova	S-nitrosothioly, S-nitrosoglutathionreduktasa, <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Zuzana Žvátorová
Title	Metabolism of S-nitrosothiols in fungal pathogens
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2014
Abstract	

The theoretical part provides information on the metabolism and functions of nitric oxide and the importance of S-nitrosylation as a mechanism that produces S-nitrosothiols, substances used as storage or transport forms of NO *in vivo*. Level of resulting S-nitrosothiols is controlled by the enzyme S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR), which is indirectly involved in the regulation of protein posttranslational modification by S-nitrosylation. GSNOR is also involved in plant defence response against abiotic and biotic stresses.

The thesis is focused on the study of the presence of the S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) in the model plant *Solanum lycopersicum* L. cv Micro Tom and in the pathogen *Phytophthora parasitica*. In the experimental part of the study extracts from leaves of three-month old plant *S. lycopersicum* L. cv Micro Tom and 35-day cultures of *P. parasitica* were used. The presence of the GSNOR was proved in extracts of both organisms and its activity was measured by the spectrophotometric method based on the principle of Warburg optical test. The concentration of S-nitrosothiols in the cell extracts was determined using Saville method. For testing of the presence of the GSNOR in extracts native electrophoresis and Western blot assay were used. Pathogen GSNOR was not recognized by the primary antibody, so that it could not be detected by Western blot. Measured GSNOR activity in *S. lycopersicum* L. cv Micro Tom was higher than in *S. lycopersicum* cv Amateur. Enzyme activity in *P. parasitica* was significantly affected by the age of tested cultures. S-nitrosothiols concentrations in unpurified and purified samples was always higher in *S. lycopersicum* L. cv Micro Tom than in *P. parasitica*. Obtained results confirm the presence of S-nitrosothiols and GSNOR in plant pathogen and represent a start point to study their role in pathogenesis.

Keywords	S-nitrosothiols, S-nitrosogluthathione reductase, <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Oxid dusnatý.....	2
2.1.1	Vznik NO	2
2.1.2	NO jako signální molekula v rostlinách.....	3
2.1.3	Biologické účinky	3
2.2	S-nitrosothioly	5
2.2.1	S-nitrosoglutathion.....	5
2.2.2	S-nitrosylace.....	6
2.2.3	Mechanismus S-nitrosylace	7
2.2.4	Stabilita a katabolismus SNO.....	8
2.3	S-nitrosoglutathionreduktasa.....	9
2.3.1	Struktura GSNOR	10
2.3.2	Substrátová specifita	11
2.3.3	Funkce a význam GSNOR a SNO	12
3	Experimentální část.....	22
3.1	Materiál a přístroje	22
3.1.1	Chemikálie	22
3.1.2	Přístroje a vybavení.....	22
3.2	Biologický materiál	23
3.2.1	<i>Phytophthora parasitica</i>	23
3.2.2	Rostlinný materiál	24
3.3	Experimentální metody	24
3.3.1	Extrakce a purifikace.....	24
3.3.2	Spektrofotometrické metody.....	25
3.3.3	SDS-PAGE.....	26
3.3.4	Western blot	27
3.3.5	Nativní elektroforéza.....	29
4	Výsledky a diskuze	30
4.1	Stanovení aktivity GSNOR v <i>P. parasitica</i>	30
4.2	Detekce GSNOR v <i>P. parasitica</i> metodou nativní elektroforézy	30
4.3	Detekce GSNOR metodou Western blot.....	31
4.4	Stanovení S-nitrosothiolů	32
5	Závěr	36
	Seznam citované literatury	37
	Seznam použitých zkratk.....	46

CÍLE PRÁCE

Cílem práce v teoretické části bylo vypracovat literární rešerši o metabolismu a funkci oxidu dusnatého v mikrobiálních buňkách, zejména v oomycetách a houbách, se zaměřením na úlohu S-nitrosylace proteinů jako signálního a regulačního mechanismu.

Experimentální část byla zaměřena na studování přítomnosti S-nitrosoglutathion-reduktasové aktivity (GSNOR) v buňkách rostlinných patogenů. Experimenty se týkaly stanovení aktivity GSNOR v extraktech a imunoreaktivity s protilátkami proti GSNOR metodou Western blot.

1 Úvod

S-nitrosothioly jsou zásobní a transportní formy oxidu dusnatého, které jsou zapojeny do jeho signálních drah. Při fyziologických koncentracích působí S-nitrosothioly jako ochrana buněk proti nitrosativnímu a oxidativnímu stresu (Shahani *et al.*, 2011). Pokud jejich hladina dosáhne patofyziologických hodnot, mohou nitrosativní stres v rostlině způsobovat. Předpokládá se, že jednou z důležitých funkcí S-nitrosothiolů je pozitivní regulace rezistence rostlin proti patogenům. Pokud je rostlina napadena patogenem, dojde ke zvýšené produkci S-nitrosothiolů, čímž rostlina inhibuje růst daného patogenu nebo přímo způsobí jeho smrt (Aratani *et al.*, 1999).

S-nitrosothioly vznikají S-nitrosylací, což je reverzibilní a místně specifická posttranslační modifikace proteinů nebo nízkomolekulárních thiolů, která probíhá bez přítomnosti enzymu jako katalyzátoru. Při této reakci dochází ke vzniku kovalentní vazby mezi –NO skupinou a –SH skupinou cysteinu v proteinu (Hess *et al.*, 2011). K jejich odbourávání dochází pomocí denitrosylace, v jejíž regulaci hraje významnou úlohu enzym S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) (Liu *et al.*, 2001).

S-nitrosoglutathionreduktasa patří do skupiny alkoholdehydrogenas třídy III. GSNOR se podílí na katalýze dvou rozdílných reakcí. První z nich je NAD⁺-dependentní oxidace S-(hydromethyl)glutathionu, který vzniká jako spontánní adukt formaldehydu a glutathionu. Druhá a fyziologicky významnější reakce je NADH-dependentní redukce S-nitrosoglutathionu (GSNO) (Kubienová *et al.*, 2013). Tím že GSNOR reguluje intracelulární hladinu GSNO, ovlivňuje i hladinu celkových S-nitrosothiolů v buňce (Benhar *et al.*, 2009). Dále se také GSNOR podílí na udržování homeostázy oxidu dusnatého a reaktivních forem dusíku v obranné reakci rostlin při působení biotických a abiotických stresových podmínek (Diaz *et al.*, 2003, Rustérucci *et al.*, 2007).

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je velmi reaktivní jednoduchá molekula, která se vyskytuje jak v rostlinných tak i v živočišných buňkách. V tomto buněčném prostředí je obsažen ve formě plynného radikálu s velmi krátkou dobou života. Oxid dusnatý také vykazuje lipofilní povahu, což umožňuje jeho přechod přes membrány a NO tak snadno může procházet okolními buňkami (Kelm, 1999).

2.1.1 Vznik NO

2.1.1.1 Enzymové reakce

V buňkách savců vzniká NO oxidací guanidinového dusíku L-argininu, ke které dochází působením enzymů zvaných NO synthasy (EC 1.14.13.39). Při této reakci vzniká kromě oxidu dusnatého také L-citrulin (Knowles *et al.*, 1994). NO synthasy jsou v živočišných buňkách zastoupeny třemi isoformami: endoteliální a neuronální konstitutivní formy a indukovaná forma, které se liší svou lokalizací v buňce, kinetikou a způsobem aktivace. Všechny tři isoformy potřebují pro svou katalytickou aktivitu kalmodulin, FAD, FMN a tetrahydrobiopterin. (Kavya *et al.*, 2006).

U rostlinných buněk bylo v současnosti popsáno několik enzymů, které se podílejí na syntéze NO. Prvním z nich, který byl jednoznačně určen, byla nitrátreduktasa (EC 1.7.1.1). Primární reakcí tohoto enzymu je redukce dusičnanu na dusitan za přítomnosti kofaktoru NAD(P)H. Bylo zjištěno, že může také docházet k jednoelektronové redukci dusitanu za vzniku NO, ale pouze při určitých podmínkách (Yamasaki *et al.*, 2000). Dalším enzymem, který se podílí na syntéze NO, je nitrit:NO reduktasa (EC 1.7.2.1). Enzym byl lokalizován zatím pouze v plazmatické membráně v kořenových buňkách tabáku, kde společně s ním zde byla také nalezena kořenově-specifická forma nitrátreduktasy (Stohr *et al.*, 2006). Nitrit:NO reduktasa katalycky ovlivňuje reakci, při které dochází k redukci dusitanu na NO. (Stohr *et al.*, 2006). Dále bylo zveřejněno několik publikací o enzymech podobných živočišným NO synthasám (EC 1.14.13.39). Tyto informace však nebyly zcela přesně objasněny a potvrzeny (Guo *et al.*, 2003). V roce 2010 však byla poprvé popsána NO synthasa ve fotosyntetickém organismu a to v zelené řase *Ostreococcus tauri*. NOS z *O. tauri* má 42% identitu s lidskou NOS a 45-49% identitu s NOS z bezobratlých živočichů (Foresi *et al.*, 2010).

Mezi další rostlinné enzymatické systémy, které jsou schopné v *in vitro* podmínkách produkovat NO, patří křenová peroxidasa (EC 1.11.1.9), cytochromy P450, hemoglobiny a katalasa (EC 1.11.1.6) (Boucher *et al.*, 1992).

2.1.1.2 Neenzymové reakce

V rostlinách může NO vznikat také procesy, které nejsou katalyzovány enzymy. K neenzymové produkci NO dochází v apoplastu, kde nízké pH podporuje dismutaci dusitanu za vzniku dusičnanu a NO (Stohr *et al.*, 2002). Oxid dusnatý může být také produkován při chemické redukci kyselinou askorbovou při fyziologických hodnotách pH, jako druhý produkt vzniká kyselina dehydroaskorbová (Yamasaki *et al.*, 2000). Dalším mechanismem je světlem indukovaná přeměna NO₂ na NO, které se účastní jako katalyzátory karotenoidy. K této reakci dochází na membránách chloroplastů (Cooney *et al.*, 1994).

2.1.2 NO jako signální molekula v rostlinách

NO je velmi důležitou signální molekulou. V rostlinách se podílí na změnách hladin druhých posílů, mezi které patří cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) a cyklická adenosindifosfát ribosa (cADPR). Tyto látky se podílí na změnách hladiny cytoplasmatického vápníku. Signální funkce NO působí také přes kovalentní modifikace proteinů, jako jsou např. nitrosylace cysteinu nebo nitrace tyrosinu. NO se také podílí na kontrole exprese mnoha genů, které se podílejí na obranných reakcích, metabolismu, buněčné detoxifikaci, transportu a signalizaci (Parani *et al.*, 2004).

2.1.3 Biologické účinky

V živočišných systémech je aktivita rozpustné guanylátcyklasy (EC.4.6.1.2) stimulována prostřednictvím NO, dochází tak ke kontrole syntézy cGMP, který navozuje vazodilataci pomocí cGMP-dependentní proteinkinasy (EC 2.7.11.12) (Schmidt *et al.*, 1993). NO je také důležitý pro imunitní systém, kde je produkován při nespecifické imunitní odpovědi, např. při napadení organismu některým virem nebo bakterií nebo slouží jako obrana proti nádorům. Dále se podílí i na průběhu fagocytózy a zánětu (Ferenčík *et al.*, 1994). Důležitou roli také hraje NO v kardiovaskulárním systému. Zde se účastní udržování krevního tlaku a tonu cév. Dále se také podílí inhibičním efektem na adhesi a agregaci trombocytů (Moncada *et al.*, 1994). V centrální nervové soustavě NO působí jako buněčný posel. Je také nezbytný pro vývoj mozku, ovlivňuje tvorbu synapsí a podílí se na aktivitě neuronů a výdeji neurotransmiterů (Kupková a Beneš, 2004). Inhalace NO se používá k léčbě

akutních i subakutních plicních hypertenzních stavů, slouží zde jako selektivní plicní vazodilatancium (Hampl *et al.*, 1997).

V rostlinách se NO podílí na kontrole řady fyziologických procesů a obranných odpovědí při stresových podmínkách (tab. 1). Podílí se na růstu a vývoji rostlin, je důležitý při procesech klíčení, kvetení, pohybu průduchů, senescenci a při obranných mechanismech vyvolaných biotickým a abiotickým stresem (Lee *et al.* 2008, Corpas *et al.* 2008 a).

Tabulka 1: Souhrn funkcí NO ve fyziologických a patofyziologických procesech u rostlin (upraveno podle Piterková *et al.*, 2008)

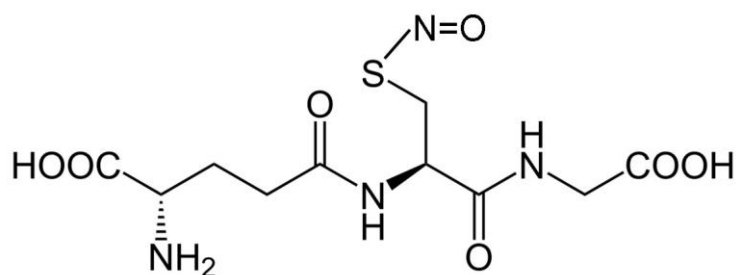
Funkce	
Fyziologické pochody	růst a vývoj klíčení vývoj kořenového systému pohyb svěracích buněk průduchů senescence a programovaná buněčná smrt lignifikace buněčné stěny metabolismus buněčných organel
Funkce v buněčných organelách	
Chloroplasty	biosyntéza chlorofylu, fotofosforylace
Mitochondrie	regulace cytochrom <i>c</i> oxidasy
Peroxisomy	regulace katalasy a askorbátperoxidasy
Cytoplasma	regulace akonitasy
Biotický stres	programovaná buněčná smrt hypersensitivní reakce systémová odezva
Abiotický stres	poranění salinita vysoká teplota sucho těžké kovy

2.2 S-nitrosothioly

Jako S-nitrosothioly (RSNO) se označují molekuly, které mají obecné složení RS-NO, kdy dochází ke vzniku kovalentní vazby NO- skupiny na SH- skupinu proteinového cysteinu nebo nízkomolekulárního thiolu. RSNO mohou fungovat jako zásobní a transportní formy NO, protože jsou stabilnější než NO a mají delší poločas života (Gaston *et al.*, 1999, Handy *et al.*, 2006).

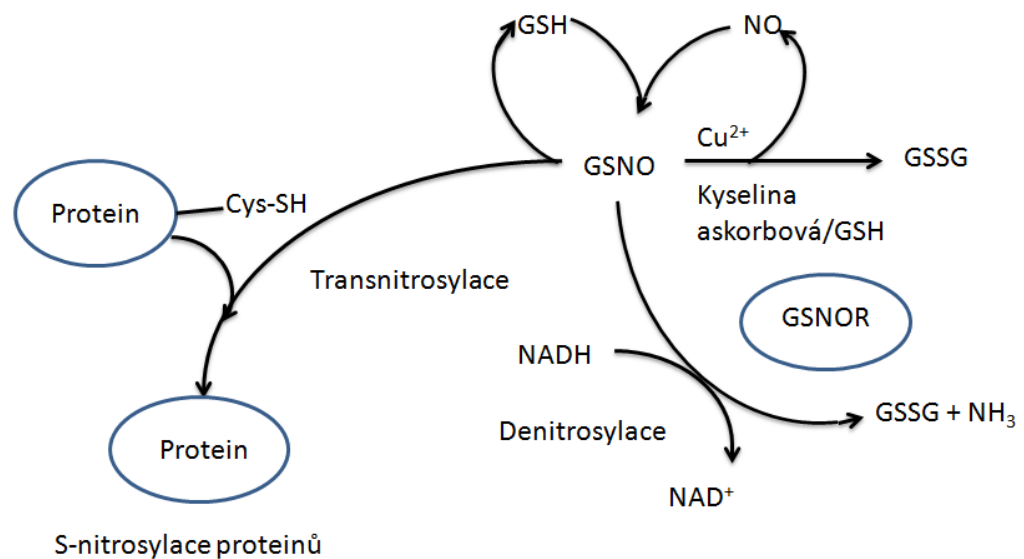
2.2.1 S-nitrosoglutathion

Nejrozšířenější nízkomolekulární sloučenina patřící mezi S-nitrosothioly je tripeptid S-nitrosoglutathion (GSNO). Je to derivát glutathionu, který je systematicky nazýván 2S-2-amino-5-[[2R-1-(karboxymethylamino)-3-nitrososulfanyl-1-oxopropan-2-yl]amino]-5-oxopentanová kyselina. GSNO může vznikat reakcí glutathionu tvořený s reaktivními formami dusíku.



Obr. 1 S-nitrosoglutathion. Jedná se o tripeptid, který obsahuje cystein s thiolovou skupinou, která podléhá S-nitrosylaci.

V rostlinných organismech se RSNO podílejí na ochraně buňky proti nitrosativnímu a oxidativnímu stresu, hladiny těchto RNSO musí být ve fyziologických koncentracích. Na obr. 2 je schematicky navržený model metabolismu GSNO, který se nachází v rostlinných buňkách, a jeho regulace pomocí enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) (Leterrier *et al.*, 2011).



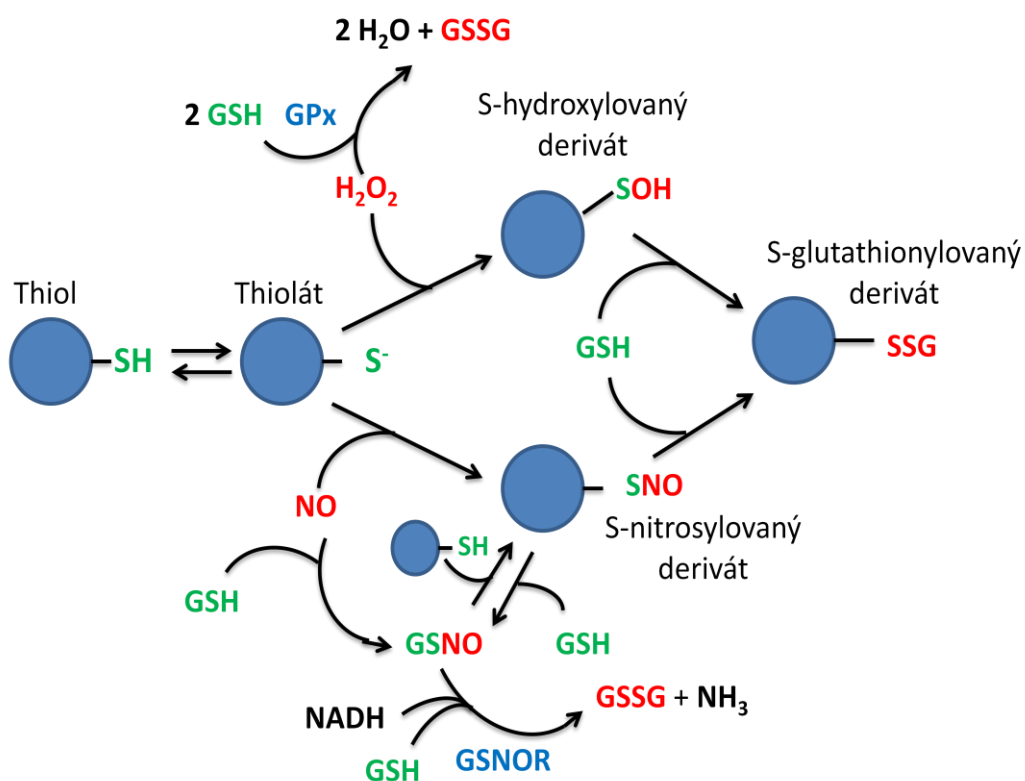
Obr. 2 Schéma metabolismu GSNO v rostlinných buňkách a jeho regulace pomocí GSNOR (upraveno podle Leterrier *et al.*, 2011). Redukovaný glutathion (GSH) reaguje za přítomnosti kyslíku s oxidem dusnatým, produktem této reakce je S-nitrosoglutathion. Působením GSNOR dochází k denitrosylaci za přítomnosti NADH jako kofaktoru, vzniká oxidovaný glutathion (GSSG) a amoniak (NH₃). Může také dojít k přeměně GSNO na GSSG, a to za přítomnosti redukčních činidel, mezi které patří GSH, askorbát a Cu⁺. Na druhou stranu, se může GSNO účastnit posttranslačních modifikací, které ovlivňují široké spektrum proteinů. Tuto modifikaci představuje tzv. S-nitrosylace, kdy se pomocí transnitrosylace přenáší NO-skupina na cysteinové thiohy.

2.2.2 S-nitrosylace

S-nitrosylace je jednou z nejdůležitějších posttranslačních modifikací proteinů. Patří mezi redoxní signální dráhy, které jsou postavené na redoxních změnách zúčastněných molekul. Jedná se o reverzibilní kovalentní vazbu –NO skupiny nitrosylačního činidla a –SH skupiny cysteinu v daném proteinu bez přítomnosti enzymového katalyzátoru. S-nitrosylace je podobně jako glykosylace nebo fosforylace místně specifická, i když u S-nitrosylace specifčnost reakce není závislá na rozpoznání cílové struktury enzymem. Místo toho využívá chemickou reaktivitu mezi nitrosylačním činidlem a cílem (Martinez *et al.*, 2004). Existuje několik faktorů, které tuto vazbu ovlivňují:

- reaktivita cílového proteinového rezidua: ukázalo se, že ne všechny volné cysteiny v proteinech jsou nitrosylovány. Mezi častější cíle S-nitrosylace patří více ionizovatelné cysteiny a cysteiny, které se nachází v hydrofóbním prostředí (Nathan *et al.*, 2003), dále mohou S-nitrosylaci ovlivnit hodnoty K_a různých cysteinů v proteinu (Arnelle *et al.* 1995).

- b) koncentrace nitrosylačního činidla a proteinu: u tohoto faktoru záleží zejména na produkci NO a s ním souvisejících reaktivních forem dusíku (Schmidt *et al.*, 1996), závisí také na rozložení lokálních koncentrací biochemických činidel (Mannick *et al.*, 2002). Dále je ještě ovlivněn stabilitou vazby, která je značně labilní, a k jejímu štěpení může dojít i bez přítomnosti specifických enzymů (Gaston *et al.*, 1999).



Obr. 3 Vratné modifikace proteinových thiolů (upraveno podle Cardaci *et al.*, 2012). Thioly mohou v určitém chemickém prostředí existovat v deprotonizované formě. V této thiolátové formě mohou snadno reagovat s NO nebo peroxidem vodíku. Touto reakcí vzniká buď S-nitrosylovaný nebo S-hydroxylovaný derivát. Vzniklé oxidované deriváty nejsou příliš stabilní a snadno reagují s redukováným GSH nebo s jinými thioley, kdy se vytvoří disulfidický můstek a více stabilní S-glutathionylovaný adukt. Peroxid vodíku může také reagovat s GSH ihned za přítomnosti glutathionperoxidasy (GPx, EC 1.11.1.9), kdy vzniká glutathion disulfid. NO spontánně reaguje s GSH za vzniku S-nitrosoglutathionu, který je v rovnováze s ostatními RSNO a je za přítomnosti GSNOR a NADH redukován na NH₃ a GSSG

2.2.3 Mechanismus S-nitrosylace

První popsanou modifikací –SH skupiny pomocí -NO byla v roce 1992 S-nitrosylace albuminu (Stamler *et al.*, 1992). Od tohoto objevu byla zkoumána v řadě biologických systémů. Bylo nalezeno mnoho mechanismů S-nitrosylace, dosud se však nepodařilo jednoznačně prokázat, který z nich převládá *in vivo*.

Prvním z nich je reakce s oxidanty, např. s kyslíkem nebo superoxidovým aniontem (O_2^-), která vede k vytvoření vyšších oxidů dusíku, z nichž je nejtypičtějším nitrosylačním činidlem N_2O_3 (Wink *et al.*, 1993, Hogg *et al.*, 2002). Tato reakce bude upřednostňována v membránovém prostředí, kde se vyskytuje vyšší koncentrace NO a kyslíku (Liu *et al.*, 1998). N_2O_3 může být částečně disociován na NO^+ a NO_2^- , kdy NO^+ reaguje s nukleofilním atomem síry (Arnelle *et al.*, 1995). Toto lze popsat rovnicemi:

1. $2 NO + O_2 \longrightarrow 2 NO_2$
2. $NO_2 + NO \longrightarrow N_2O_3$
3. $N_2O_3 + H_2O \longrightarrow 2HNO_2$
4. $N_2O_3 + RSH \longrightarrow RS-NO + HNO_2$

První a druhý krok této reakce, tedy tvorba oxidu dusičitého a následně oxidu dusitého, jsou kroky limitující rychlost S-nitrosylace. Syntéze S-nitrosothiolů (Reakce 4) konkuruje hydrolyzá N_2O_3 (Reakce 3). Kharitonov a spol. studií *in vitro* dokázali, že při fyziologických koncentracích redukováného glutathionu, které jsou v řádech milimolů, je téměř všechen N_2O_3 zreagovaný s GSH za vzniku GSNO (Kharitonov *et al.*, 1995).

Druhý popsaný mechanismus popisuje vznik RSNO, jako reakci nitrosoniového kationtu (NO^+) s thiolem (Lancaster *et al.*, 2008). RSNO mohou *in vivo* také vznikat reakcí peroxodisitanu s thiolem (Lancaster *et al.*, 2008, Handy *et al.*, 2006).

Další možný mechanismus popsal Gow *et al.* Při této reakci NO reaguje přímo s thiolem za přítomnosti radikálového meziprojektu (Reakce 5). Tento meziprojekt může být přeměněn na RSNO za přítomnosti akceptoru elektronů (Reakce 6) (Gow *et al.*, 1997).

5. $RSH + \cdot NO \longrightarrow RS - \cdot N - O - H$
6. $RS - \cdot N - O - H + O_2 \longrightarrow RS - NO + O_2 \cdot$

2.2.4 Stabilita a katabolismus SNO

RSNO jsou výbornými donory NO, protože vazba S-NO je značně polarizovaná a málo stabilní, takže mohou snadno uvolňovat NO, čímž přispívají k transnitrosačním reakcím a S-thiolaci (Shahani *et al.*, 2011, Ignarro *et al.*, 1999).

Stabilita RSNO je ovlivněna množstvím prvků, jako je teplota, světlo, kationty přechodných kovů, pH a přítomnost kyslíku (Jahnová *et al.*, 2013). Rozštěpení vazby může být homolytické nebo heterolytické. Za fyziologických podmínek je více

významné právě homolytické štěpení a to z toho důvodu, že se jedná o dráhu s nejnižší energií.

Homolytickému štěpení podléhají RSNO při působení světla, kdy vznikají NO[•] a RS[•] radikály (Singh *et al.*, 1996). Na rozpadu vazby se také podílí řada kationtů přechodných kovů, např. Cu⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Cr³⁺. V případě Cu⁺ je možné rozkladu RSNO zabránit přidáním chelatačních činidel. Nejčastěji se používá kyselina ethylendiamintetraoctová nebo neokuproin (Singh *et al.*, 1996). Na druhou stranu, rozkladu RSNO pomocí rtuťnatých iontů se využívá pro spektrofotometrické stanovení S-nitrosothiolů Savillovou metodou.

K rozkladu RSNO také dochází v cytoplazmě přítomnými redukčními činidly. Aby k tomuto odbourávání nedocházelo, jsou RSNO chráněny váčky, buněčnými membránami nebo mohou být obalené hydrofóbními částmi molekul (Rafikova *et al.*, 2002).

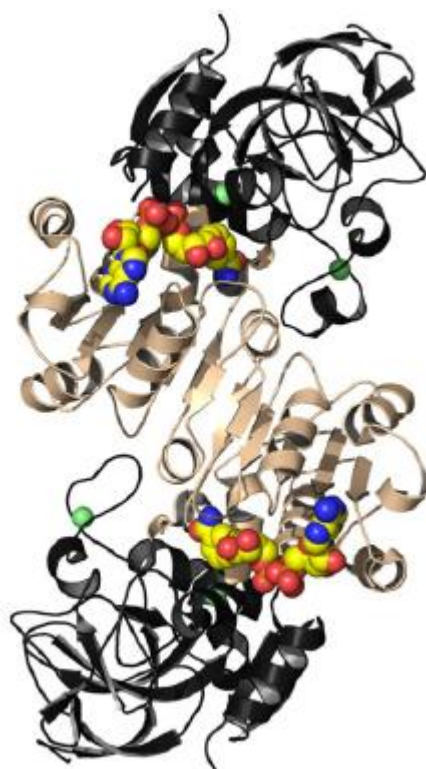
Dalším mechanismem regulace hladiny RSNO je působení specifických enzymů. Hlavní enzym podílející se nepřímo na udržování hladiny RSNO je S-nitrosoglutathionreduktasa. Hlavním substrátem tohoto enzymu je GSNO, čímž nepřímo ovlivňuje koncentraci ostatních RSNO. Druhý systém, který se podílí na katabolismu RSNO, se skládá z thioredoxinu (Trx), thioredoxinreduktasy (TrxR, EC 1.8.1.9) a NADPH (Holmgren, 2000). Trx působí jako redukční činidlo a pomocí svou thiolů ve své molekule denitrosyluje S-nitrosothiolovaný protein za vzniku redukovaného proteinového thiolu (-SH) a sám se oxiduje. Oxidovaný Trx je převeden zpět do výchozího stavu selenoflavoproteinem thioredoxinreduktasou (TrxR) a NADPH (Benhar *et al.*, 2009). Mezi další enzymové systémy podílející se na katabolismu S-nitrosothiolů patří xanthin/xanthinoxidasa (EC 1.17.3.2), 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).

2.3 S-nitrosoglutathionreduktasa

S-nitrosoglutathionreduktasa patří do rodiny zinek-dependentních alkoholehydrogenas třídy III (ADH III, EC 1.1.1., Staab *et al.*, 2008). Systematickým názvem je označována jako S-(hydroxymethyl)glutathion : NAD⁺ oxidoreduktasa (EC 1.1.1.284). Dřívější název enzymu byl glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH, EC 1.2.1.1.) (Koivusalo *et al.*, 1989).

2.3.1 Struktura GSNOR

GSNOR podobně jako ostatní enzymy patřící do rodiny alkoholdehydrogenas je homodimer, Každý 40 kDa monomer se skládá z velké katalytické domény a menší domény, na kterou se váže koenzym. Dále každá podjednotka obsahuje dva atomy zinku, z nichž jeden působí jako Lewisova kyselina a tím je zapojen do katalýzy, druhý působí jako strukturní prvek. V třídě III ADH je katalytický zinek vázán pomocí Cys 177, Cys 47, His 69 a hydroxylové skupiny vody. Obě vazebná místa pro substrát se nachází ve velké štěrbině mezi katalytickými doménami a doménami vázající kofaktor. Vstupy do těchto aktivních míst jsou lokalizovány na stejné straně dimeru, zatímco místa vázající koenzym jsou na opačných stranách dimeru. Monomery jsou dohromady spojeny dvanácti vláknovým pseudokontinuálním β -skládaným listem, který je tvořen šesti β -skládanými listy každé domény vázající kofaktor (Kubienová *et al.*, 2013).



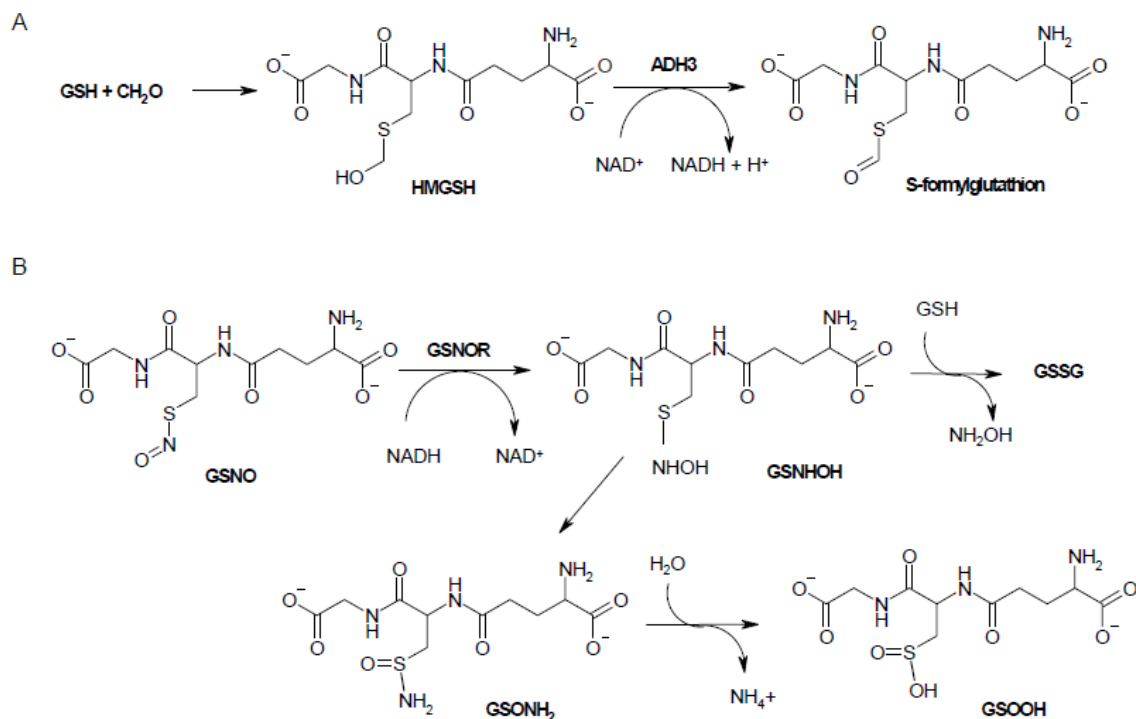
Obr. 4 Krystalová struktura rostlinné GSNOR z *Solanum lycopersicum*. Struktura GSNOR v přítomnosti koenzymu NAD^+ . Katalytická doména je vyznačena černě a doména vázající koenzym je světle hnědá. Koenzym NAD^+ (v atom-kódujících barvách) a zinek (zelený) jsou zobrazeny jako koule (Převzato z Kubienová *et al.*, 2013).

2.3.2 Substrátová specifita

GSNOR je schopna katalyzovat dva typy reakcí. První popsanou reakcí byla oxidace S-(hydroxymethyl)glutathionu, což je samovolně vznikající adukt formaldehydu a glutathionu. K dehydrogenační reakci dochází za přítomnosti NAD^+ jako kofaktoru. Tímto mechanismem je GSNOR zapojena do detoxifikace formaldehydu v organismech. Mezi další substráty, které GSNOR oxiduje, patří alkoholy s delším řetězcem a ω -hydroxymastné kyseliny, jako jsou například kyseliny 8-hydroxy-, 10-hydroxy- nebo 12-hydroxydodekanová. Aby alkoholy mohly být efektivně oxidovány, musí být delší než 4 uhlíky. Do skupiny alkoholů, které jsou oxidovány pomocí GSNOR, náleží cinnamylalkohol, farnesol, geraniol a dále alifatické alkoholy jako nonanol a oktanol (Kubienová *et al.*, 2013).

Pozdější výzkumy prokázaly, že fyziologicky významnější reakcí enzymu je redukce GSNO, která vede k produkci oxidovaného glutathionu a amoniaku. V tomto módu slouží jako kofaktor NADH. GSNOR touto reakcí reguluje množství celkových S-nitrosothiolů a zapojuje se takto do metabolismu NO a reaktivních forem dusíku (Benhar *at al.*, 2009). N-hydroxysulfinamid (GSNHOH) vzniklý redukcí GSNO je náchylný k nukleofilnímu ataku GSH, který vede k tvorbě hydroxylaminu a glutathiondisulfidu. K této reakci dochází za předpokladu, že GSH je v nadbytku, při jeho nízké koncentraci se GSNHOH samovolně přemění na glutathionsulfinamid, který je dále hydrolyzován na kyselinu glutathionsulfinovou a amoniak (Obr. 5) (Jensen *et al.*, 1998).

Rychlost reakcí, které GSNOR katalyzuje, závisí také na pH prostředí. Nejrychlejší oxidace substrátu probíhá při pH 10, zatímco při pH 8 funguje enzym přednostně jako reduktasa. Celkově však platí, že katalytická účinnost redukce GSNO je 15-20 krát vyšší než oxidace HMGS, z čehož vyplývá, že enzym přednostně funguje jako GSNO reduktasa (Kubienová *et al.*, 2013).



Obr. 5 Reakce katalyzované GSNOR (převzato z Kubienová *et al.*, 2013). (A) Oxidace HMGSH na S-formylglutathion, (B) redukce GSNO za přítomnosti NADH za vzniku N-hydroxysulfinamidu (GSNHOH).

2.3.3 Funkce a význam GSNOR a SNO

GSNOR reguluje homeostázu buněčného GSNO. Funkce tohoto enzymu je zachována jak u živočichů, tak i u rostlin a bakterií.

2.3.3.1 Úloha GSNOR a SNO u živočichů

Skupina enzymů ADH3 je evolučně zachována od bakterií, přes rostliny až po obratlovce, je tedy prekurzorem rodiny ADH (Liu *et al.*, 2001, Freechan *et al.*, 2005)

GSNO fungují v živočišných systémech jako signální dráha NO mezavislá na cGMP, která se podílí na kontrole širokého spektra buněčných proteinů a na jejich funkci. Tato signální dráha je zprostředkována S-nitrosylací cysteinového rezidua. Dochází tedy ke změně receptoru, který je spojen s G-proteinem, dále dochází k regulaci aktivity transkripčních faktorů a k degradaci proteinu p53 (Hess *et al.*, 2005). Bylo prokázáno, že k mnoha onemocněním centrálního nervového systému, kardiovaskulárního systému a k plicním chorobám dochází z důvodu poruch regulace signalizace SNO (Gaston *et al.*, 2006). Z experimentálně dokázaných dat, která ukazují, že k porušení homeostázy S-nitrosothiolů dochází v souvislosti se zapojením GSNOR

do metabolismu formaldehydu (Staab *et al.*, 2008), je zřejmé, že distribuce, regulace a ontogeneze ADH3 bude mít významný vliv na metabolismus endogenního i exogenního formaldehydu, stejně jako to bude mít dopad na regulaci a změnu signálních drah NO.

Účinná forma vitamínu A, all-trans retinol, se pokládá za další fyziologický substrát myši GSNOR. Oxidace retinolu za přítomnosti ADH3 byla zkoumána na enzymu, který byl izolován z myších jater. Při tomto *in vitro* experimentu bylo odhaleno, že oxidace all-trans retinolu pomocí ADH3 byla velmi nízká v porovnání s mnohem efektivnějšími enzymy, mezi které patří ADH1 a ADH4. Přesto však došlo k výraznému poklesu hladiny kyseliny all-trans retinové v séru myši, které byly ADH3 deficientní, to potvrdilo významnou účast ADH3 na tvorbě kyseliny retinové *in vivo*. V tomto případě je zajímavé, že nízká účinnost ADH3 je kompenzována stejnou lokalizací ADH3 a retinaldehydrogenasy (EC 1.2.1.36). Jelikož je ADH3 všudypřítomně exprimována, je pravděpodobné, že se vyskytuje více fyziologicky důležitých substrátů s vysokými hodnotami K_M (Staab *et al.*, 2008).

Studie zabývající se distribucí GSNOR v savčích tkáních prokázaly, že ADH3 jako jediná třída ADH enzymů se nachází jak v hlodavčí tak i lidské mozkové tkáni a jejich distribuce jsou si velmi podobné. Lokalizace GSNOR na subcelulární úrovni je v cytosolu a jádře několika druhů buněk (Keller *et al.*, 1990; Iborra *et al.*, 1992; Fernandez *et al.*, 2003). Nejvýznamnější aktivita GSNOR v lidském těle byla nalezena v plicích, játrech, ledvinách a v mozku. Aktivita GSNOR se v průběhu života člověka mění, po narození je velmi nízká, pak začíná narůstat a v průběhu dětství dosahuje maxima a s narůstajícím věkem opět klesá. Bylo dokázáno, že novorozenci a děti absorbují v plicích vyšší množství reaktivních plynů. Jelikož většina enzymových systémů není u kojenců plně vyvinuta, tak se nejvyšší aktivita ADH3 nachází v průběhu dětství a může převýšit i hladinu enzymů u dospělých (Thompson *et al.*, 2009).

U živočichů plní S-nitrosothioly funkci vasodilatátorů a mají také protisrážlivý účinek, i když obě tyto funkce jsou pravděpodobně způsobeny uvolňovaným oxidem dusnatým. S-nitrosothioly se také podílí na ochraně proti buněčné toxicitě, která je spojená s oxidativním stresem (Hogg *et al.*, 2000). Principem tohoto mechanismu je interakce radikál-radikál, během které dochází k terminaci volných radikálů a uvolnění NO. Tento proces byl popsán v buňkách krysího střevního epitelu, kde dochází k oxidaci polynenasycených mastných kyselin. V tomto experimentu bylo dokázáno, že GSNO i S-nitroso-N-acetyl-DL-penicilaminu (SNAP) mají ochrannou funkci

(Chamulitrat, 1998). SNAP a GSNO se dále podílejí na zvyšování propustnosti plicního epitelu prostřednictvím reakce s oxidanty a chrání také buňky endotelu proti toxickým účinkům oxidovaných lipoproteinů s nízkou hustotou.

S-nitrosothioly mohou mít potenciálně klinické využití, ale mnoho z nich nebylo stále dostatečně otestováno. U NO bylo zjištěno, že může inhibovat agregaci trombocytů GC-dependentním mechanismem. Také u GSNO bylo prokázáno, že dokáže inhibovat agregaci lidských krevních destiček a neovlivňuje přitom krevní tonus (Hogg, 2000), proto mají S-nitrosothioly nejvíce slibnou klinické využití právě jako antiagregační činidla.

2.3.3.2 Úloha GSNOR a SNO u rostlin

Pro normální růst rostlin je velmi důležitý buněčný redoxní stav, vývojové interakce a interakce s prostředím. GSNOR hraje důležitou roli při regulaci nitrosativního stresu, který je spojen se zvýšenou hladinou nitrovaných proteinů (Liu *et al.*, 2001, Foster *et al.*, 2009, Feechan *et al.*, 2005). Dále mají na růst rostlin zásadní vliv i odchylky v GSNOR aktivitě, které mohou v důsledku ovlivnit různé buněčné aktivity (Malik *et al.*, 2011). Rostliny s mutací, která vedla ke ztrátě funkce GSNOR, vykazovaly sníženou aktivitu schopnosti odbourávat GSNO, čím se zvyšovaly jeho hladiny, ale i hladiny celkových S-nitrosylovaných proteinů (Freechan *et al.*, 2005).

GSNOR byla poprvé popsána v rostlinách hrachu jako GSH-dependentní formaldehyddehydrogenasa (Uotila a Koivusalo, 1979). Přesněji charakterizována pak byla v *Arabidopsis thaliana*. Aktivita tohoto enzymu je kódována genem (*AtGSNOR1*), který se nachází v genomu pouze v jedné kopii (Martinez *et al.*, 1996). GSNOR se vyskytuje ve všech rostlinných orgánech a vykazuje podobné kinetické a molekulární vlastnosti jako savčí GSNOR (Freechan *et al.*, 2005, Rusterucci *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2008, Kubienová *et al.*, 2013).

Z řady publikovaných výsledků vyplývá, že GSNOR se významně podílí na mechanismech rostlinné odpovědi na abiotické stresové faktory. Kyselina salicylová (SA), která působí jako silný imunitní aktivátor v rostlinách, také ovlivňuje expresi genu *AtGSNOR* (Diaz *et al.*, 2003). Ukázalo se, že *AtGSNOR* reguluje SA signalizaci i SA syntézu, čímž se podílí nejméně na dvou kontrolních bodech signální dráhy SA (Malik *et al.*, 2011). Naopak při mechanickém poškození rostliny dochází k velmi výraznému snížení aktivity i exprese GSNOR, jak bylo dokázáno na rostlinách slunečnice (Chaki *et al.*, 2011).

Pomocí rostlin *Arabidopsis thaliana* s defektním genem pro GSNOR bylo dokázáno, že se tento enzym podílí i na mechanismu termotolerance rostlin a že je nezbytný pro aklimatizaci na vysoké teploty. Tito mutanti vykazovali sníženou odolnost na stres způsobený zvýšenou teplotou, která narušila homeostázu buněčných S-nitrosothiolů, jež vedla k narušení signálních drah reaktivních forem dusíku (Lee et al., 2008). Na druhou stranu, snížená teplota způsobila u rostlin hrachu nárůst aktivity GSNOR, která byla doprovázená i indukcí aktivity NO synthasy. Indukce NO synthasy vedla k významnému nárůstu celkových S-nitrosothiolů, které působí jako markery nitrosativního stresu (Corpas et al., 2008 b).

Vliv abiotického stresu na roli GSNOR v obranné reakci rostlin byl také studován v práci Kubienová et al. (2014), kde byly jako modelové rostliny použity dva typy rostlin *Pisum sativum* a *Cucumis* spp. Abiotický stres byl vyvolán zvýšenou nebo sníženou teplotou, mechanickým poškozením nebo světelným stresem. Z experimentů vyplynulo, že aktivita GSNOR vzrostla během všech druhů stresů, přičemž nárůst aktivity závisel na typu rostliny a její části, kde se aktivita stanovovala (Kubienová et al., 2014).

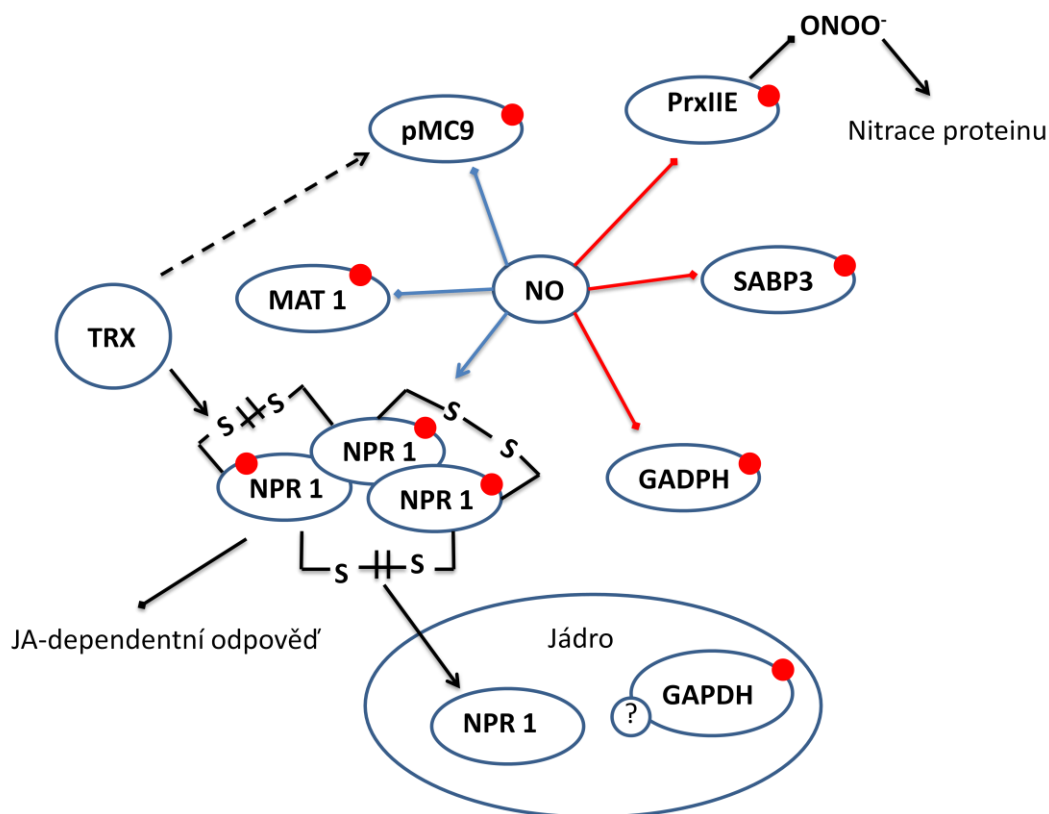
Na základě experimentálně získaných dat byl vytvořen hypotetický model, ve kterém NO a GSNO vystupují jako pozitivní regulátory rostlinné rezistence a jsou zodpovědné za hypersenzitivní odpovědi a aktivaci obranných genů. Snížením hladiny GSNOR a současným zvýšením koncentrace intracelulárních RSNO dochází ke zvyšování odolnosti rostlin (Rustérucci et al., 2007). Lze tedy předpokládat, že ke změnám obranných reakcí rostlin při napadení patogeny dochází vlivem změn koncentrace RSNO *in vivo* prostřednictvím katabolismu GSNO zprostředkovaného GSNOR aktivitou.

Bylo zjištěno, že subcelulární lokalizace a transkripční ko-aktivita NPR1 (*nonexpressor of pathogenesis-related proteins 1*), hlavního proteinu v procesu systémově získané rezistence (SAR) je kontrolována pomocí S-nitrosylace. Oligomery NPR1 se nacházejí v cytoplazmě a jsou udržovány pohromadě pomocí intramolekulárních disulfidových můstků. Oligomerace je usnadněna právě S-nitrosylací, kdežto thioredoxiny napomáhají uvolnění monomerů, odštěpení monomerů také podporuje kyselina salicylová (Tada et al., 2008). Protein NPR1 nezpůsobuje pouze aktivaci exprese genů zajišťujících obranu, ale také přispívá k supresi odpovědí závislých na jasmonátu v cytoplazmě dosud však neznámým způsobem. S-nitrosylace však v tomto případě může také podporovat negativní vztahy

mezi signálními drahami kyseliny jasmonové (JA) a kyseliny salicylové (SA). Enzym podílející se na biosyntéze JA, allenoxidcyklasa (EC 5.3.99.6), je během hypersenzitivní odpovědi rostlin S-nitrosylován, což ukazuje další možný způsob regulace hladiny oxylipinů. S-nitrosylace proteinu SABP3 (*salicylic acid binding protein*) způsobuje ztrátu vazebné aktivity pro SA a také vede k inhibici karbonátanhydrasy (EC 4.2.1.1). Na biosyntéze ethylenu se podílí methioninadenosyltransferasa 1 (MAT1, EC 2.5.1.6), jejíž modifikace pomocí S-nitrosylace vede k inhibici biosyntézy ethylenu (Lindemayr *et al.*, 2005).

Bylo popsáno, že intracelulární hladina NO ovlivňuje apoptosu. Dostupnost NO, typ buněk a řada dalších faktorů rozhoduje o tom, zda NO bude buňku před buněčnou smrtí chránit nebo zda bude apoptosu iniciovat. Jedním z mechanismů anti-apoptického účinku je S-nitrosylace klíčového cysteinového zbytku, který je lokalizován v aktivním místě všech isoform kaspas. Bylo publikováno, že S-nitrosylace prometakaspasy 9 při fyziologických podmínkách způsobí její autoproteolytickou aktivitu u *Arabidopsis thaliana*. S-nitrosylace také u *Arabidopsis thaliana* způsobuje inaktivaci cytoplasmatické glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy (GAPDH, EC 1.2.1.9), která je translokována do jádra. Jak je vidět, může se S-nitrosylace významně podílet na regulaci buněčné smrti (Belenghi *et al.*, 2007).

Byla popsána inhibice aktivity peroxyredoxinu II E (PrxIII) pomocí S-nitrosylace u *Arabidopsis thaliana*. Protein PrxIII hraje klíčovou roli v detoxifikaci peroxydusitanu (Sakamoto *et al.*, 2003). Jeho inhibicí dojde ke zvýšení hladiny peroxydusitanu prostřednictvím reakce NO se superoxidem. Peroxydusitan specificky nitruje tyrosinová rezidua v proteinech, které působí jako modulátory signalizace při obraných reakcích rostlin. S-nitrosylace tedy ovlivňuje klíčové společné body ROS- a NO-dependentních signálních drah v odpovědi na stresové faktory prostřednictvím deaktivace důležitých buněčných antioxidačních systémů (Gaupels *et al.*, 2012).



Obr. 6 Charakteristické cíle S-nitrosylace proteinů u rostlin (upraveno podle Leitner *et al.*, 2009). S-nitrosylace probíhající za fyziologických podmínek (modré šipky) pravděpodobně inhibuje MAT1 a pMC9, napomáhá vzniku oligomeru NPR1. Indukce tvorby NO při obranné reakci, která je vyvolaná stresovým podnětem (červené šipky) vede k S-nitrosylaci GAPDH, SABP3 a PrxIIIE. Aktivita GAPDH je inhibována S-nitrosylací a protein je přemístěn do jádra. S-nitrosylace SABP3 způsobuje ztrátu SA-vazebné kapacity a také vede k inhibici aktivity karbonátanhydrasy. Rovněž PrxIIIE aktivita je omezena, což způsobuje zvýšenou produkci peroxydisitanu a nitrovaných proteinů. Při indukci tvorby NO také thioredoxin (TRX) působí proti NPR1, dochází k uvolnění monomeru a přesunu do jádra. Přerušované čáry značí hypotetické interakce, S-nitrosylace je symbolizována červenými kuličkami.

Byl proveden genetický screening rozsáhlých T-DNA inserčních populací, který sloužil k identifikaci mutantů rýže s narušenou homeostázou RSNO prostřednictvím Savill-Griessovy metody (Ma *et al.*, 2009). Pokus byl proveden z důvodu objasnění možné role S-nitrosylace v průběhu buněčné smrti listů rýže a k určení odpovídajících S-nitrosylovaných proteinů. Při této práci byl nalezen mutant *noe1* (*nitric oxide excess 1*), u kterého byla nalezena vyšší hladina RSNO resp. NO v porovnání s divokým typem (WT). Když došlo k přenosu 10-denních mutantů *noe1*, které byly pěstovány za nízké intenzity osvětlení, do podmínek s vysokou intenzitou osvětlení, jejich listy charakteristicky vybledly hned 2. den a v 5. den došlo k buněčné smrti. Pomocí pozičního klonování bylo zjištěno, že tento gen kóduje katalasu

(AsCATC), která je ortologní k AtCAT2. Při apoptose listu *noe1*, jež byla indukovaná světlem, byla odhalena vyšší aktivita nitrátreduktasy produkující NO a také zvýšená hladina peroxidu vodíku v listech *noe1* i v jeho buněčných suspenzních kulturách. Snížení buněčné smrti v suspenzních kulturách a listech mutanta *noe1* bylo způsobeno působením PTIO (2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl 3-oxid), který přebytečný NO odstraní. NO se tedy ukázal jako nepostradatelný zprostředkovatel H₂O₂-indukované buněčné smrti. Buněčnou smrt v listech tohoto mutanta také zmírnilo snížení hladiny RSNO, které bylo způsobeno overexpresí GSNOR. Při světlem indukované buněčné smrti byly detekovány S-nitrosylované proteiny prostřednictvím proteomických přístupů u WT i u *noe1*, ale pouze u mutanta byly objeveny S-nitrosylované GAPDH a thioredoxin, které se u živočichů podílí na S-nitrosylaci regulované buněčné smrti (Lin *et al.*, 2012).

Camejo *et al.* studovali S-nitrosylované proteiny, které byly izolovány z mitochondrií hrachu při působení salinitního stresu. Výsledky naznačovaly, že rostliny vystavené 150 mM NaCl po dobu 14 dní vykazovaly minimální počet S-nitrosylovaných proteinů, mezi které patřily β -podjednotka ATP synthasy (EC 2.3.3.8), peroxiredoxin a heat shock protein 90. Také poměr NADH/NAD⁺ byl vyšší. Konfokální mikroskopii a fluorimetricky byla naměřena vyšší produkce NO v listech. Pravděpodobně v důsledku dlouhodobého vystavení salinitnímu stresu byla také významně zvýšena aktivita GSNOR. Dále také byl detekován zvýšený obsah nitrovaných proteinů. Výsledky ukazují, že posttranslační modifikace mohou upravovat respirační i fotorespirační dráhy, také i některé antioxidační enzymy, které mají rozdílnou S-nitrosylaci/denitrosylaci za fyziologických podmínek a také při působení salinitního stresu (Camejo *et al.*, 2013).

2.3.3.3 Úloha GSNOR a SNO u hub

Prvním popsáním enzymem, který vykazoval GSNOR aktivitu v houbách, byla glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (EC 1.1.1.284) izolovaná z outkovky kafrové (*Antrodia camphorata* (Ac-GFD)). Jedná se o vzácnou houbu z čeledě chorošovitých a řádu chorošotvarých, hojně využívanou v lidovém léčitelství na Tajvanu. Tento enzym vykazuje tedy dvojí aktivitu a to jak GFD tak i GSNOR. Předpokládá se, že se tento enzym podílí na detoxifikaci formaldehydu i v obraně proti nitrosativnímu stresu (Huang *et al.*, 2009).

V roce 2002 byla provedena studie, která se zabývala zapojením GFD v metabolismu methylotrofních kvasinek *Candida boidinii*. Methanol používaný jako jediný zdroj uhlíku a energie byl oxidován za přítomnosti formaldehydalkoholoxidasou (EC 1.1.3.13) lokalizované v peroxizomech. Pomocí desimilační dráhy je vzniklý formaldehyd neenzymatickými reakcemi převeden na S-hydroxymethylglutathion, který je transportován z peroxizomů do cytosolu, kde slouží jako substrát pro GFD, která jej přeměňuje na S-formylglutathion. Tento produkt je pak dále hydrolyzován za tvorby glutathionu a mravenčanu enzymem S-formylglutathionhydrolasou (EC 3.1.2.12). Nakonec je formyl přeměněn na oxid uhličitý formyldehydrogenasou (FDH). Během této oxidační dráhy dochází k tvorbě NADH, který je generován během dvou reakcí katalyzovaných GFD a FDH. Předpokládá se, že vzniklé molekuly NADH jsou klíčovým zdrojem energie při růstu na methanolu (Lee *et al.*, 2002).

GFD izolovaná ze *S. cerevisiae* se vyznačuje velkou shodou sekvenční identity (63%) s lidským enzymem, avšak tyto enzymy se liší kinetickými parametry (Fernandez *et al.*, 1995; Holmquist a Vallee, 1991). U enzymu ze *S. cerevisiae* jsou mnohonásobně vyšší hodnoty K_M a K_{cat} než u lidské GFD. Celkově hodnoty K_M pro S-HMGS, jako substrát, jsou vyšší pro všechny známé kvasinkové a bakteriální GFD (Uotila a Koivusalo, 1989; Allais *et al.*, 1983) než u enzymů z rostlin a živočichů (Koivusalo *et al.*, 1989; Holmquist a Vallee, 1991; Shafqat *et al.*, 1996). Bylo zjištěno, že rezidua podílející se na vazbě substrátu jsou zachována jak u lidské GFD tak i u kvasinek. Změna se nachází ve vazebném místě koenzymu, kde Ile-269 z lidského enzymu je nahrazen Thr-269 a další změnou je Asp-267, který je v lidské GFD zastoupen Glu-267. Tyto změny v reziduiích 269 a 267 jsou zodpovědné za změny interakcí ve vazebném místě a proto jsou pravděpodobně hodnoty K_M a K_{cat} u kvasinek vyšší. Dále vyplývá, že GFD není esenciální enzym pro život *S. cerevisiae* v laboratorních podmínkách, avšak v jejich přirozeném prostředí se nachází vyšší koncentrace formaldehydu, a proto vyšší kinetické parametry zvyšují odolnost *S. cerevisiae* proti toxickému formaldehydu (Fernandez *et al.*, 1999).

Norin *et al.* studovali vlastnosti a strukturní vztahy ADH enzymu z *Agaricus bisporus* (pečárka dvouvýtrusá). Výsledky ukazují přítomnost jedné hlavní ADH sady tří dimerů, a každý z nich má vlastní specifickou aktivitu kolem 32 U/mg pro formaldehyd/glutathion jako substrát. Byla stanovena také primární struktura ukazující nativní polypeptidovou podjednotku z 378 reziduí. Ze získané primární struktury byla

stanovena trojrozměrná struktura, podle níž byl stanovovaný enzym přiřazen k ADH třídy III (Norin *et al.*, 2004).

NO společně s reaktivními formami kyslíku (ROS) se podílí na obranné reakci rostlin, účastní se také hypersenzitivní reakce a rostlinné buněčné smrti (Yoshioka *et al.*, 2009). Bylo také dokázáno, že gen kódující flavohemoglobin (EC 1.14.12.17) je nepostradatelný pro detoxifikaci NO a pracuje jako ochrana proti nitrosativním podmínkám v nekrotrofní houbě *Botrytis cinerea* (Turrior-Gomez *et al.*, 2010). Z tohoto důvodu, je pravděpodobné, že relativní citlivost houbových patogenů na oxidativní a nitrosativní stres závisí na účinnosti jejich vlastního detoxifikačního mechanismu pro ROS a RNS.

Jak již bylo řečeno NO a od něj odvozené reaktivní formy dusíku jsou součástí obranného mechanismu rostlin a živočichů. Lidský patogen *Cryptococcus neoformans* obsahuje flavohemoglobin-denitrosylasu a GSNOR, které se podílí na odstraňování NO a GSNO, čímž přispívají k patogenezí tohoto organismu. Mutanti *C. neoformans*, kteří neobsahovali flavohemoglobin-denitrosylasu (fhb 1), byly v přítomnosti donoru NO v médiu hypersenzitivní k NO a jejich růst byl zastaven. Po odstranění donoru z média mutant fhb 1 pokračoval v růstu, z čehož vyplývá, že NO uplatňuje spíše fungistatický efekt. Další experimenty ukazují, že flavohemoglobin chrání buňky houbového patogena proti nitrosativnímu útoku, ale nemetabolizuje GSNO. *C. neoformans* pravděpodobně převádí GSNO na NO, který je pak detoxifikován pomocí flavohemoglobinu (de Jesus-Berriors *et al.*, 2003).

Reaktivní formy dusíku produkované makrofágy, neutrofilů a dalšími fagocytujícími buňkami jsou vysoce toxické pro většinu houbových patogenů, protože způsobují poškození DNA, proteinů a lipidů (Bogdan *et al.*, 2000). RNS tedy mohou blokovat růst těchto patogenů nebo mohou způsobovat jejich smrt. Efektivita tohoto obranného mechanismu hostitele závisí na citlivosti daného houbového patogenu k ROS a RNS a na jeho schopnosti tyto látky detoxifikovat (Aratani *et al.*, 1999).

V práci Zheng *et al.* z roku 2011 bylo prokázáno, že oxid dusnatý zprostředkovává biosyntézu polyfenolů v *Inonotus obliquus* (rezavec šikmý) po expozici houbovému elicitoru. Jako houbový elicitor byly použity buněčné stěny houby *Alternaria alternata*. Během experimentů bylo zjištěno, že vyšší buněčná hladina NO souhlasila s vyšší akumulací SNO a polyfenolů. V práci byly také uvedeny experimenty, během kterých byly k inokulovanému *I. obliquus* přidány modulátory produkce NO. Jako donor NO byl přidán nitroprusid sodný a jako inhibitor NO synthasy aminoguanidin. Z těchto

pokusů vyplynulo, že po přidavku donoru NO došlo k zvýšení produkce nejen buněčné hladiny SNO, ale i k zvýšení produkce biomasy mycelia a hladiny celkových polyfenolů mycelia. Nejvyšší nárůst byl však zaznamenán v hodnotách aktivit GSNOR a thioredoxinreduktasy. V kulturách s přidaným aminoguanidinem došlo k výraznému snížení všech výše zmíněných parametrů (Zheng *et al.*, 2011).

3 Experimentální část

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Acros Organics (USA): glutathion; Triton X-100.

Agrisera (Švédsko): primární polyklonální králičí protilátka proti-GSNOR z *Arabidopsis thaliana*

AppliChem (Německo): NADH; sušené nízkotučné mléko.

Bio-Rad (USA): Coomassie Brilliant Blue R-250, Laemmliho vzorkovací pufr, proteinový standard Precision Plus Protein^{MT} Duo Extra.

Lach-Ner (Česká republika): chlorid sodný, aceton; diethylether; formaldehyd; hydroxidy - sodný, draselný; methanol.

Merck (Německo): Ponceau S.

MP Biomedicals (Francie): tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Sigma-Aldrich (Německo): akrylamid; dihydrogenfosforečnan draselný; dihydrogenfosforečnan sodný; DTT; dusitan sodný; dodecylsulfát sodný; glycin; glycerol; hovězí sérový albumin; hydrogenfosforečnan draselný dihydrát; hydrogenfosforečnan sodný dihydrát; merkaptoethanol; roztok NBT-BCIP; *N, N'*-metylenbisakrylamid; *N, N, N', N'*-tetramethylethyldiamin; persíran amonný; PMSF; sekundární kozí protilátka na králičí imunoglobuliny značená peroxidasou; sekundární kozí protilátka na králičí imunoglobuliny značená alkalickou fosfatasou; Tween-20, luminol Chemiluminiscent Peroxidase Substrate.

Primární polyklonální protilátka na-GSNOR ze *Solanum Lycopersicum*: Primární protilátka připravená s využitím rekombinantního proteinu GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur byla poskytnuta Dr. L. Kubienovou (Kubienová et al., 2013).

Rekombinantní protein GSNOR z *Brassica oleracea* byl poskytnut Mgr. T. Tichou.

3.1.2 Přístroje a vybavení

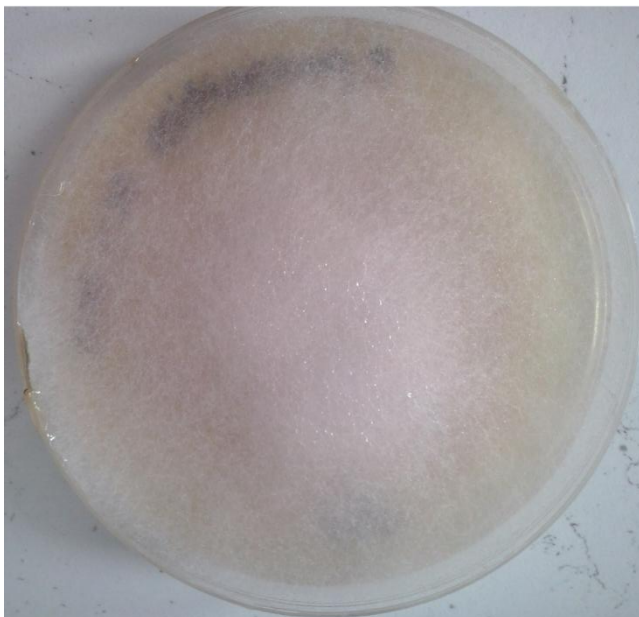
Analytické váhy (Sartorius, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); centrifuga CL31R (Thermo Jouan, Francie); centrifuga 6K15 (Sigma, Německo); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); dokumentační zařízení BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP, USA); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); laminární box (Schoeller, ČR); magnetická míchačka (IKA, Německo); mikrodestičkový reader Synergy HT (Bio-Tek, USA), chemiluminiscenční scanner (LI-COR; UK), termostat (Grant, UK); třepačka VXR basic (IKA, Německo); vortex (Stuart, UK); zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA).

Blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA); kolonky PD-10 (GE Healthcare, USA); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); nitroceluloseová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA).

3.2 Biologický materiál

3.2.1 *Phytophthora parasitica*

Phytophthora parasitica patří do třídy oomycet. Patří mezi původce chorob plísně bramboru a rajčete.



Obr. 7 Kultura *P. parasitica* in vitro.

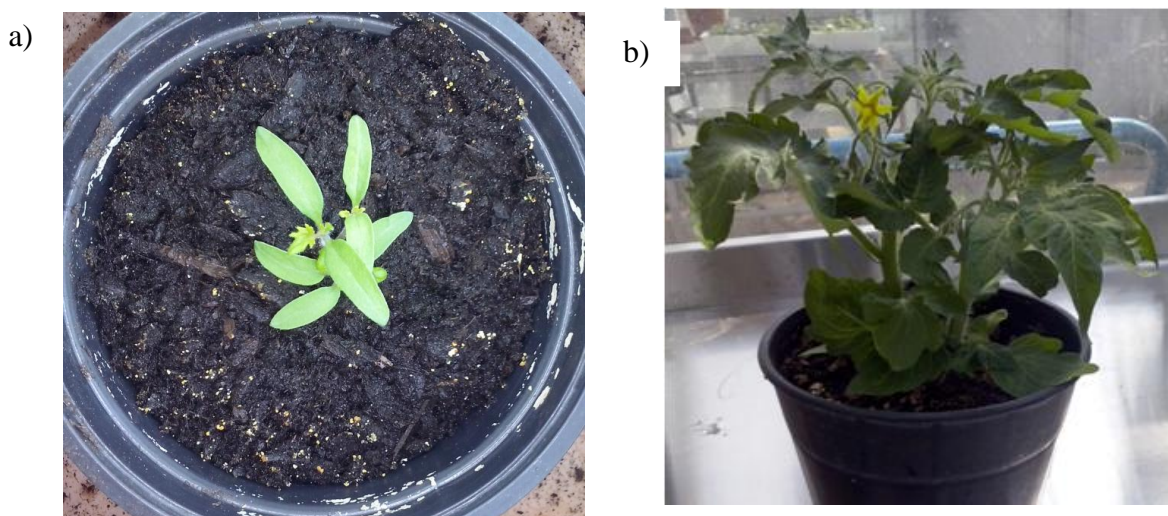
Extrakty byly připraveny z 35 dní staré kultury *Phytophthora parasitica*, která byla poskytnuta doc. Sedlářovou z Katedry botaniky PřF UP. Vzorčky byly použity buď na přímou extrakci mycelia z Petriho misek, nebo se alikvoty přenesly do média ze zelených hrášků (0,5 ml původní kultury do 10 ml média). Misky byly ponechány na světle při laboratorní teplotě 25 dní.

Příprava média

K navážce 120 g zmraženého zeleného hrášku byl přidán 1 l deionizované vody a směs byla 15 min autoklávována. Extrakt byl přecezen přes vrstvy nylonové tkaniny, doplněn deionizovanou vodou na objem 1 l a autoklávován 20 min. Hotové médium byla skladována v uzavřených nádobách v chladu do použití pro kultivaci *P. parasitica*.

3.2.2 Rostlinný materiál

Solanum lycopersicum cv. Micro-Tom je nejmenší existující kultivar rajčete, dorůstá výšky 6-8cm, s velmi krátkým životním cyklem, 70-90 dní. Právě pro svůj malý vzrůst, rychlý růst a snadnou transformaci je vhodnou modelovou rostlinou pro vývoj regulace vývoje bobulovitých plodů (Meissner *et al.*, 1997; Eyal a Levy, 2002). Kultivar byl vytvořen křížením dvou odrůd Florida Bascet a Ohio 4013-3 (Scott a Harbaugh, 1989). Jeho fenotyp je způsoben mutací tří genů a to *dwarf* (D), *miniatur* (mnt) (Meissner *et al.*, 1997) a *self-pruning* (SP) (Marti *et al.*, 2006).



Obr.8 Pěstování *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom: 11-denní semenáček (a) a 32-denní rostlina (b).

Semínka byla zasazena do zahradnického substrátu (Agro) v plastových květináčích. Rostliny byly pěstovány ve skleníku při teplotě 25°C. Pro stanovení aktivity a detekci GSNOR metodou Western blot byly použity listy 3-měsíčních rostlin *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom

3.3 Experimentální metody

3.3.1 Extrakce a purifikace

Extrakty byly připraveny z rostlinného materiálu, který byl homogenizován v tekutém dusíku nebo na předem vychlazené třecí misce s pískem. K rostlinnému materiálu byl přidán extrakční pufr (50 mM Tris, 0,1 mM EDTA Na⁺, 0,2% (v/v) Triton X-100, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) v poměru 2:1 (2 ml extrakčního pufru na 1 g rostlinného materiálu). Homogenizovaný extrakt byl centrifugován 20 min při 16000 g a 4 °C. Supernatant byl přečištěn na kolonce PD-10 (Pierce). Kolonka byla ekvilibrována 15 ml 10 mM

Na-fosfátového pufru, pH 6.8. Poté byl nanesen 1 ml vzorku, po jeho vsáknutí bylo naneseno 1,5 ml 50 mM K-fosfátového pufru, pH 7.8. Pod kolonku byla umístěna čistá zkumavka a do kolonky se nanoslo 3,5 ml 50 mM K-fosfátového pufru, pH 7.8 a zachytilo se 3,5 ml eluátu. Kolonka se nakonec nechala promývat deionizovanou vodou (Corpas *et al.*, 2008).

3.3.2 Spektrofotometrické metody

3.3.2.1 Stanovení enzymové aktivity GSNOR

Aktivita enzymů je stanovena na základě Warburgova optického testu. Ten je založen na změně absorpčního maxima oxidované a redukované formy koenzymu NAD⁺/NADH ($\lambda_{\max}\text{NAD}^+ = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\max}\text{NADH} = 340 \text{ nm}$; $\epsilon = 6200 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Aktivita GSNOR se měřila spektrofotometricky při 340 nm a při 25 °C. Měření bylo provedeno na 96-jamkových mikrodestičkách. Do jednotlivých jamek se nanoslo 225 μl reakčního pufru (20 mM Tris, pH 8, 0,5 mM EDTA Na⁺), 15 μl extraktu, 30 μl 20 mM NADH. Reakce byla startována přidávkem 30 μl 4 mM GSNO. V případě blanku bylo GSNO nahrazeno 30 μl deionizované vody.

Příprava S-nitrosoglutathionu

S-nitrosoglutathion byl připraven podle práce Moora a Mani, 2002. Navážka 614 mg glutathionu (GSH, 2 mmol, MW = 307,3) byla rozpuštěna v 3 ml 0,5 M HCl a vychlazena na ledové lázni. Navážka 138 mg NaNO₂ (2 mmol, MW = 69) byla za stálého míchání přidána k roztoku GSH. Reakční směs se ponechala 40 min na ledové lázni. Vzniklá červená sraženina byla odsáta na filtračním papíře na Büchnerově nálevce. Sraženina byla dále promyta 2x 10 ml ledově vychlazené deionizované H₂O, 2x 10 ml ledově vychlazeného acetonu, 2x 10 ml ledově vychlazeného diethyletheru. Odsátá sraženina byla seškrábána z filtračního papíru na alobalu nechal se 30 min sušit ve tmě v exikátoru. Vysušený produkt se ihned zamrazil a uschoval při -20 °C.

3.3.2.2 Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové

Principem metody je vznik stabilního komplexu adsorpcí barviva Coomasie Blue G250 na molekulu proteinu v kyselém prostředí. Výsledný produkt je měřen spektrofotometricky při 595 nm (Bradford, 1976).

Měření se provádělo v 96-jamkových mikrodestičkách. Do jednotlivých jamek bylo naneseno 45 μl deionizované vody, 5 μl extraktu nebo standardu BSA, 200 μl pracovního roztoku činidla Bradfordové. Destička byla jemně protřepána a ponechána

5 min inkubovat. Poté byla změřena absorbance při 595 nm. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin v rozmezí 0 - 1,5 mg.ml⁻¹.

Činidla pro stanovení a barvení proteinů

Činidlo Bradfordové: pracovní roztok je připraven naředěním zásobního roztoku Coomassie Blue deionizovanou vodou v poměru 1:4.

Zásobní roztok Coomassie Blue: 50 mg Coomassie Blue G250 rozpuštěno v 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné. Roztok byl doplněn do 100 ml deionizovanou vodou

3.3.2.3 Stanovení S-nitrosothiolů Savillovou metodou

Metoda je založena na uvolnění NO⁺ z S-nitrosothiolů, která je katalyzovaná Hg²⁺ soli. Vznikající dusitan je detekován v kyselém prostředí pomocí tvorby diazoniové soli, která dále kopuluje s činidlem NED za tvorby azobarviva. Vzniklý produkt je detekován spektrofotometricky při 540 nm (Moore & Mani, 2002).

S-nitrosothioly byly stanoveny na 96-jamkových mikrodestičkách. Do každé jamky byly napipetováno 5 µl extraktu a 195 µl činidla A nebo B. Po 5 minutové inkubaci bylo přidáno 100 µl činidla NED. Po dalších 5 min inkubace byla měřena absorbance při 540 nm.

S-nitrosothioly byla také stanovovány v 80 µl nepřečištěného rostlinného extraktu, ke kterému se přidalo 10 µl 1 mM kyseliny askorbové a 10 µl 1 mM pentahydrátu síranu měďnatého, směs se poté nechala za chlazení 30 min inkubovat. Poté se měřily S-nitrosothioly výše popsaným způsobem.

Složení roztoků

Činidlo Griess A: 3,5% sulfanilamid v 0,5M HCl

Činidlo Griess B: 3,5% sulfanilamid v 0,5M HCl a 1% HgCl₂

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

3.3.3 SDS-PAGE

Jedná se o elektroforesu v polyakrylovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného, která se používá pro separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti.

Rozdělení proteinů bylo provedeno pomocí SDS-PAGE v 10% dělicím, pH8,8 a v 4% zaostřovacím gelu, pH 6,8 (Laemmli, 1970). Zaostřování zóny proteinů nejprve probíhalo při napětí 120 V, po doputování bromfenolové modři k rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem bylo napětí zvýšeno na 180 V. Po vymytí bromfenolové modři z gelu byla elektroforéza ukončena.

Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Extrakt byl smíchán s Laemmliho vzorkovacím pufrům (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 0,2% bromfenolová modř; 5% merkaptoethanol) v poměru 3:1. Poté byl vložen do termobloku a inkubován 10 min při 95 °C. Po ochlazení na ledové lázni se extrakt centrifugoval 5 min při 6 000 g. Do jamek na připraveném gelu bylo nanášeno 20-25 µl připraveného vzorku. Byl také nanášen standard molekulové hmotnosti v objemu 5 µl. U standard nebyla provedena inkubace při 95 °C. Jako standardy byly použity Precision Plus Protein^{MT} Dual Xtra Standards (Bio-Rad) nebo Western Blot Protein Standard (Serva)

Roztoky pro SDS-PAGE

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

V tab 2. je uvedeno složení zaostřovacího a dělicího gelu. Objemy jsou uvedeny pro přípravu 2 gelů pro skla o velikosti 10x10 cm se spacery o tloušťce 0,75 mm.

Tab 2. Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy jsou uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	H ₂ O	SDS	TEMED	10% APS
10% dělicí	3,3	2,5		4,1	0,1	0,01	0,1
4% zaostřovací	0,65		1,25	3,05	0,05	0,01	0,1

Proteinů v gelech po ukončení elektroforézy byly detekovány komerčním roztokem Coomassie Blue (Bio-Rad).

3.3.4 Western blot

Metoda bývá používána pro detekci specifického proteinu ve směsi. Můžeme využít elektroforeticky separované proteiny, které jsou přeneseny z gelu na membránu, kde jsou detekovány specifickými primárními protilátkami.

Separované proteiny metodou SDS-PAGE byly z gelu přeneseny na nitroceluloseovou membránu metodou "tank blotting" s plně ponořenou membránou a gelem v blotovacím pufru. Blotování probíhalo přes noc. Do blotovací komůrky obsahující přenosový pufr se vložila uzavřená kazeta obsahující následně seřazené složky: porézní houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, porézní houbička. Úspěšnost transferu proteinů na membránu byla ověřena vizualizací proteinů barvivem Ponceau S (0,2% Ponceau S; 10% kyselina octová), které lze zpětně vymýt destilovanou vodou. Po vymytí barviva byla membrána promývána 3x 10 min 5% roztokem sušeného mléka, ve kterém se po promytí membrána nechala blokovat dvě hodiny. Po blokaci byla

membrána inkubována 2 hod s primární polyklonální králičí protilátkou, která byla připravena proti rekombinantnímu proteinu GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur, (ředění protilátky bylo 1:1000 v 5% mléku). Poté následovalo promytí 3x 10min v roztoku Tween 20 v TBS. V dalším kroku se k membráně přidala sekundární kozí protilátka s navázanou alkalickou fosfatasou nebo křenovou peroxidasou. Ředění bylo v prvním případě 1:5000 a v druhém 1:10000. Membrána se nechala inkubovat sekundární protilátkou po dobu 1 hodiny. Následovalo opětovné promytí v roztoku Tween 20 v TBS (3x 10 min). K detekci byly využity dvě metody, a to chemiluminiscence nebo detekce barevného produktu. Substrátem pro alkalickou fosfatasu byl komerční roztok NBT-BCIP a pro křenovou peroxidasu se jednalo o komerční roztok luminolu. Membrány značené alkalickou fosfatasou byly vyfotografovány na dokumentačním systému Gel Doc^{MT} a chemiluminiscenční signál z membrán značených křenovou peroxidasou byly vyhodnoceny pomocí chemiluminiscenčního skeneru C-DiGit.

- Primární protilátky:

- (a) připravená králičí primární polyklonální protilátka proti-SIGSNOR (1:250 v 0,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)

- (b) komerční králičí primární polyklonální protilátka proti-AtGSNOR (1:250 v 0,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)

- Sekundární protilátky:

- (a) komerční sekundární kozí protilátka značená peroxidasou (1:1000 v 0,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)

- (b) komerční sekundární kozí protilátka značená alkalickou fosfatasou (1:1000 v 0,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)

Roztoky pro Western blot

Barvicí roztok s Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 10% (v/v) kyselině octové

Blotovací pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,3

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

TBS Tween: 0,15 ml Tween-20 do 300 ml TBS

10% nízkotučné sušené mléko v TBS Tween

Komerční luminol (Sigma): reakční pufr a reagent v poměru 2:1

Barvicí roztok s NBT-BCIP: připravený komerční roztok NBT-BCIP (Sigma)

3.3.5 Nativní elektroforéza

Elektroforéza je prováděna bez přítomnosti denaturačních činidel. Separace proteinů je dána jejich celkovým nábojem, tvarem a velikostí.

Separace proteinů byla provedena pomocí nativní elektroforézy v 8% dělicím gelu, pH 8,8 a v 4% zaostřovacím gelu, pH 6,8. Zaostřování v zaostřovacím gelu probíhalo při konstantním napětím 100 V, pro separaci v dělicím gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V.

Po separaci byla provedena detekce GSNOR metodou fluorescenční detekce spotřeby u kofaktoru NADH. Na gel byl nejprve položen filtrační papír, na který bylo nanášeno 5 ml 4 mM NADH, následovala 10 min inkubace ve tmě. Poté byl filtrační papír odstraněn a na gel bylo nanášeno 5 ml 2 mM GSNO, následovala 5 min inkubace. Po ozáření gelu UV zářením byla detekována místa, kde došlo díky aktivitě GSNOR ke spotřebě NADH jako tmavé bandy.

Další dva gely byly barveny pomocí NBT s využitím dehydrogenasové aktivity GSNOR s (S-hydroxymethyl)glutathionem jako substrátem (Sakamoto *et al.*, 2002). Gely byly rozděleny zvlášť do misek a bylo k nim přidáno 10 ml roztoku 0,1 mM NAD^+ a 0,1 mM PMS v 0,1 M fosfátovém pufru, pH 7,4. Dále bylo do obou misek napipetováno 50 μl 0,1 mM NBT v 0,1 M fosfátovém pufru, pH 7,4. Nakonec bylo pouze už k jednomu gelu přidáno 50 μl roztoku 1 mM GSH, který byl připraven rozpuštěním 3,1 mg GSH v 40 μl 0,1 M fosfátového pufru, pH 7,4 a 10 μl 1 mM roztoku formaldehydu (10x naředěný 30% zásobní roztok formaldehydu 0,1 M fosfátovým pufrům, pH 7,4). Oba gely se nechaly inkubovat ve tmě na třepačce do vývoje modrofialových bandů, indikujících přítomnost dehydrogenasové aktivity GSNOR.

Příprava vzorků pro nativní elektroforézu:

Extrakt byl smíchán s 60% glycerolem v poměru 1:1. Jako standard byla použita rekombinantní GSNOR, která byla ředěna 60% glycerolem v poměru 1:1. Pro monitorování průběhu elektroforézy byla použita směs bromfenolové modři s glycerolem v poměru 3:1.

Použité roztoky:

Elektrodový pufr pro nativní elektroforézu.

V tab. 3 je uveden postup pro přípravu gelů.

Tab. 3 Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy jsou uvedeny v ml.

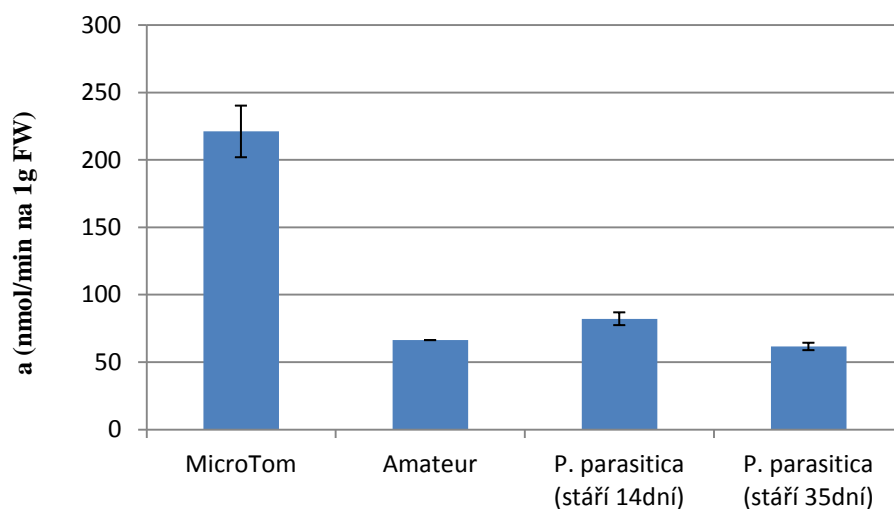
typ gelu	AA/Bis 30%/0,8%	Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	H ₂ O	TEMED	start APS
8% dělicí	5,2	5	-	9,2	0,02	0,12
4% zaostřovací	1,3	-	2,5	5,9	0,02	0,12

4 Výsledky a diskuze

4.1 Stanovení aktivity GSNOR v *P. parasitica*

Jedním z cílů bylo potvrzení přítomnosti aktivity GSNOR u *P. parasitica*. Pro srovnání byla aktivita enzymu také stanovena v extraktech rostlin rajčat *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a *S. lycopersicum* cv. Amateur.

Při měření pozorováno, že aktivita GSNOR klesá se stářím kultury *P. parasitica* (obr.9). Ukázalo se, že aktivita *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom byla trojnásobně vyšší než u srovnávacího genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur



Obr. 9: Stanovení aktivity GSNOR v *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, *S. lycopersicum* cv. Amateur a *P. parasitica*

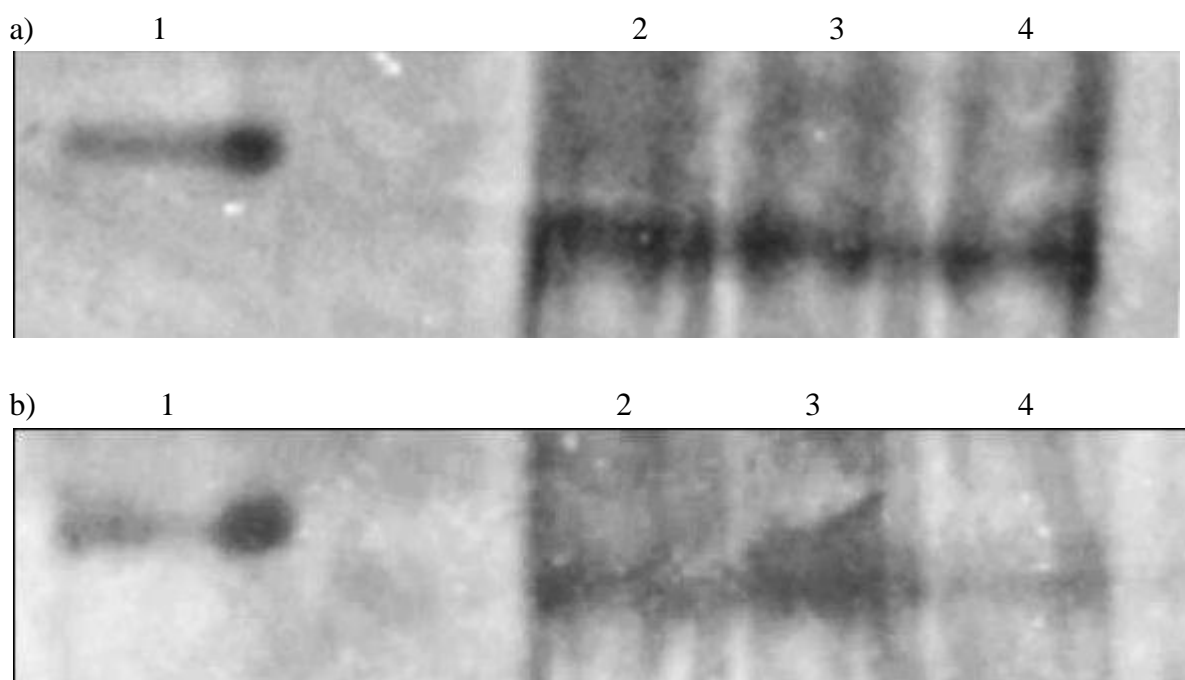
4.2 Detekce GSNOR v *P. parasitica* metodou nativní elektroforézy

Přítomnost GSNOR v extraktu mycelia *P. parasitica* byla prokázána nativní elektroforézou a s využitím detekce na základě rozkladu NADH v UV světle (obr. 10). Výsledky získané metodou barvením NBT s využitím dehydrogenasové aktivity GSNOR již nebyly tak přesvědčivé, bandy odpovídající GSNOR byly pozorována i

v případě kontrolních gelů, ke kterým nebyl přidán GSH potřebný pro tvorbu substrátu enzym (obr. 11)



Obr. 10: Detekce GSNOR rozkladem NADH v UV světle: 1 – rekombinantní SIGSNOR, 2 – vzorek *P. parasitica* (35 µl), 3 – vzorek *P. parasitica* (30 µl), 4 – vzorek *P. parasitica* (25 µl).

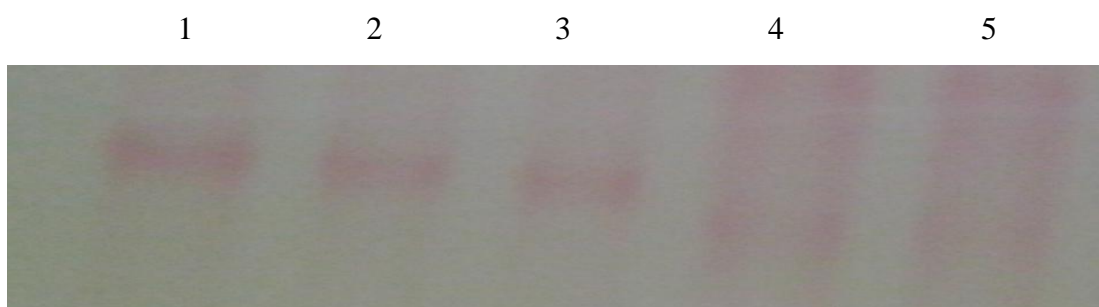


Obr. 11: Detekce GSNOR barvením NBT s bez přidání GSH (a) a s přidavkem GSH (b). 1 – rekombinantní SIGSNOR, 2 – vzorek *P. parasitica* (35 µl), 3 – vzorek *P. parasitica* (30 µl), 4 – vzorek *P. parasitica* (25 µl).

4.3 Detekce GSNOR metodou Western blot

V rámci prováděných experimentů, byla použita metoda Western blot pro ověření možnosti detekce GSNOR v extraktech z *P. parasitica* pomocí dostupných primárních protilátek: primární polyklonální protilátky proti GSNOR ze *S. lycopersicum* a komerční protilátky proti GSNOR z *A. thaliana* (Agrisera). Pro kontrolu metody byl použit rekombinantní protein GSNOR z *Brassica oleracea*. Proteiny z gelu byly

přeneseny na nitrocelulosoovou membránu, což bylo potvrzeno pomocí Ponceau S (obr. 12). Imunochemická detekce potvrdila vedle standardu rekombinantního proteinu GSNOR z *B. oleracea* přítomnost GSNOR v extraktu z listů *S. lycopersicum* cv. Amateur (obr. 13). Slabý band byl pozorován i v extraktu z rajčete cv. Micro-Tom, naopak v extraktu z mycelia *P. parasitica* nebyl žádný imunoreaktivní protein detekován. Podobné negativní výsledky detekce GSNOR v extraktu *P. parasitica* byly získány i při použití komerční protilátky na GSNOR z *A. thaliana*



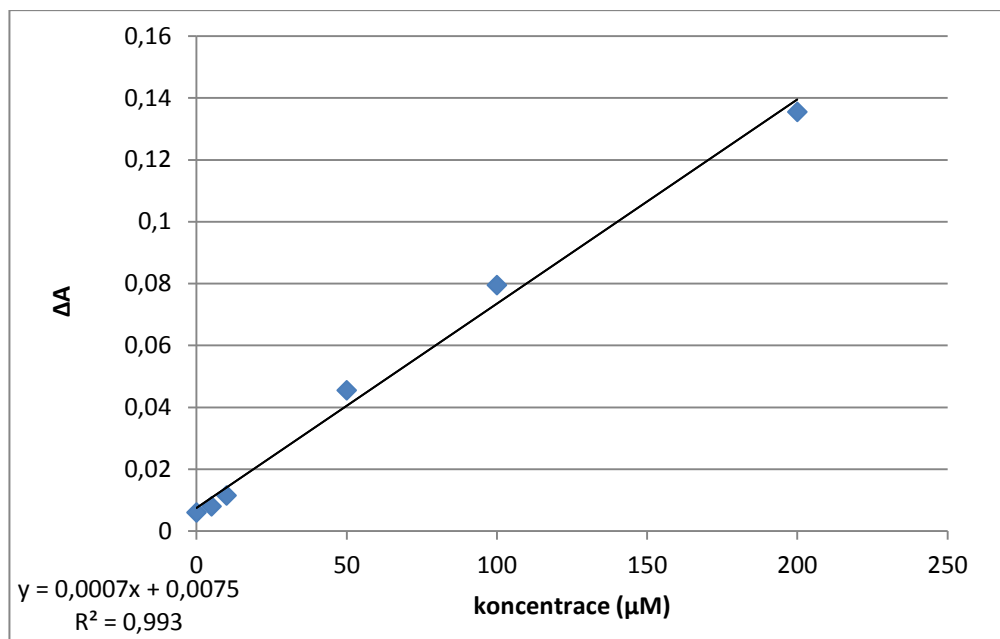
Obr. 12 Barvení molekulových markerů pomocí Ponceau S: 1 – GSNOR z *Brassica oleracea*, 2 a 3- vzorek *S. lycopersicum* cv. Amateur, 4 a 5 - *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom



Obr. 13: Detekce GSNOR: 1 – GSNOR z *Brassica oleracea*, 2 a 3- vzorek *S. lycopersicum* cv. Amateur, 4 a 5 - *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom

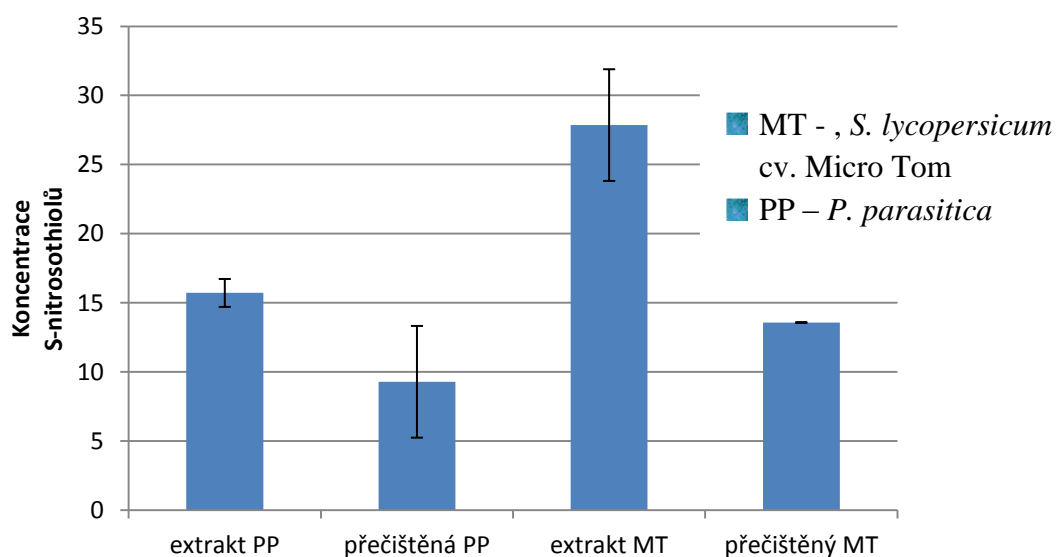
4.4 Stanovení S-nitrosothiolů

Dalším cílem práce bylo ověřit možnost stanovení obsahu S-nitrosothiolů v extraktech *P. parasitica* a extraktech listů rajčat Micro-Tom Savillovou metodou. K tomuto měření bylo potřeba vytvořit kalibrační křivku. Pro kalibrační křivku byly připraveny 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM a 200 μM roztoky GSNO v 0,5 M HCl.



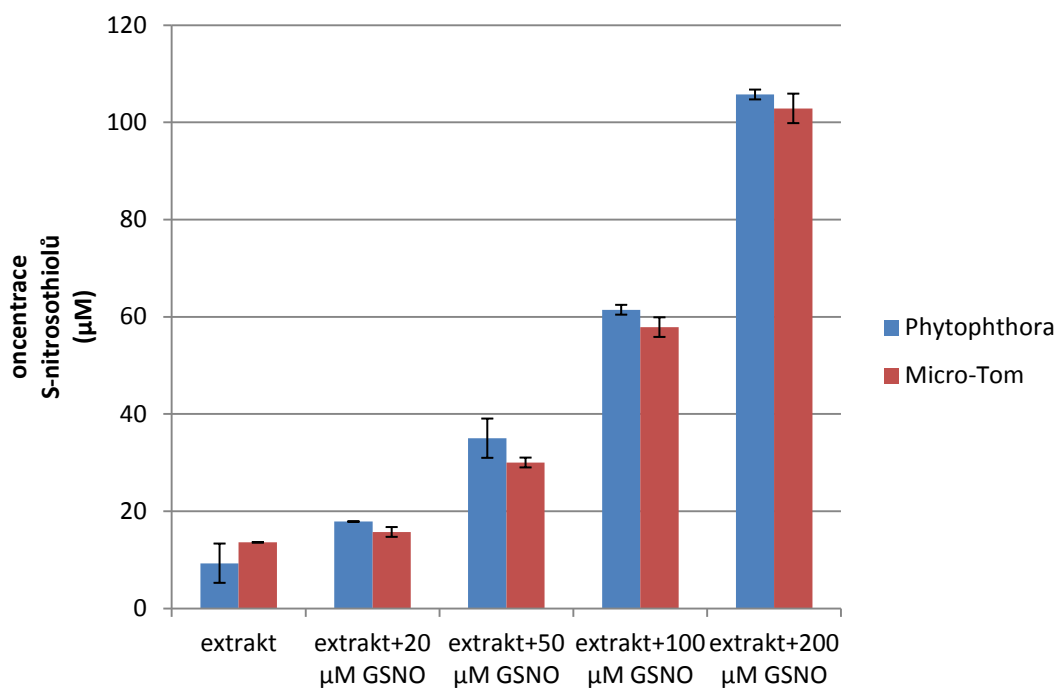
Obr. 14: Kalibrační křivka pro vyhodnocení obsahu S-nitrosothiolů ve vzorku.

Hladina celkových S-nitrosothiolů v nepřečištěných extraktech byla téměř dvojnásobně vyšší u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom než u *P. parasitica* (obr.15). Po přečištění extraktů gelovou chromatografií na kolonkách PD-10, kdy byly odstraněny GSNO a ostatní nízkomolekulární S-nitrosothioly, došlo k snížení obsahu S-nitrosothiolů bezmála na polovinu u obou vzorků.



Obr. 15: Stanovení koncentrace S-nitrosothiolů v přečištěných a nepřečištěných extraktech *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a *P. parasitica*.

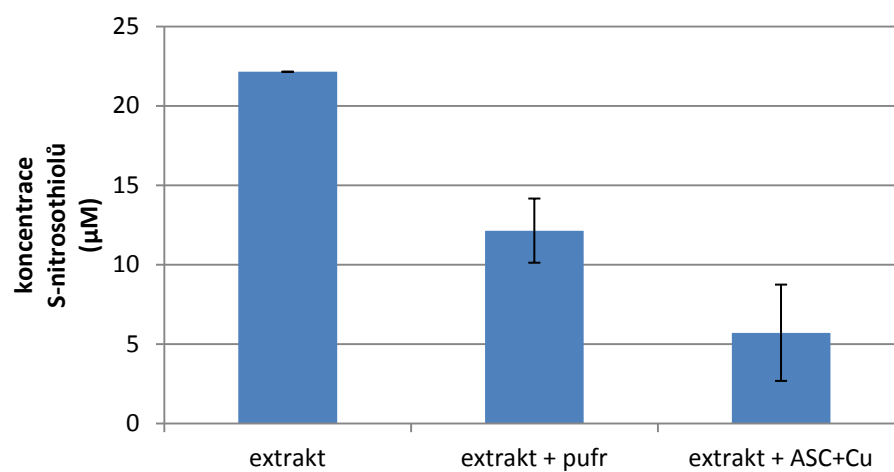
Dále byl studován vliv exogenně přidaného GSNO na koncentraci celkových S-nitrosothiolů v přečištěném vzorku (obr.16). Ukázalo se, že po přidavku GSNO se hladina S-nitrosothiolů zdvihla, ale přesto neodpovídala teoretické hodnotě, která byla předpokládána. Pravděpodobně docházelo k částečnému rozkladu přidaného GSNO vlivem látek přítomných v extraktech.



Obr. 16: Stanovení S-nitrosothiolů v *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a *P. parasitica* po přidání narůstající koncentrace GSNO.

Dále se také prováděl experiment, ve kterém k nepřečištěnému extraktu z *P. parasitica* byly přidány 1 mM kyselina askorbová a 1 mM síran měďnatý, jako látky způsobující rozklad S-nitrosothiolů (obr. 17). V porovnání se vzorkem, který byl naředěn ve stejném poměru s pufrem, bylo pozorováno, že po přidavku Cu^{2+} a kyseliny askorbové klesla koncentrace S-nitrosothiolů na více než polovinu.

P. parasitica



Obr. 17: Stanovení S-nitrosothiolů v *P. parasitica* po jejich rozkladu pomocí kyseliny askorbové a Cu^{2+} .

5 Závěr

V experimentální části práce byla provedena výchozí studie GSNOR v modelové rostlině *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a patogenu *P. parasitica*. Zásadní výsledky práce jsou:

- Při sledování aktivity GSNOR v genotypch Solanum byla největší aktivita naměřena u genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom.
- Se zvyšujícím se stářím mycelia *P. parasitica* se snižuje aktivita GSNOR.
- Metodou nativní elektroforézy byl úspěšně detekovaná přítomnost GSNOR v myceliu *P. parasitica*.
- Imunochemická detekce potvrdila přítomnost GSNOR v listech *S. lycopersicum* cv. Amateur, méně přesvědčivě také v genotypu *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom.
- Dvakrát vyšší hladina S-nitrosothiolů byla spozorována v nepřečištěných vzorcích u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom oproti *P. parasitica*.
- Po přidavku Cu^{2+} a kyseliny askorbové došlo k rozkladu S-nitrosothiolů v extraktech.

V práci byla prokázána přítomnost GSNOR i SNO v patogení oomycetě. Detailnější poznání jejich funkce a úlohy v patogenezí *P. parasitica* si však vyžaduje další zkoumání již zavedenými experimentálními metodami.

Seznam citované literatury

1. Allais J. J., Louktibi A., Baratti J. (1983): Oxidation of methanol by yeast, *Pichia pastoris*, purification and properties of the formaldehyde dehydrogenase. *Agricultural and Biological Chemistry* **47**, 1509-1516.
2. Aratani Y., Koyama H., Nyui S. I., Suzuki K., Kura F., Maeda N. (1999): Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infection and Immunity* **67**, 1828-1836.
3. Arnette DR., Stamler JS. (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**, 279-85.
4. Belenghi B., Romero-Puertas M. C., Vercammen D., Bracke A., Inze D., Delledonne M., Van Breusegem F. (2007): Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 1352-1358.
5. Benhar M., Forrester M. T., Stamler J. S., (2009): Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 721-732.
6. Bogdan C., Rollenhagen M., Diefenbach A. (2000): Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology* **12**, 604-604.
7. Boucher J. L., Genet A., Vadon S., Delaforge M., Mansuy D. (1992): Formation of nitrogen-oxides and citrulline upon oxidation of N-omega-hydroxyl-L-arginine by heme proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **184**, 1158-1164.
8. Bradford M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
9. Camejo D., Romero-Puertas M. D., Rodriguez-Serrano M., Sandalio L. M., Lazaro J. J., Jimenez A., Sevilla F. (2013): Salinity-induced changes in S-nitrosylation of pea mitochondrial proteins. *Journal of Proteomics* **79**, 87-99.

10. Cardaci S., Filomeni G., Criolo M. R. (2012): Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues. *Journal of Cell Science* **125**, 2115-2125.
11. Chaki M., Valderrama R., Fernandez-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. (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.
12. Chamulitrat W. (1998): Nitric oxide inhibited peroxy and alkoxy radical formation with concomitant protection against oxidant injury in intestinal epithelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **355**, 206-214.
13. Cooney R. V., Harwood P. J., Custer L. J., Franke A. A., (1994): Light-mediated conversion of nitrogen-dioxide to nitric-oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives* **102**, 460-462.
14. Corpas F. J. (a), Carreras A., Esteban F. J., Chaki M., Valderrama R., del Rio L. A., Barroso J. B. (2008): Localization of S-nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and S-nitrosoglutathione reductase activity in plants. *Methods in Enzymology* **437**, 561-574.
15. Corpas F. J. (b), Chaki M., Fernande-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.
16. Diaz M., Achkor H., Titarenko E., Martinez M. C. (2003): Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Febs Letters* **543**, 136-139.
17. Eyal E., Levy A. A. (2002): Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 112-117.
18. Ferenčík M, Štvrtinová V., Kačáni L. (1994): Oxid dusnatý – mediátor imunitného, kardiovaskulárneho a nervového systému. *Forum Immunologie*, **2(2)**, 128-135.
19. Fernandez M. R., Biosca J. A., Norin A., Jornvall H., Pares X. (1995): Clas III alcohol-dehydrogenase from *Saccaromyces serevisiae* – structural and enzymatic

- features differ toward the human mammalian forms in a manner consistent with functional needs in formaldehyde detoxication. *Febs Letters* **370**, 23-26.
20. Fernandez M. R., Biosca J. A., Torres D., Crosas B., Pares X. (1999): A Double residue substitution in the coenzyme-binding site accounts for the different kinetic properties between yeast and human formaldehyde dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 37869-37875.
 21. Fernandez M. R., Biosca J. A., Pare's X. (2003): S-Nitrosoglutathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localisation. *Cellular and Molecular Life Science* **60**, 1013–1018.
 22. Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Calo' G., Salerno G., Lamattinaa L. (2010): Characterization of a Nitric Oxide Synthase from the Plant Kingdom: NO Generation from the Green Alga *Ostreococcus tauri* Is Light Irradiance and Growth Phase Dependent. *The Plant Cell* **22**, 3816–3830.
 23. Foster M. W., Liu L. M., Zeng M., Hess D. T., Stamler J. S. (2009): Genetic analysis of nitrosative stress. *Biochemistry* **48**, 792-799.
 24. Freechan A., Kwon E., Yun B. W., Wang Y. Q., Pallas J. A., Loake G. J. (2005): A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8054-8059.
 25. Gaston B. (1999): Nitric oxide and thiol groups. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1411**, 323–333.
 26. Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A. (2003): S-nitrosylation signaling in cell biology. *Molecular interventions* **3**, 253-263.
 27. Gaston B. (2006): Summary: systemic effects of inhaled nitric oxide. *Proceedings of the American Thoracic Society* **3**, 170-172.
 28. 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.
 29. Gow A. j., Buerk D. G., Ischiropoulos H. (1997): A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2841-2845.
 30. Guo F. Q., Okamoto M., Crawford N. M. (2003): Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**, 100-103.

31. Hampl V.(1997): *Exogenní NO v léčbě plicní hypertenze*. Habilitační práce, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika.
32. Handy D. E., Loscalzo J. (2006): Nitric oxide and Posttranslational modification of the vascular proteome - S-nitrosation of reactive thiols. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **26**, 1207-1214.
33. Hess D. T., Matsumoto A., Kim S. O., Marshall H. E., Stamler J. S. (2005) Protein Snitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 150 – 166.
34. Hogg N. (2000): Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radical Biology and Medicine* **28**, 1478-1486.
35. Hogg N. (2002): The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **42**, 585– 600.
36. Holmgren A. (2000): Antioxidant Function of Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *Antioxidants and Redox Signaling* **2**, 811-U209.
37. Holmquist B., Vallee B. L. (1991): Human liver class III alcohol and glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase are the same enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **178**, 1371-1377.
38. Huang C. Y., Ken C. F., Wen L., Lin C. T. (2009): An enzyme possessing both glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosogluthathione reductase from *Antrodia camphorata*. *Food Chemistry* **122**, 795-802.
39. Iborra F. J., Renau-Piqueras J., Portoles M., Boleda M. D., Guerri C., Pares X. (1992): Immunocytochemical and biochemical demonstration of formaldehyde dehydrogenase (class III alcohol dehydrogenase) in the nucleus. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **40**, 1865–1878.
40. Ignarro L. J. (1999): Nitric oxide: A unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Bioscience Reports* **19**, 51-71.
41. Jahnová J., Tichá T., Kubienová L., Luhová L., Petřivalský M. (2013): Biological functions and importance of pretein S-nitrosation. *Chemické listy* **107**, 350-355.
42. Jensen D. E., Belka G. K., Du Bois G. C. (1998): S-Nitrosogluthathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemical Journal* **331**, 659-668.
43. de Jesus-Berriors M., Liu M., Nussbaum J. C., Cox G. M., Stamler J. S., Heitman J. (2003): Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. *Current Biology* **13**, 1963-1968.

44. Kavya R., Saluja, R., Singh, S., Dikshit, M. (2006): Nitric oxide synthase regulation and diversity: Implication in Parkinson's disease. *Nitric Oxide – Biology and Chemistry* **15**, 280-294.
45. Keller D. A., Heck H. D., Randall H. W., and Morgan K. T. (1990): Histochemical localization of formaldehyde dehydrogenase in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **106**, 311–326.
46. Kelm, M. (1999): Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta-bioenergetics* **1411**, 273-289.
47. Kharitonov V. G., Sundquist A. R., Sharma V. S. (1995): Kinetics of nitrosation of thiols by nitric-oxide in the presence of oxygen. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 28158-28164.
48. Knowles R. G., Moncada, S. (1994): Nitric-oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* **298**, 249-258.
49. Koivusalo M., Baumann M., Uotila L. (1989): Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and clas-III alcohol-dehydrogenase. *FEBS Letter* **257**, 105-109.
50. 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-nitrosogluthathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochemie* **95**, 889-902.
51. Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Mieslerová B., Petřivalský M. (2014): Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosogluthathione reductase in plants. *Planta* **239**, 139-146.
52. Kupková Z., Beneš L. (2004): Chemical properties, biological effects and methods of detection of nitric oxide. *Chemické Listy* **98**, 116-122.
53. Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680- &.
54. Lancaster J. R. Jr. (2008): Protein cysteine thiol nitrosation: Maker or maker of reactive nitrogen species-induced nonerythroid cellular signaling?. *Nitric Oxide – Biology and Chemistry* **19**, 68-72.
55. Lee B., Yurimoto H., Sakai Y., Kato N. (2002): Physiological role of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Microbiology-SGM* **148**, 2697-2704.

56. Lee U., Wie C., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E. (2008): Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 786-802.
57. Leitner M., Vandelle E., Gaupels F., Bellin D., Delledonne M. (2009): NO signals in the haze Nitric oxide signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 451-458.
58. Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J. M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2011): Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 789-793.
59. Lin A. H., Wang Y. Q., Tang J. Y., Xue P., Li C. L., Hu B., Yang F. Q., Loake G. J., Chu C. C. (2012): Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. *Plant Physiology* **158**, 451-464.
60. Linder Mayer C., Saalbach G., Durner J. (2005): Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* **137**, 921-930.
61. Liu X., Miller M. J., Joshi M. S., Thomas D. D., Lancaster Jr. J. R. (1998): Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **95**, 2175–2179.
62. Liu L. M., 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.
63. Ma Y. M., Liu L., Zhu C. G., Sun C. H., Xu B., Fang J., Tang J. Y., Luo A. D., Cao S. Y., Li G. P., Qian Q., Xue Y. B., Chu C. C. (2009): Molecular analysis of rice plants harboring a multi-functional T-DNA tagging system. *Journal of Genetics and Genomics* **36**, 267-276.
64. Malik S. I., Hussain A., Yun B. W., Spoel S. H., Loake G. J. (2011): GSNOR-mediated de-nitrosylation in the plant defence response. *Plant Science* **181**, 540-544.
65. Mannick J. B., Schonhoff C. M. (2002): Nitrosylation: the next phosphorylation?. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **408**, 1-6.
66. Marti E., Gisbert C., Bishop G. J., Dixon M. S., Garcia-Martinez J. L. (2006): Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro Tom. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2037-2047.

67. 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. *European Journal of Biochemistry* **241**, 849-857.
68. Martinez-Ruiz A., Lamas S. (2004): S-nitrosylation: a new potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovascular Research* **62**, 43-52.
69. Meissner R., Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A. (1997): A new model system for tomato genetics. *Plant Journal* **12**, 1465–1472.
70. Moore K. P., Mani A. R. (2002): Measurement of protein nitration and S-nitrosothiol formation in biology and medicine. *Methods of Enzymology* **359**, 256-268.
71. Moncada S. (1994): Nitric-oxide. *Journal of Hypertension* **12**, S35-S39.
72. Nathan C. (2003): Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *Journal of Clinical Investigation* **111**, 769– 778.
73. Norin A., Shafqat J., El-Ahmad M., Alvelius G., Cederlund E., Hjelmqvist L., Jörnvall H. (2004): Class III alcohol dehydrogenase: consistent pattern complemented with the mushroom enzyme. *Febs Letters* **559**, 27-32.
74. 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 Biotechnology Journal* **2**, 359-366.
75. Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008): Signalling pathways of nitric oxide in plants. *Chemické Listy* **102**, 410-416.
76. 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 Unites States of America* **99**, 5913-5918.
77. Rusterucci C., Espunya M. C., Diaz M., Chabannes M., Martinez M. C. (2007): S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in Arabidopsis, both locally and systemically. *Plant Physiology* **143**, 1282-1292.
78. 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.

79. Schmidt H. H. W., Lohmann S. M., Walter U. (1993): The nitric-oxide and CGMP signal-transduction system – regulation and mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta* **1178**, 153-175.
80. Schmidt H. H. W., Hofmann H., Schindler U., Shutenko Z. S., Cunningham D. D., Feelisch M.(1996): No center dot NO from NO synthase. *Proceedings of the National Academy of sciences of the Unites States of America* **93**, 14492 – 14497.
81. Scott J. W., Harbaugh B. K. (1989): Development of mini-dwarf tomatoes suitable for marketing with traditional nursery or floricultural crops. *Hortscience*, 93.
82. Shafqat J., ElAhmad M., Danielsson O., Martinez M. C., Persson B., Pares X., Jornvall 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 (class I and P). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5595-5599.
83. Shahani N., Sawa A. (2011): Nitric Oxide Signaling and Nitrosative Stress in Neurons: Role for S-Nitrosylation. *Antioxidant and Redox Signaling* **14**, 1493-1504.
84. Singh R. J., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B. (1996): Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 18596-18603.
85. 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.
86. Stamler J. S., Jaraki O., Osborne J., Simon D. I., Keaney J., Vita J., Singel D., Valeri C. R., Loscalzo J. (1992): Nitric-oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum-albumin. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7674-7677.
87. Stohr C., Ullrich W. R. (2002): Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Jouranl of Experimental Botany* **53**, 2293-2303.
88. Stohr C., Stremlau S. (2006): Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* **57**, 463-470.
89. Tada Y., Spoel S. H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou L. Z., Song J. Q., Wang C., Zuo J. R., Dong X. N. (2008): Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952-956.

90. Thompson C. M., Sonawane B., Grafstrom R. C. (2009): The ontogeny, distribution, and regulation of alcohol dehydrogenase 3: implications for pulmonary physiology. *Drug Metabolism and Disposition* **37**, 1565-1571.
91. Turrion-Gomez J. L., Eslava A. P., Benito E. P. (2010): The flavohemoglobin BCFHG1 is the main NO detoxification system and confers protection against nitrosative conditions but is not a virulence factor in the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology* **47**, 484–496.
92. Uotila L., Koivusalo M. (1979): Purification of formaldehyde and formate dehydrogenases from pea-seeds by affinity chromatography and S-formylglutathione as the intermediate of formaldehyde metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **196**, 33-45.
93. Wink D. A., Darbyshire J. F., Nims R. W., Saavedra J. E., Ford P.C. (1993): Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chemical Research in Toxicology* **6**, 23– 27.
94. 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.
95. Yoshioka H., Asai S., Yoshioka M., Kobayashi M. (2009): Molecular mechanisms of generation for nitric oxide and reactive oxygen species, and role of the radical burst in plant immunity. *Molecules and Cells* **28**, 321–329.
96. Zheng W. F., Liu Y. B., Pan S. Y., Yuan W. H., Dai Y. C., Wei J. C. (2011): Involvements of S-nitrosylation and denitrosylation in the production of polyphenols by *Inonotus obliquus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**, 1763-1772.

Seznam použitých zkratk

AA/BIS	Akrylamid- <i>N,N</i> '-bisakrylamid
ADH (1,3,4)	Alkoholdehydrogenasa (třída 1,3,4)
APS	Persíran amonný
AP	Alkalická fosfatasa
AtGSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa z <i>Arabidopsis thaliana</i>
BSA	Hovězí sérový albumin
cADPR	cyklická adenosindifosfát ribosa
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
DTT	Dithiotreitol
FAD	Flavinadenindinukleotid
FALDH, GFD	Glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
FDH	formyldehydrogenasou
FMN	Flavinmononukleotid
GAPDH	glycerolaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GSH	Glutathion
GSNHOH	S-hydroxylaminoglutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSOOH	Kyselina sulfinová
GSONH ₂	Glutathion-sulfinamid
GSSG	Glutathion-disulfid
HMGS	S-(hydroxymethyl)glutathion
HRP	Křenová peroxidasa
JA	Kyselina jasmonová
MAT1	methioninadenosyltransferasa 1
MW	Molekulová hmotnost
NAD ⁺	Oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Redukovaný nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NBT-BCIP	Roztok nitrotetrazoliová modře a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátu

NED	N-(1-naftyletylen)diamin
Ni-NR	Nitrit:NO oxidoreduktasa
NO ⁻	Nitroxyl
NO	Oxid dusnatý
NO ⁺	Nitrosioniový ion
NO ₂ [·]	Radikál oxidu dusičitého
NO ₂ ⁻	Dusitanový anion, nitrit
NO ₃ ⁻	Dusičnanový anion, nitrát
NOS	NO-synthasa
NPR1	nonexpressor of pathogenesis-related proteins 1
NR	Nitrátreduktasa
O ₂ ^{-·}	Superoxidový anionradikál
ONOO ⁻	Peroxydusitan
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PMSF	Fenylmethylsulfonylfluorid
Prx II E	peroxyredoxin II E
PTIO	2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl 3-oxid
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RSNO(s), SNO	S-nitrosothiol(y)
SA	Kyselina salicylová
SABP3	salicylic acid binding protein
SAR	systemově získaná rezistence
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SIGSNOR	GSNOR ze <i>Solanum lycopersicum</i>
SNAP	S-nitroso-N-acetyl-DL-penicilaminu
TBS	Fyziologický roztok pufrovaný Tris
TEMED	N, N' - tetramethylendiamin
Trx	Thioredoxin